

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659364

研究課題名（和文） 分子修飾  $\beta_2$  ミクログロブリンの臨床疫学的意義の解明研究課題名（英文） Clinico-epidemiological relevance of serum oxygenated  $\beta_2$ -microglobulin

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・研究部長

研究者番号：60171063

研究成果の概要（和文）：本研究は、高齢者の血清中にのみ検出された酸素添加  $\beta_2$  ミクログロブリン ( $\beta_2$ -M) の臨床疫学的意義を解明することを目標とした。酸素添加  $\beta_2$ -M の測定法が確立する以前に担当研究者が転出し、別の角度から変性  $\beta_2$ -M の測定法の開発に取り組んでいる研究者との共同研究を模索したが、実現しなかった。そこで、現在の手技で測定される血清  $\beta_2$ -M の臨床疫学的意義をさらに詳しく調べた結果、血清  $\beta_2$ -M 濃度は循環器疾患のうち脳卒中死亡との関連が極めて強く、脳卒中の新たな危険因子であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to examine the clinico-epidemiologic relevance of serum oxygenated  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -M) found in sera only from older adults. The method for detecting oxygenated  $\beta_2$ -M with mass-spectrophotometry was not stable and we finally abandoned further to develop the method. Instead, we examined further the role of serum total  $\beta_2$ -M for predicting cardiovascular mortality and found that serum  $\beta_2$ -M is a novel risk marker for stroke mortality but not for heart disease mortality in a general population of older adults.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学

キーワード：血清  $\beta_2$  ミクログロブリン、分子修飾、臨床疫学的意義、高齢者

## 1. 研究開始当初の背景

$\beta_2$  ミクログロブリン ( $\beta_2$ -M) は主要組織適合抗原クラス I の L 鎖であり、体内の有核細胞の膜上に広く分布しており、常時一定量が血中を循環している。低分子量 (MW 11,800) のため 95% が腎糸球体で濾過され、尿細管で 99.9% が再吸収され異化される。臨床的には排出量が減少する慢性腎疾患患者の腎機能指標として、また、産生が亢進する多発性骨髄腫やリンパ腫の予後指標として用いられている。しかし、一般地域集団に

おいて血清  $\beta_2$ -M が軽度から中等度高いことの臨床疫学的意義についてはよくわかっていない。

われわれは、一般高齢者集団を長期にわたって追跡した疫学研究により、世界で初めて血清  $\beta_2$ -M が極めて強い余命および循環器疾患死亡の予測因子であることを報告した (Arch Intern Med 2008; 168:200-206)。また、その予測力は腎機能指標 (cystatin C、推定 GFR、尿たんぱく) や炎症性指標 (WBC、高感度 CRP、IL-6、TNF- $\alpha$ ) を調整してもほ

とんど変わらなかったことから、血清  $\beta_2$ -M は腎機能や炎症以外のメカニズムを介して負の健康関連アウトカムに影響していると考えられた。

そこでわれわれは第三の機序、すなわち  $\beta_2$ -M がアミロイドを形成しやすい分子 (A $\beta$ M precursor) であるとの知見 (N Engl J Med 2003;349:583-596) を踏まえ、 $\beta_2$ -M が何らかの変性を受けて体内で toxic な影響を及ぼすという仮説「変性  $\beta_2$ -M 仮説」を提唱した。加齢とともに  $\beta_2$ -M は酸化的ストレスを受けて変性し、これがアミロイド形成に関与し、高齢者の負の健康関連アウトカムのリスクを増大するのではないかと。

この仮説を検証すべく、若年者と高齢者の血清サンプルから  $\beta_2$ -M を精製し、これを質量分析法で調べたところ、若年者サンプルでは全く検出されなかったが、高齢者サンプルすべてにおいて通常の  $\beta_2$ -M 分子に加え、分子量が 16Da 重い  $\beta_2$ -M 分子が検出された。すなわち、高齢者の血清  $\beta_2$ -M の一部は酸素添加されていることを発見した。

## 2. 研究の目的

以上の経過を踏まえ、本研究ではこの酸素添加された  $\beta_2$ -M の臨床疫学的意義を明らかにし、「変性  $\beta_2$ -M 仮説」を検証することを目標に挙げた。第一段階として、酸素添加  $\beta_2$ -M の検出法を改良し、安定したスペクトラムが得られるようにすること、第二段階としてこの改良法を用いて、酸素添加  $\beta_2$ -M の有無またはその濃度と 3 大死因別死亡との関連をコホート内症例対照研究により調べることであった。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子修飾 $\beta_2$ -M 検出法の改良

