

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26893258

研究課題名(和文) 脂質メタボロミクスによるアルコール起因性疾患バイオマーカー探索と予防医療への展開

研究課題名(英文) Lipidomic profiling reveals biomarkers for prevention of alcohol intake and alcohol-induced diseases

研究代表者

原田 成 (Harada, Sei)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10738090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：飲酒習慣は多彩な健康障害のリスク因子であり、適切な予防が求められているが、飲酒による健康影響の早期発見に役立つ血中物質はほとんど知られていない。そこで、本研究では、山形県鶴岡市に居住する1008名の血漿を用いて脂質メタボローム・プロファイリングを行なって、血中の232種類の脂質を網羅的に測定した。飲酒習慣により血中の脂質代謝の違いが明らかになり、特に予防に役立つバイオマーカーが特定できた。さらに、高飲酒者では遺伝子型によっても血中脂質は異なることが明らかになり、飲酒性疾患のオーダーメイド予防に脂質メタボロミクスが有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Daily alcohol intake is a risk factor of various diseases. Prevention in the early stage of alcohol-induced diseases is necessary, however, few blood biomarkers of alcohol intake and alcohol-induced diseases are known. In this study, we performed lipidomic profiling of 1008 plasma samples collected from residents in Tsuruoka City, identifying and quantifying 232 lipids. Lipidome were quite different by alcohol intake, and some biomarkers for prevention were found. Lipidome of heavy drinkers were also different by alcohol related genotype. This study suggests that lipidomic profiling is useful for personalized prevention of alcohol-induced diseases.

研究分野：メタボロミクス疫学

キーワード：メタボローム 疫学 遺伝子多型 個別化医療 アルコール 予防医学 リピドミクス

1. 研究開始当初の背景

アルコール摂取は身体的・精神的・社会的障害を含む幅広い健康障害の重要なリスク因子として知られている。世界保健機関の推計によると、DALY (disability-adjusted life-years: 障害調整生命年) 換算でアルコールは3番目に大きな健康リスクである

(2004年の年間推計DALYは、6,900万人年)。わが国においても、全DALYのうちアルコールの寄与は男性6.7%、女性1.3%と推計され、特に肝硬変、がん、心・脳血管疾患、精神神経障害において寄与が大きい。

アルコールに起因する健康障害の予防方法の第一は断酒および節酒であり、適切な対象に対して適切な介入を行うことが求められる。特に肝障害については、飲酒性脂肪肝から肝炎・肝線維症、肝硬変へと病態が進展するにつれ、断酒しても正常化しない不可逆な病態となるため、高リスク者を早期に発見し介入することが求められる。しかしながら、習慣的な高飲酒者における代謝変化を示すバイオマーカーや、アルコール起因性肝障害を早期に発見するバイオマーカーは十分明らかでない。習慣的飲酒による肝代謝変化をヒトの血液から特定し、病的変化をより早期に発見することが可能になれば、アルコール性肝疾患の予防に貢献できると期待される。心・脳血管疾患や糖尿病におけるアルコールの影響はより複雑である。J字カーブやU字カーブを示すとされるが、性別・年齢や、肥満度、血圧値、ALDH2の遺伝子型など様々な要因が生体内の代謝経路に影響を与えるために、適切なアルコール量は一意には定まらない。したがって、単に大きな集団の平均的な適量を示すのみならず、個人の代謝動態に基づいてその時点における適量を示すことができれば、発症を積極的に予防する観点から大きな意義がある。そのために、飲酒による心・脳血管疾患や糖尿病への進展を早期に発見するバイオマーカーが求められている。このような生活習慣と関連する疾患の新たなバイオマーカーを探索する手法として、血液メタボローム解析は最近めざましい成果を挙げつつある。生体内低分子化合物を網羅的・定量的に測定するこの手法は、環境要因と遺伝的要因によって影響される生体内の代謝動態変化を鋭敏に把握するために有用である。肝疾患については、メタボローム解析により測定された複数の血清バイオマーカーを組み合わせることで肝疾患の異なる病型を高い精度で分類できることが報告されている (Soga, T. et al. *J. Hepatol.* 55, 896-905 (2011))。糖尿病領域においては、フラミンガム研究の対象者の一部を用いたコホート内症例対照研究 (Wang, T. et al. *Nat. Med.* 17, 448-454 (2011)) において血液中のアミノ酸代謝物質が将来の糖尿病発症に関連することが明らかにされている。そうしたことから、アルコール摂取およびアルコール性疾患のバイオマーカー探索についても

