

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670342

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能異常は高齢期の重要な負の健康アウトカムに関与するか

研究課題名(英文)Is mitochondrial dysfunction involved in adverse health outcomes in later life?

研究代表者

新開 省二(Shinkai, Shoji)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・副所長

研究者番号：60171063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病の患者では血清GDF15濃度が非常に高いが、一般高齢者における血清GDF15が軽度から中等度高いことの臨床疫学的意義は不明である。本研究では地域在住の一般高齢者1,836人を平均4.7年間追跡し、追跡期間中に発生した死亡(134例)とベースライン血清中のGDF15濃度との関連を調べた。Coxの比例ハザードモデルを用いて、性、年齢や既知の死亡リスクおよび炎症性マーカーの影響を除いても、GDF15濃度が高い人の死亡リスクは統計学的に有意に高かった。血清GDF15濃度は一般高齢者の総死亡を予測することから、高齢期の老化過程にミトコンドリア機能異常が関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Growth differentiation factor 15 (GDF15) is highly increased in sera of mitochondrial disease patients. However, clinico-epidemiological relevance of moderately elevated serum GDF15 has not been examined extensively. In this study, 1836 community-dwelling older were followed for a mean period of 4.7 years, and the association of baseline serum GDF15 with subsequent mortality risk (n=134) was examined. Even after controlling for demographics, conventional mortality risks and inflammation markers using the Cox proportional hazard model, those with higher concentrations of GDF15 showed significantly increased risk of mortality compared with those with lower GDF concentrations. Additional adjustment for inflammation markers did not essentially change the associations. In conclusion, serum GDF15 concentrations independently predicted total mortality in a general population of older adults, which implies a possible involvement of mitochondrial dysfunction in aging process in later life.

研究分野：老年学

キーワード：ミトコンドリア 加齢 分子疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 老化および高齢期の様々な病態の進展における炎症の関与についてはよく知られている。一方、加齢とともにミトコンドリア DNA の体細胞変異が増加し、ミトコンドリアの機能異常が起こる。ミトコンドリアはエネルギー代謝に中心的役割を果たすことから、その機能異常は加齢に伴う心身機能の低下を促進し、高齢期の adverse health outcomes のリスクを高める可能性が高い。

(2) 研究分担者の伊藤と藤田らは、ミトコンドリア病の細胞モデルを用いて診断マーカーの同定と治療法の開発を目指した研究を行ってきた。ミトコンドリア病はミトコンドリア・核 DNA の変異が原因となる難治性の先天性疾患であり、ミトコンドリアの機能異常によるエネルギー代謝異常により、主にエネルギー需要の高い脳、心臓、骨格筋で症状を呈する。伊藤・藤田らは、ミトコンドリア病のモデル細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、ミトコンドリア機能異常に伴い発現が増加した遺伝子の中から分泌タンパクを複数選定した。さらに、それらのタンパクの細胞培養液中濃度を ELISA 等により確認し、GDF15 (growth differentiation factor 15) 等複数のタンパクをミトコンドリア病の新規バイオマーカー候補として同定した。続いて、ミトコンドリア病患者で血中 GDF15 レベルが顕著に増加していることを確認し、GDF15 はミトコンドリア病の新規疾患マーカーさらにはミトコンドリア機能異常のマーカーとなりうる可能性を見出した。

一方、加齢とともにミトコンドリア DNA の体細胞変異が増加しミトコンドリア機能異常が起こる。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、心疾患、糖尿病など様々な老化関連疾患において、ミトコンドリア機能異常が重要な役割を果たしているとの報告が相次いでいる。したがって、ミトコンドリア機能異常を反映する新規バイオマーカーである GDF15 は、高齢期の重要な adverse health outcomes の予測因子である可能性がある。なお、GDF15 は、TGF- β サブファミリーメンバーに属する分泌タンパクである。

