

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18462

研究課題名（和文）フレイル予防を目指した精神疾患の非侵襲性定量検査法の開発

研究課題名（英文）Development of non-invasive quantitative system for psychiatric disorders for the prevention of frailty

研究代表者

加藤 啓子（KEIKO, KATO）

京都産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：90252684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：申請前に、東京都板橋区内に在住の66歳以上の男女を対象におこなったコホート調査に参加し採尿していた。この尿中の揮発性有機化合物VOCsから、うつ候補VOCs(バイオマーカー)を抽出し、評価系を構築した。尿中の3VOCs群と2VOCs群は、共に偽陰性のない、正確さ83.3%と94.4%の高齢者うつのバイオマーカーであった。3VOCs群の計測結果は、既存のうつ症状評価尺度と高い相関を示し、2VOCs群は、高齢者の心身の健康状態の指標である、基本チェックリストと高い相関を示した。これまで客観的数値で判定することのできなかった、高齢者のうつを、計量機器により正確に検出することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、フレイルへの進行を素早く検知するためのシステムを構築するため、今後も引き続き、サルコペニアや認知症等のフレイル評価に、本システムの応用を目指している。高齢者に負担をかけることなく、うつ、不安症の初期症状を容易に診断できる本法の開発は、うつ、不安症の早期治療、フレイルへの移行を予防すると共に、高齢者の生活の質保証を担保し、「健康寿命」を叶える。一方で、我々は、モデルマウスを用いて、側頭葉てんかんや、うつ不安症のバイオマーカーを見つけ、代謝負荷と精神疾患との関連性について研究を進めており、ヒトの共存症の発症メカニズムの解明への足掛かりを提供している。

研究成果の概要（英文）：Prior to the present application, we had participated in cohort study (2015 OTASHA KENSHIN) of male and female aged more than 66 years old and collected their urine. Among urinary volatile organic compounds (VOCs), candidate VOCs (urinary biomarkers) for depression were extracted and an evaluation system was constructed. Both 3VOCs and 2VOCs groups were urinary biomarkers in elderly with 83.3% and 94.4% accuracy without false negatives. The 3 VOCs and 2 VOCs groups were correlated highly with the GRID-Hamilton Rating Scale for depression (HAMD) and the Kihon checklist for assessing progress of frailty, respectively. Taken together, it proposes detection system with numerical values for screening elder depression accurately.

研究分野：実験動物学，生化学，神経科学

キーワード：高齢者 うつ 尿 揮発性有機化合物 代謝 精神疾患 ガスクロマトグラフ質量分析計

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年度お達者検診にて、東京都板橋区内に在住の女性(374名)と男性(265名)を対象にコホート調査を実施し、尿を収集した。年齢は66歳~88歳であった。健診者の中から9名のうつ病患者(一部広場恐怖を含む)と9名のコントロールを選び、尿中の揮発性有機化合物をガスクロマトグラフィー・質量分析計(GC-MS, 島津製作所)で分析していた。各揮発性有機化合物を構成するイオンピーク(m/z)の中から、主となるイオンピークを抽出し、その面積を計測することで、既知の濃度からなる標準品のイオンピークとの比較により、尿中の含有量を算出していた。結果、高齢者のうつ病に関連する5種の候補揮発性有機化合物(VOC)を検出し、標準品の保持時間とイオンピークの比較により、物質の特定に成功していた。しかしながら、研究開始当初は、候補物質の解析に全く着手していなかった。また、うつ病と尿中揮発性有機化合物との関連性も見出せておらず、発見した尿中揮発性有機化合物がどのような代謝経路で産生されたのかも考察できていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非侵襲である尿をGC-MSで計測することで、高齢者のうつ、不安症の有無や重症度を客観的数値で評価する診断法を確立することである。高齢者は、加齢に伴い生理機能が低下すると、身体機能の低下が生じる。この身体機能の低下が進行すると、健康と要介護の中間の状態であるフレイルに移行する。このフレイルへの移行にうつや不安症が強く影響することが知られている。それゆえ、うつ、不安症の初期症状を見つけ出し予防することが、フレイルへの移行を食い止めたり、フレイルの患者に潜在している疾患を治療に導くことができる。身体医学で用いる定量的な計量機器による検査は、高齢者のうつ、不安症等の初期症状を容易に抽出し、予防に導くと予想できるが、これまで定量的な客観的数値によるうつ、不安症の診断方法は一切なかった。それゆえ、本申請で確立する定量検査法は挑戦的研究としての意義が格段に大きい。さらに本申請は、加齢に伴う代謝の変化が直接、精神現象や心理事象の変化に影響することを示す初めての事例であり、従来扱われてこなかった新たな研究分野の開拓につながる点も、挑戦的研究として意義深い点であった。