血液メタボローム解析は非常に有用と考えられるが、これらについて検討した報告はまだなされていない。

そこで筆者は、大学院在学中に、山形県鶴岡市の地域コホートにおいてキャピラリー電気泳動質量分析 (CE/MS) 法により測定されたメタボローム解析の結果を用い、アルコール性肝障害とアミノ酸代謝および中心炭素代謝の関連を検討し、複数の代謝物が習慣的飲酒ならびにアルコール性肝障害の有望なバイオマーカーであることを見出した (学会発表済、投稿 revise 中)。さらに、同様の手法を用いてアルコール性高血圧のバイオマーカーも明らかにしつつある (投稿準備中)。

習慣的飲酒に起因する肝障害ならびに心・脳血管疾患や糖尿病の発症・進展には、CE/MS法が得意とするアミノ酸関連代謝物質および中心炭素代謝物質に加えて、脂肪酸をはじめとする脂質代謝の重要性が示唆されている。したがって、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS/MS) 法を使用して生理活性の高い脂質代謝物を網羅的に測定することで、飲酒性疾患の代謝動態理解およびバイオマーカー探索を一層進展させ、CE/MS法で得た知見と組み合わせることでより精度の高い予測モデルの構築が可能になると考えられる。そこで、CE/MS法によるメタボローム解析が完了している地域在住コホートの保存血漿を活用して、生理活性の高い脂質群を網羅的に測定し、アルコール性疾患と関連する新規バイオマーカーを探索する本研究を着想した。さらに、アルコール代謝関連 SNP のタイピングを実施することにより、遺伝的な代謝の差異による脂質メタボロームの違いを検討することとした。

2. 研究の目的

(1) 「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究」で CE/MS 法によるメタボローム測定が 3000 名以上について完了している。本研究では、その対象者の一部について血漿脂質メタボローム解析を LC/MS/MS 法により行い、アルコール摂取量および頻度と 150 種以上の脂質代謝物質群との関連性を検討し、習慣的飲酒による脂質代謝への影響を明らかにする。

(2) さらに習慣的飲酒に起因する脂質代謝変化とアルコール起因性疾患との関連を検討する。病的変化と脂質メタボロームの関連を検討することで、アルコール起因性疾患を早期に把握しうる脂質バイオマーカーを明らかにする。

(3) 脂質バイオマーカーを、既に測定済のアミノ酸代謝および中心炭素代謝バイオマーカーと組み合わせることで、より精度の高いアルコール性疾患予測モデルを構築する。

(4) 対象者のアルコール代謝関連 SNP のタイピングを実施し、遺伝的な代謝の差異による脂質メタボロームの違いを明らかにし、遺伝因子ごとにアルコール性疾患の予測モデ

ルを構築することで、個別的予防医療に役立つ。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者の選定

「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究」は、山形県鶴岡市民を対象としたコホート研究である。平成24年度～26年度までのベースライン期間のうち、約2カ年半が経過した平成26年8月31日時点で参加同意者が8800名であった。そのうち、CE/MS法によるメタボローム測定が完了し、データ解析に必要な情報がすべて揃っている参加者（約3200名）から、1008名を選定してLC/MS/MSによる脂質メタボローム解析を行った。

(2) 脂質メタボローム解析

脂質メタボローム解析は、 -80°C で凍結保存している血漿検体を用い、山形県鶴岡市にある慶應義塾大学先端生命科学研究所においてLC/MS/MS法を用いて網羅的に行い、脂質メタボローム・プロファイルを作成した。脂質メタボローム解析にあたっては、慶應義塾大学先端生命科学研究所の研究協力者（石川貴正）の協力を得た。

脂肪酸類、アラキドン酸類、DHA類、アシルカルニチン類、リゾリン脂質類、ステロイド、スフィンゴ脂質類など、232種の代謝物の同定、定量を行った。

(3) その他のデータ収集

他の必要なデータは既にすべてコホート研究のベースライン調査において収集済のデータを使用した。飲酒量および頻度など、データ解析に必要な情報は、コホート研究のベースライン調査で収集された質問票のデータを用いた。