2. 研究の目的

(1) AlphaLISA による高感度な血清 GDF15 測定システムを確立する、

(2) これを用いて、研究代表者らが有する地域高齢者を対象とした縦断研究で保存された血清中の GDF15 を測定し、これと追跡期間中の総死亡との関連性を検討する。

以上から、高齢期の adverse health outcomes にミトコンドリア機能異常が関与しているとの仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) 化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ (Alpha : Amplified Luminescence Proximity Homogeneous

Assay : Perkin Elmer) では、ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が近接した状態の時に発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換し、それがドナービーズ周辺に拡散し近接しているアクセプタービーズに到達すると、ビーズ内の化学発光反応を引き起こす。

AlphaLISA 抗体をコートしたアクセプタービーズとビオチン化抗体およびストレプトアビジンドナービーズを用い、サンドイッチアッセイによりサンプル中の分子を検出する。AlphaLISA では、5 μ l 以下の血清で測定可能であり、感度が高い上に、洗浄ステップなしで混ぜるだけで実施できる。疫学研究においては、多検体かつ複数の指標を測定することが多く、本法は今後積極的に導入されるべき測定法である。本研究では、まず AlphaLISA による GDF15 測定システムを樹立する。

(2) 草津縦断研究 (群馬県草津町に在住する 65 歳以上の高齢者を対象とする縦断研究) において、2008 年 ~ 2013 年に毎年開催された高齢者健診を受診しすべてのデータの揃った 1,147 人および鳩山コホートスタディ (埼玉県鳩山町に在住する 65 歳以上高齢者 720 人を対象とするコホート研究) において、2010 年のベースライン調査を受診しすべてのデータの揃った 689 人、合計 1,836 人から採取され凍結保存 (-80) されていた血清を用いて、上述の AlphaLISA により GDF15 を測定した。

解析では、まず、血清 GDF15 濃度の関連要因を調べるために、性、年齢や既往歴 (高血圧、高脂質血症、脳卒中、心疾患、糖尿病、がん、関節炎、慢性閉塞性肺疾患) 身体・運動機能 (BMI、体組成、握力、通常歩行速度、開眼片足立ち時間) 炎症・腎機能マーカー (CRP、IL-6、 α 2 ミクログロブリン、シスタチン C) との関連を横断的に分析した。

次いで、対象者をそれぞれ 2014 年末まで最大 6.4 年間追跡し、追跡期間中の死亡例を特定した。ベースライン時の血清 GDF15 濃度と追跡期間中の死亡発生との関連性では、Cox 比例ハザードモデルを用いて、様々な交絡要因の影響を除き、GDF15 の独立した関連性を調べた。交絡要因に投入したのは、まず、人口統計学的変数 (性、年齢) の他、既知の死亡リスク (BMI、既往歴、収縮期血圧、GDS、MMSE、ヘモグロビン、アルブミン、握力) であり、次いで血清 GDF15 濃度と有意な関連性のあった炎症性マーカー (CRP、IL-6) を追加投入した。

4. 研究成果

(1) GDF15 市販抗体を購入し、AlphaLISA を

用いた GDF15 測定システムを樹立した。必要血清量は 5 μ L と僅かで、測定に係る所要時間は約 2 時間 30 分であった。直線性試験、添加回収試験、再現性試験、従来の ELISA による測定との相関性、いずれも極めて満足すべきものであった。

(2) 追跡対象者 1,836 人の平均年齢は 72.0 \pm 5.9 歳、性別では女性が 51%、GDF15 濃度の平均値は 828 \pm 438 (pg/mL) であった。血中 GDF15 濃度と既往歴との関連は、高血圧、高脂血症、がんで見られ、高血圧の既往あり、高脂血症の既往なし、がんの既往ありの方が、統計学的に高かった。炎症・腎機能マーカーと血中 GDF15 濃度との関連について重回帰分析を用いて年齢、性を調整して調べた。その結果、IL-6 および β 2-microglobulin や Cystatin-C と有意な相関性 (それぞれ $p=0.011$, $p<0.001$, $p<0.001$) を認めた。同様に、身体・運動機能と血中 GDF15 濃度との関連について、重回帰分析を用いて年齢、性を調整して調べた。その結果、握力、通常歩行速度、開眼片足立ち時間と有意な相関性 (それぞれ $p=0.001$, $p<0.001$, $p=0.034$) を認めた。