3. 研究の方法

(1) 固相マイクロ抽出法により、尿中の揮発性有機化合物を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析器により物質を予測し、標準品の質量と比較することで、物質の特定を試みた。

尿は氷上において、2mL ガラスバイアル中に200 μ Lずつに分注した後封印し、65 $^{\circ}$ Cで15分間処理した。次いで、18人の尿サンプル(患者9名分、健常者9名分)について、バイアル内のヘッドスペース中のVOCをSPME繊維により45 $^{\circ}$ Cで60分間抽出した。

次に、VOCを含むSPME繊維をGCの注入口に挿入し、240 $^{\circ}$ Cにて30分間脱着させた。GC-MS装置には30メートルのHR-20Mカラム(カラム内直径0.32mm、フィルム厚さ0.5 μ m(信和化工株式会社製))を使用した。質量分析装置の前に用いたクロマトグラフィー分析条件は、次の通りであった。40 $^{\circ}$ Cにて10分間保持し、1分間あたり5 $^{\circ}$ Cの昇温条件で240 $^{\circ}$ Cまで熱を掛けた後、240 $^{\circ}$ Cにて10分間保持した。ヘリウムガスを60cm/秒の定速で流した。質量分析装置の処理パラメータは次の通りであった。イオン源温度200 $^{\circ}$ C、インターフェース温度240 $^{\circ}$ C、イオン化エネルギー70eV、スキャン頻度は35m/z~300m/zまでを1回あたり0.2秒とした。ピークの特定は、NIST14

標準参照データベース (NIST / EPA / NIH マス・スペクトル・ライブラリ (Wiley10)) を用いて、標品の保持時間との比較により確認した。

(2) うつ病と尿中揮発性有機化合物との関連性も見出すためには、解析方法を工夫する必要があった。本研究では、判別解析、結合インデックスを用いた ROC 解析、Pearson の 2 変量相関解析を行った。

(3) 発見した高齢者うつバイオマーカーである尿中揮発性有機化合物が、どのような代謝経路で産生されたのかを知るため、側頭葉てんかんモデルマウス (藤田ら, *Scientific Reports* 9:10586, 2019) と、鬱不安症モデルマウス (藤田ら, *PLOS ONE* 15:e0229269, 2020) の尿中の揮発性有機化合物から、それぞれバイオマーカーを特定し、マウスの代謝からヒトの代謝変化を考察した。

4. 研究成果

(1) ヒト尿中におけるうつ、不安症バイオマーカーの発見【特願 2017-209262】

2015 年度お達者検診 (地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター、大淵修一氏代表) にて、東京都板橋区内に在住の女性 (374 名) と男性 (265 名) を対象にコホート調査を実施し、尿を収集した。年齢は 66 歳 ~ 88 歳であった。健診者の中から 9 名の大うつ病罹患患者 (一部広場恐怖を含む) と 9 名のコントロールを選び、尿中の揮発性有機化合物をガスクロマトグラフィー・質量分析計で分析した。結果、高齢者のうつ病に関連する 5 種の候補揮発性有機化合物 (VOC) を検出し、標準品の保持時間とイオンピークの比較により、物質の特定に成功した (表 1)。

表 1. 大うつ病 (空間恐怖を含む) 罹患の有無間の揮発性有機化合物 (VOC) 量の比較

NO	VOCs	CAS NO.	クラス	倍率 (罹患患者 / 正常者)	両側 (片側) 検定 (p)
1	Dimethyl sulfone	67-71-0	Sulfones	2.0	0.0770 (0.0385)
2	Phenethyl isothiocyanate	2257-09-2	Benzene	11.3	0.0078
3	Hexanoic acid	142-62-1	Fatty acids	0.7	0.0106
4	Texanol	25265-77-4	Hydrocarbon	1.2	< 0.0001
5	Texanol isomer	6846-50-0	Hydrocarbon	1.2	0.004

検定はマンウイットニー U-テストを使用。

Dimethyl sulfone は、methanthiol から生合成されることが知られている。Phenethyl isothiocyanate は cysteine と結合し、硫化水素ドナーとして作用することが知られている。Dimethyl sulfone と Phenethyl isothiocyanate が共に、てんかんモデルにおいて、尿中への排泄が低下した代謝経路を高齢者うつでは亢進することを示す。