(4) SNP ジェノタイピング

SNP ジェノタイピングは、愛知がんセンター研究所疫学・予防部（部長 田中英夫）が研究協力機関として実施をした。

CE/MS法およびLC/MS/MS法の双方のメタボローム測定がなされた1008検体について、バイオコートからDNAを抽出し、飲酒関連のSNPとして、

ALDH2 (rs671)

ADH3 (rs698)

ADH2 (rs1229984)

のジェノタイピングを実施した。

(5) 統計学的解析

本研究では、以下のような統計学的解析を行った。

① 飲酒量による脂質メタボロームの違いを明らかにするための多変量解析（例：脂質代謝プロファイルを用いた、高飲酒者と非飲酒者のPLS判別分析）

② ①の脂質メタボロームに、アミノ酸代謝

および中心炭素代謝バイオマーカーを加えて網羅性を高めた多変量解析

③ 高飲酒者における、遺伝子多型による脂質代謝プロファイルの違いを明らかにするための多変量解析（例：脂質代謝プロファイルを用いた、ALDH2(rs671)のAA群、AG群、GG群のPLS判別分析）

4. 研究成果

(1) 大規模疫学研究における脂質メタボローム解析手法の確立

1000名を超えるような大規模疫学研究において、本研究のように生理活性の強い脂質代謝物質群（脂肪酸類、アラキドン酸類、DHA類、アシルカルニチン類、リゾリン脂質類、ステロイド、スフィンゴ脂質類など）を網羅的に測定した研究は、国際的にも他に類を見ない。

本研究においては、232物質の同定・定量を行うことに成功し、うち186物質が10%以上の検体において検出され、129物質が90%以上の検体で検出された。

図1に示すように、一部の物質ではバッチ間変動が認められた。特にLactosylCeramide類とCeramide1P類においてはバッチ間の測定値差が認められており、今後さらなる検討と精度の向上が必要である。しかし、他の物質については、概ね測定精度は安定しており、疫学研究において使用するのに十分なレベルであることが確認された。

今後、本手法を用いて、生理活性が強く健康に影響を与える脂質代謝物質群を測定する疫学研究を進展させ、代謝メカニズムに基づいた健康エビデンスの確立に大きく寄与できることが期待される。

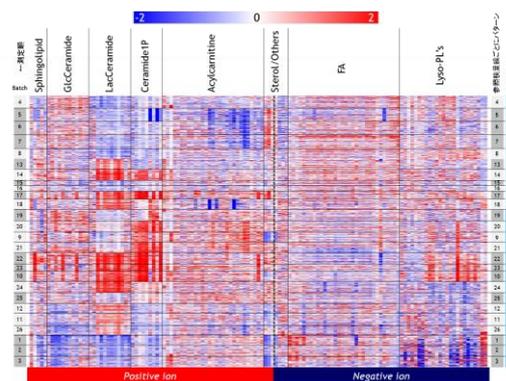


図1:脂質メタボローム解析における測定値のバッチ間変動

(2) 飲酒習慣による脂質代謝プロファイルおよび、アルコール起因性疾患との関連
Lactosylceramide類とGlucosylceramide類をはじめ、広範な脂質代謝物質において、飲酒習慣との関連が認められた。

男性において、高飲酒群（エタノール40g/day以上）と非飲酒群の脂質代謝プロフ

ファイルを、PLS 判別分析を用いて比較した結果、図2のような結果が得られ、高飲酒群(緑)と非飲酒群(赤)では、脂質代謝プロファイルが明らかに異なることが示された。判別分析のモデルの当てはまりは、 $R^2=0.44$ $Q^2=0.26$ と、比較的良好であった。

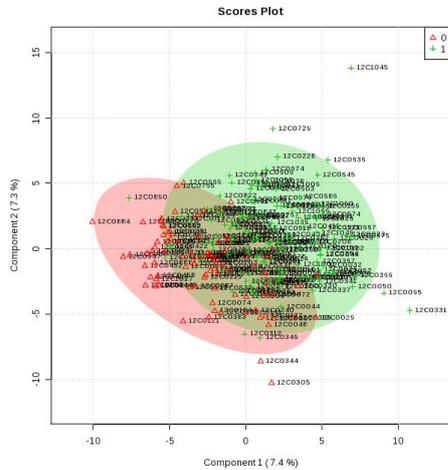


図2 高飲酒群と非飲酒群の脂質代謝プロファイルを用いた PLS 判別分析 (赤=非飲酒群、緑=高飲酒群)