次に、本対象者を平均 4.7 年間追跡した結果、137 例の死亡発生があった (追跡者の 7.5%)。GDF15 濃度が 561pg/mL 以下の群 (第 1 四分位) に比べると、562-973pg/mL の群 (第 2 四分位 + 第 3 四分位) や 974 pg/mL 以上の群 (第 4 四分位) は、死亡のリスクが高かった。多変量調整済ハザード比は、それぞれ 1.36 (95%信頼区間: 0.71-2.59) と 2.11 (95%信頼区間: 1.09-4.07) であった。さらに、炎症性マーカーをモデルに追加投入しても、その関連性はほとんど変わらなかった。

以上、血清 GDF15 濃度は一般高齢者の総死亡の独立した予測要因であることから、高齢期の老化の過程にミトコンドリア機能異常が関与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Fujita Y, Taniguchi Y, Shinkai S, Tanaka M, Ito M. Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. *Geriatrics Gerontology International*, 査読有, 2016, 16 (Suppl. 1), 17-29.

Fujita Y, Ito M, Yatsuga S, Koga Y, Tanaka M. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial disease. *Mitochondrion*, 査読有, 2015, 20, 34-42. DOI: 10.1016/j.mito.2014.10.006

[学会発表] (計 5 件)

Shinkai S, Taniguchi Y, Kitamura A, Fujita Y, Tanaka M, Ito M. Serum concentration of GDF15 predict mortality in a general population of older Japanese. The 69th Annual Scientific Meeting of Gerontological Society of America (GSA), 2016.11.16-18, New Orleans (USA).

藤田泰典, 谷口優, 新開省二, 田中雅嗣, 伊藤雅史. 地域在住高齢者の血中 DF15 と負の健康アウトカムとの関連解析. 第 39 回日本基礎老化学会大会, 2016.5.27, 伊勢崎市民文化会館 (神奈川県・伊勢崎市).

藤田泰典, 伊藤雅史, 小島俊男, ハツ賀秀一, 古賀靖敏, 田中雅嗣. 網羅的遺伝子発現解析によるミトコンドリア病の新規バイオマーカーの同定. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会, 2014.12.3-5, 九州大学百年講堂 (福岡県・福岡市).

ハツ賀秀一, 石井亜紀子, 藤田泰典, 小島俊男, 伊藤雅史, 田中雅嗣, 角間辰之, 古賀靖敏. GDF-15&FGF-21; ミトコンドリア病の新規バイオマーカー. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会, 2014.12.3-5, 九州大学百年講堂 (福岡県・福岡市).

藤田泰典, 伊藤雅史, 小島俊男, ハツ賀秀一, 古賀靖敏, 田中雅嗣. ミトコンドリア機能異常を反映するバイオマーカーの探索. 第 37 回日本基礎老化学会大会, 2014.6.26-27, あいち健康プラザ (愛知県・大府市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

ミトコンドリア病で増加する血液中のたんぱく質を発見

http://www.tmg Hig.jp/J_TMIG/topics/topics_201505.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新開 省二 (SHINKAI, Shoji)

東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・副所長

研究者番号： 6 0 1 7 1 0 6 3

(2) 研究分担者

伊藤 雅史 (ITO, Masafumi)

東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号： 8 0 3 9 3 1 1 4

藤田 泰典 (FUJITA, Yasunori)

東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号： 3 0 5 1 5 8 8 8

(3) 連携研究者