腸内細菌は、Hexanoic acid から、2-pentanone を産生することが知られている (14)。てんかんマウス尿中 2-pentanone の亢進に対して、高齢者うつでは Hexanoic acid が低下を示したことから、てんかんとうつ間で相反する相関性を見つけた。

(2) うつ病と尿中揮発性有機化合物との関連性

受信者動作特性曲線 (Receiver Operating Characteristic (ROC)) 分析を行った結果、N01 ~ N03 (Dimethyl sulfone, Phenethyl isothiocyanate, Hexanoic acid) を合わせた ROC 曲線による評価は、正確さ 94.4%、感度 100%、特異度 66.7%、AUC 面積 91.4% と、バイオマーカーとして著しく高い評価であった。また、GRID ハミルトンうつ病評価尺度 21 項目 (GRID-HAMD) を縦軸に、N01 ~ N03 結合インデックス (SSPS を用いて線形回帰解析により得た「標準化されていない予測値」) を横軸に、グラフを記載した結果、Pearson r 値は 0.84 ($p = 0.047$) となり、既存のうつ症状評価尺度と高い相関を示した (図 1A)。このことは、N01 ~ N03 の尿中化合物は、うつ病の判定に十分利用できることを示す。

次に、N04～N05 を合わせた ROC 曲線による評価は、正確さ 94.4%、感度 100%、特異度 88.9%、AUC 面積 98.8%と、バイオマーカーとして著しく高い評価であった。一方、高齢者を対象とした基本チェックリストスコア 25 項目（高齢者のフレイルの進展を評価するための標準的コホート項目）を縦軸に、N04～N05 結合インデックスを横軸にグラフを記載した結果、Pearson r 値は 0.66 ($p = 0.014$)となり、また、高齢者を対象とした自記式うつ病スケール基本チェックリストスコア 5 項目を縦軸に、N04～N05 結合インデックスを横軸にグラフを記載した結果、Pearson r 値は 0.69 ($p = 0.008$)となった(図 1B)。このことは、texanol が、フレイル評価に利用できることを示す。

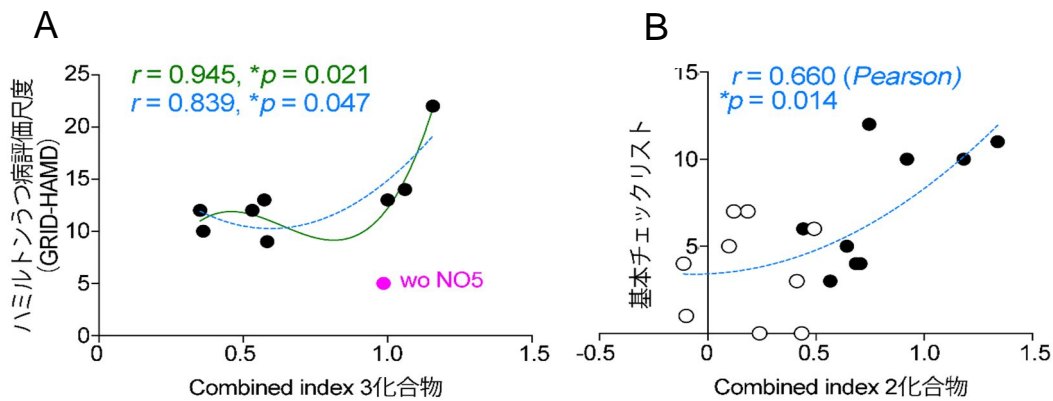


図 1. VOCs 結合インデックスとコホート調査との関連性評価

A. 縦軸，GRID ハミルトンうつ病評価尺度 21 項目 (GRID-HAMD)；横軸，N01～N03 VOCs 結合インデックス (SSPS を用いて線形回帰解析により得た「標準化されていない予測値」)。二次関数 (青)，三次関数 (緑)，N05 は，空間恐怖症患者でうつは発症していない (赤)。GRID ハミルトンうつ病評価尺度は，うつ陽性の疑いのある人にも行われる検査である。B. 縦軸，高齢者を対象とした基本チェックリストスコア 25 項目 (高齢者のフレイルの進展を評価するための標準的コホート項目)；横軸，N04～N05 VOCs 結合インデックス。

(3) 高齢者うつバイオマーカーである尿中揮発性有機化合物の生成に関わる代謝経路の推定

Texanol isomer (N05)は，うつ，不安症モデルマウスにおいても，加齢に伴い，ヒトと同様に尿中量を亢進した(表 2)。ことから，Texanol isomer (N05)は，ヒト，マウス共通の加齢に伴う，うつ病の検出バイオマーカーとして有効であることを示した。