これまでに開発した分子修飾  $\beta_2$ -M の検出法は以下の通り。『抗ヒト  $\beta_2$ -M 抗体固定化ビーズの作成→抗体アフィニティーによる血清中の  $\beta_2$ -M の吸着濃縮→二次元電気泳動法による  $\beta_2$ -M の分離、比較→質量分析法による  $\beta_2$ -M の構造解析』。この方法において、サンプルの採血後および精製後の保存法による影響の検討と再現性の向上を図る。

### (2) 3 大死因別死亡との関連

対象は、東京都健康長寿医療センター研究所の長期縦断研究 TMIG-LISA の初回調査を受け、解析に必要なデータがすべてそろった 1,140 名 (すべて 65 歳以上の高齢者) である。このうち追跡 8 年間で 226 名の死亡例があり、死亡統計の二次利用申請の許可を得た上でそれら死因を特定し、悪性新生物、循環器疾患、その他に 3 分類する。その上で、各死因別死亡を症例群とし、症例に対して性、年齢、調査地域をマッチさせた対照群の 2 群を設定し、保存血清 (-80°C 保存) 中の酸素

添加  $\beta_2$ -M の有無およびその濃度を調べる。

## 4. 研究成果

(平成 23 年度)

改良した方法を用いて、性、年齢階級部の酸素添加  $\beta_2$ -M の出現頻度を調べるため、平成 15 年 N 県 Y 町で実施された基本健康診査を受診した年齢 20~90 歳の 1,401 人から層化無作為抽出された 134 人の検体から  $\beta_2$ -M の精製を進めていった。30 検体の精製が終了した時点で (その間、精製物は冷凍保存) 質量分析にかけたところ、スペクトラムのほとんどが年齢に関わらず一峰性であり、明瞭に二峰性を示すものはなかった。そこでサンプルの採血後および精製後の保存条件による影響があるのではないかと考え、その検討を行っていたところ、質量分析法を担当していた研究者が転出したため、研究体制を組み直し残された課題に挑戦することにした。

(平成 24 年度)

(1) 血清中の変性  $\beta_2$ -M の検出法は、その他のアプローチもある。例えば、透析アミロイドーシスでは重合体を形成する。一方、アミロイドーシス未発症者では重合はあまり進んでいない。重合を形成するかどうかは、血中  $\beta_2$ -M 濃度の高低に必ずしも依存しない。重合体を形成するには  $\beta_2$ -M が何らかの変性を受ける必要があると考えられ、変性  $\beta_2$ -M の構造解析と測定法の開発が急務である。そうした関連から、変性  $\beta_2$ -M の測定法の開発に取り組んでいる研究者と共同研究を行い、分子修飾  $\beta_2$ -M の測定法の確立に行かすべく協議したが、実現しなかった。

(2) そこで変性  $\beta_2$ -M の臨床疫学的意義の解明は将来の課題として残し、現在の手法で測定される血清  $\beta_2$ -M 濃度の臨床疫学的意義のさらなる解明を目指した。TMIG-LISA の中で、すべてのデータが揃った 1,023 人を 10 年間追跡し、総死亡 303 例 [がん 74、循環器疾患 115 (うち脳卒中 57、心疾患 55、大動脈疾患 3)、その他 102 例、不明 12] を特定した。ベースライン時の血清  $\beta_2$ -M 濃度により三分位に分け、どの疾患死亡との関連が強いかを調べたところ、 $\beta_2$ -M の下位三分位 (濃度が最も低い) に比べた上位三分位 (濃度が最も高い) の多変量調整済リスク比は、がんが 1.27 (95%信頼区間: 0.59-2.76)、循環器疾患が 3.31 (1.62-6.76)、その他が 3.16 (1.62-6.17) であり、循環器疾患との関連が強かった。うち脳卒中とは 4.58 (1.59-13.2)、心疾患とは 2.02 (0.74-5.51) であり、脳卒中死亡との関連が極めて強いことがわかった。血清  $\beta_2$ -M は脳卒中の新たなリスクマーカーである。