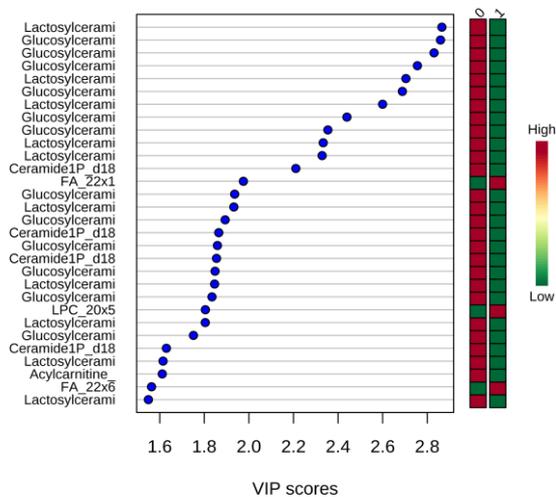


図3 高飲酒群と非飲酒群の判別に特に寄与の大きな物質

高飲酒群と非飲酒群の判別に寄与する脂質を検討した結果、高飲酒群では、非飲酒群に比べて、Lactosylceramide 類と Glutosylceramide 類の広範な物質が低い血漿濃度を示し、有用なバイオマーカー候補と考えられた。Lactosylceramide 類はバッチ間変動の大きな物質であるが、バッチによる調整を行なっても、飲酒量との関係が認められた。

飲酒習慣と脂質メタボロームの関連を示

した研究は少なく、国際的にも知るかぎり 1 報 (Jaremek M. et al. Transl Psychiatry. 3, e276 (2013))のみである。したがって、本研究は飲酒習慣による脂質メタボロームへの影響を示した貴重な研究であるとともに、先行研究では測定されていない生理活性の強い脂質群のプロファイルを明らかにしており、より生体への影響の強いバイオマーカー候補を示した点で重要である。

今後、さらに測定を進めてサンプルサイズを大きくし、飲酒による脂質代謝変化とアルコール性疾患の関係の検討を進めていく。

(3) アミノ酸代謝および中心炭素代謝バイオマーカーと組み合わせによるモデル構築

(2) で示した解析について、CE-MS により測定済のアミノ酸代謝および中心炭素代謝バイオマーカーと組み合わせでモデルを構築した結果、 $R^2=0.80$ $Q^2=0.41$ と、モデルの当てはまりおよび信頼性が大きく向上し、良好なモデルを構築することができた。

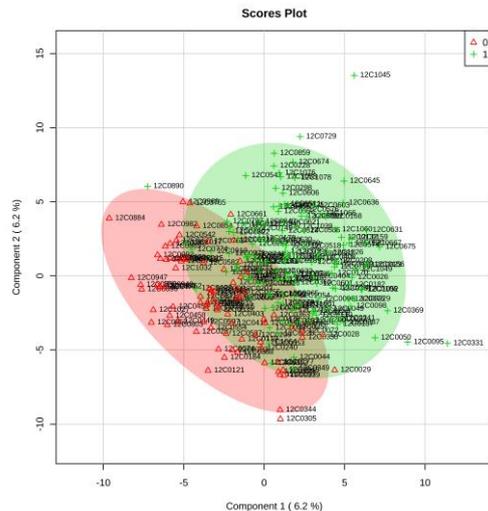


図4 高飲酒群と非飲酒群の全代謝プロファイルを用いた PLS 判別分析 (赤=非飲酒群、緑=高飲酒群)

アミノ酸代謝および中心炭素代謝バイオマーカーでは、アミノ酸代謝に属する 2 物質が特に大きく判別に寄与していた。

この結果は、飲酒によるメタボロームプロファイリングについて、単一の手法のみではなく、複数の手法を組み合わせることで物質の網羅性を高めることで、メカニズムの理解が深まるとともに、有用なバイオマーカーの探索に資することを示唆した。

今後、飲酒およびアルコール性疾患における検討をさらに進めるとともに、他の生活習慣ならびにそれに関連する疾患においても同様の手法を用いることで、これまでの疫学ではブラックボックスであった代謝動態を詳しくすることが可能になる。