表 2. うつ，不安症モデルマウス (St3gal4-K0, $n = 6$)と健康なマウス(同腹子野生型, $n = 6$)間の揮発性有機化合物 (VOCs) 量の比較

NO	VOCs	CAS NO.	クラス	10-16 週令オス		23-35 週令オス	
				倍率 (ko/wt)	両側検定 (p)	倍率 (ko/wt)	両側検定 (p)
1	Trimethylamine	75-50-3	Amine	0.93	>0.9990	0.47	0.0022
2	3-Penten, 2-one	625-33-2	Ketone	1.07	0.9307	0.76	0.0476
3	Benzaldehyde	100-52-7	Benzene	2.1	0.0087	2.8	0.0022
4	Texanol	25265-77-4	Hydrocarbon	1.4	0.3290	1.3	0.3636
5	Texanol isomer	6846-50-0	Hydrocarbon	1.4	0.1775	1.3	0.0476

検定はマンウイットニー U -テストを使用。

Trimethylamine は，腸内細菌により，フォスファチジルコリンから産生される(10)。加齢後のうつ，不安症モデルとてんかんモデル共に，尿中 trimethylamine 量が減少している。Benzaldehyde も腸内細菌により，phenylalanine から phenyl pyruvic acid を介して産生される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujita, A., Okuno, T., Oda, M., Kato, K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Urinary volatilome analysis in a mouse model of anxiety and depression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0229269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujita A, Ota M, and Kato K	4. 巻 9
2. 論文標題 Urinary volatile metabolites of amygdala-kindled mice reveal novel biomarkers associated with temporal lobe epilepsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46373-8 4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiko Kato
2. 発表標題 Neuropsychiatric disorders induced by metabolic loading and sialylation
3. 学会等名 Joint International symposium of korean society of life science and interdisciplinary society of genetic & genomic medicine: Life Science & genetic medicine from bench to clinic（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 啓子, 太田 真菜美, 藤田 明子
2. 発表標題 側頭葉てんかん新規バイオマーカーの提案 Profiling of urinary volatile metabolites in amygdala-kindled mice and finding of novel biomarkers associated with temporal lobe epilepsy
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tangsudjai Siriporn, Fujita Akiko, Ikawa Masahito, Kato Keiko
2. 発表標題 Distributions of epilepsy/ anxiety responsive, alpha2,3-sialyltransferase ST3Gal IV mRNA and visualization of mCherry in CRISPER/CAS mediated mCherry knock-in at St3gal4 locus of mouse
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 利川 泰博, 太田 真菜美, 藤田 明子, 加藤 啓子
2. 発表標題 側頭葉てんかんモデルマウスにおける代謝変化 Alteration of metabolism in temporal lobe epilepsy model mice
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 明子, 奥野 貴也, 織田 美伽, 加藤 啓子
2. 発表標題 うつ・不安症を示すST3Gal IV欠損マウスにおける尿中揮発性有機化合物の解析 Comparative analysis of urinary volatile organic compounds in Depression / Anxiety model animal ST3Gal IV KO mice
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田明子, 奥野貴哉, Siriporn Tangsdjai, 織田弥伽, 伊川正人, 加藤啓子
2. 発表標題 てんかん~うつ・不安障害に至る分子発症メカニズムの解明
3. 学会等名 【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤啓子, 太田知沙, 廣田暖奈, 藤田明子
2. 発表標題 シアル酸転移酵素ST3Gal IV欠損マウスの統合失調症陰性症状について
3. 学会等名 第161回獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤啓子
2. 発表標題 マウスうつによる環境, 医薬, 食品のスクリーニング
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン(国際展示場)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥野貴哉, 藤田明子, 織田弥伽, Paitoon Srimontri, 加藤啓子
2. 発表標題 シアル酸転移酵素ST3Gal4欠損・オスマウスにおける生殖行動と代謝産物の関連性
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マウスのでんかんバイオマーカー	発明者 加藤啓子, 藤田明子	権利者 京都産業大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-233113	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

京都産業大学 生命科学部 加藤啓子
<http://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/1s/kato-keiko.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大淵 修一 (OBUCHI Shuichi) (50265740)	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・研究部長 (82674)	
研究分担者	田中 雅嗣 (TANAKA Masaya) (60155166)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授 (32620)	
研究分担者	黒坂 光 (KUROSAKA Akira) (90186536)	京都産業大学・生命科学部・教授 (34304)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関