## 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 8 件)

(1) Shinkai S, Toba M, Saito T, Sato I, Tsubouchi M, Taira K, Kakumoto K, Inamatsu T, Yoshida H, Fujiwara Y, Fukaya T, Matsumoto T, Tateda K, Yamaguchi K, Nohda N, Kohno S : Immunoprotective effects of oral intake of heat-killed Lactobacillus Pentosus strain b240 in elderly adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition* 2013; 109: 1856-1865. doi: 10.1017/S0007114512003753

(2) 新開省二, 渡辺直紀, 吉田裕人, 藤原佳典, 西真理子, 深谷太郎, 李相侖, 金美芝, 小川貴志子, 村山洋史, 谷口優, 清水由美子: 『介護予防チェックリスト』の虚弱指標としての妥当性の検証. *日本公衆衛生雑誌* 2013; 60: 262-274.

(3) Taniguchi Y, Yoshida H, Fujiwara Y, Motohashi Y, Shinkai S : A prospective study of gait performance and subsequent cognitive decline in a general population of older Japanese. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; 67: 796-803. doi: 10.1093/gerona/qlr243

(4) Murayama H, Nishi M, Shimizu Y, Kim M-J, Yoshida H, Amano H, Fujiwara Y, Shinkai S : The Hatoyama Cohort Study: Design and profile of participants at baseline. *J Epidemiol* 2012; 22: 551-558. doi: 10.2188/jea.JE20120015

(5) 吉田裕人, 西真理子, 渡辺直紀, 藤原佳典, 深谷太郎, 小川貴志子, 金美芝, 李相侖, 新開省二 : FI-J(Frailty Index for Japanese elderly)を用いた「虚弱」の予知因子に関する研究. *日本老年医学会雑誌* 2012; 49: 442-448.

(6) 西真理子, 新開省二, 吉田裕人, 藤原佳典, 深谷太郎, 天野秀紀, 小川貴志子, 金美芝, 渡辺直紀 : 地域在宅高齢者における「虚弱 (Frailty) の疫学的特徴. *日本老年医学雑誌* 2012; 49: 344-354.

(7) Horibe H, Kato K, Oguri M, Yoshida T, Fujimaki T, Kawamiya T, Yokoi K, Watanabe S, Satoh K, Aoyagi Y, Tanaka M, Yoshida H, Shinkai S, Nozawa Y,

Murohara T, Yamada Y : Association of a polymorphism of BTN2A1 with hypertension in Japanese individuals. *Am J Hypertension* 2011; 24: 924-929

(8) Yamada Y, Nishida T, Ichihara S, Sawabe M, Fuku N, Nishigaki Y, Aoyagi Y, Tanaka M, Fujiwara Y, Yoshida H, Shinkai S, Satoh K, Kato K, Fujimaki T, Yokoi K, Oguri M, Yoshida T, Watanabe S, Nozawa Y, Hasegawa A, Kojima T, Han B-G, Ahn Y, Lee M, Shin D-J, Lee JH, Jang Y : Association of a polymorphism of BTN2A1 with myocardial infarction in East Asian populations. *Atherosclerosis* 2011; 215: 145-152

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) Shinkai S : Active aging and policy responses in Japan. The key note lecture at The Korean Gerontological Society Annual Scientific Meeting, Daegu, Korea, 2012. 11. 30

(2) Shinkai S, Yoshida H, Nishi M, Murayama H, Fujiwara Y, Kim M-J : Development of a brief questionnaire for screening frailty among Japanese older adults. The Gerontological Society of America's 65th Annual Scientific Meeting, San Diego, CA, USA, 2012. 11. 14-18

(3) 新開省二 : 介護予防の戦略. 第 61 回日本農村医学会学術総会 (教育講演), 松江, 2012. 11. 1

(4) 新開省二, 吉田裕人, 深谷太郎, 藤原佳典, 天野秀紀, 西真理子, 村山洋史, 谷口優, 野藤悠, 干川なつみ, 土屋由美子 : 草津町における介護予防 10 年間の歩みと成果 (1) ねらいとプロセス評価. 第 71 回日本公衆衛生学会総会, 山口, 2012. 10. 24-26

(5) Shinkai S : Prevention of frailty and healthy ageing: a 10-year community intervention and outcome. A symposium at Ageing Societies in Europe and Japan: Policy Responses and Research & Innovation Solutions for Active and Healthy Ageing, Tokyo, Japan, 2012, 10. 9-10

(6) 新開省二 : 高齢者低栄養の疫学 - 低栄養はなにをもたらすか. シンポジウム 2 「高齢者の栄養学 - 低栄養を中心に」 第 34 回日本臨床栄養学会総会 / 第 33 回日本臨床栄養

協会総会 第10回大連合大会, 東京, 2012. 10. 5-7

(7) 新開省二 : 高齢者の栄養状態と余命および死因別死亡. 第3回食肉学術フォーラム委員会, 2012. 9. 24

(8) 新開省二 : 50歳を過ぎたら粗食はやめなさい! 日本基礎老化学会 (JSBG) 公開講座「咀嚼・栄養・病気=高齢者の食生活=」, 2012. 7. 27

(9) 金 美芝, 村山洋史, 吉田裕人, 西真理子, 藤原佳典, 新開省二, 森聖二郎 : 地域在住高齢者における多周波部位別生体電気インピーダンス法による身体組成評価の妥当性の検討. 第54回日本老年医学会学術集会, 東京, 2012. 6. 29-30.

(10) 新開省二 : 健康余命を延伸する社会システムの開発=最新の老年学研究から=. 第60回医療ビジネス研究会, 2012. 4. 26

(11) Shinkai S : Epidemiologic study on frailty using the Japanese-version of Frailty Index. Prevalence, outcomes, and predictors. The 11th Korea-Japan Joint Symposium. The 48th Annual Congress of the Korean Geriatrics Society, Seoul, Korea, 2011.11.26

(12) Shinkai S, Fujiwara Y, Yoshida H, Nishi M, Murayama H, Yoshida H, Suzuki T : Physical performance and cardiovascular death in a general population of older Japanese. The Gerontological Society of America 64th Annual Scientific Meeting, Boston, MA, USA, 2011.11.18-22

(13) Shinkai S, Yoshida H, Nishi M, Fujiwara Y, Fukaya T, Ogawa K, Kim MJ : Frailty Index for Japanese Older Adults: A Validation Study of the 15-items Questionnaire 'Kaigo-Yobo Check-List' as a Frailty Index. 9th Asia / Oceania Regional Congress of Geriatrics and Gerontology, Melbourne, Australia, 2011.10.23-27

(14) 新開省二 : 疫学研究からみた日本人高齢者の栄養と余命および死因別死亡. 日本栄養・食糧学会関東支部第14回脂質栄養シンポジウム, 東京, 2012. 1. 28.

(15) 新開省二, 渡辺直紀, 吉田裕人, 西真理子, 村山洋史, 天野秀紀, 藤原佳典, 深谷

太郎, 小川貴志子, 金美芝, 李相侖 : Frailty Index (虚弱指標) の開発~『介護予防チェックリスト』の Frailty Index (虚弱指標) としての妥当性の検証~. 第70回日本公衆衛生学会総会, 秋田, 2011. 10. 19-21

(16) 新開省二 : 健康長寿に関する運動疫学研究の成果と課題. 健康長寿医療センター追跡研究 (TMIG-LISA), 第66回日本体医学会大会 ワークショップ 6, 下関, 2011. 9. 18

(17) 新開省二, 藤原佳典, 天野秀紀, 吉田裕人, 西真理子, 吉田英世, 鈴木隆雄 : 血清  $\beta$ 2-microglobulin と主要死因別死亡に関する10年間の前向き研究. 第53回日本老年医学会学術集会, 東京, 2011. 6. 15-17

〔図書〕 (計3件)

(1) 新開省二 : 心身の老化・健康・長寿. 発達科学入門 [3] 青年期~後期高齢期 (高橋恵子・湯川良三・安藤寿康・秋山弘子, 編), 東京大学出版会, pp. 223-236, 2012年4月発行

(2) 新開省二, 成田美紀 : III. 介護予防編 4. 低栄養予防と改善に向けたエクササイズ. 健康・エクササイズ科学 (田中喜代次, 田畑泉, 編), 文光堂, pp. 220-232, 東京, 2012年2月発行

(3) 新開省二 : 第5章 老化と免疫. 管理栄養士講座 感染と生体防御 第二版 (酒井徹, 森口覚, 山本茂 編), 建帛社, pp. 62-71, 東京, 2012年1月発行

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.tmig.or.jp/spch/>

6. 研究組織

(1) 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・研究部長

研究者番号 : 60171063

(2) 研究分担者

戸田 年総 (TODA TOSHIFUSA)

横浜市立大学・先端医科学研究センター・教授

研究者番号 : 80133635