

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670350

研究課題名(和文)「寝たきり予防の新規長寿マーカー探索と筋肉増強低分子のメタボローム解析」

研究課題名(英文)Metabolomic analysis for improvement of healthy lifespan

研究代表者

近藤 祥司(Hiroshi, Kondoh)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80402890

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)：メタボロームとは、細胞が生きている間に合成・代謝する非常に小さなメタボライト(代謝物)成分(低分子)を、マスペクトロメトリー応用する事により網羅的に計測する最先端技術である。経口投与レスベラトロールのヒト・マウスでのメタボローム検出に成功した。さらに、皮膚では、直接レスベラトロールのグルクロン酸抱合が行われることを見出した(Plos One 2014)。次に、ヒト血液メタボローム解析の最適化を行った。様々な条件を1年以上かけて検討し、最適化条件を見出した。そこで、ヒト血液と酵母でのメタボローム比較を行い、80%近いメタボライトの共有を報告した(Mol Biosys 2014)。

研究成果の概要(英文)：Metabolic analysis is utilized to detect metabolite profile quantitatively and qualitatively, by using LC-MS. BY applying these techniques, We identified glucuronid forms of Resveratrol in skin absorbed condition (Plos One 2014). Moreover we found the significant overlapping of metabolites between human blood and fission yeast (Mol Biosys 2014). Thus metabolomic approach is highly valuable tool to develop future diagnostic marker or therapeutic targets.

研究分野：老化

キーワード：老化

1. 研究開始当初の背景

メタボロームとは、細胞が活着している間に合成・代謝する非常に小さなメタボライト(代謝物)成分(低分子)を、マススペクトロメトリー応用する事により網羅的に計測する最先端技術である。最新の研究では、このメタボロームにより新規腫瘍マーカー等の発見(Nature2009)が報告され、非常に将来性有望な先端技術の一つである。従来、長寿マーカーに関しては百寿者疫学調査など(Christensen 他 Nat Rev Genet 2006)、筋肉増強効果検討に関してはホルモン投与研究など(Rudman 他 NEJM 1990)が知られている。

一方、近藤は、基礎老化研究に10年以上従事し、一貫して老化と解糖系代謝の関連に注目してきた。と同時に臨床医として、「寝たきり予防」を目的とし、国立病院として日本初のアンチエイジング外来を京大病院老年内科に設立した(06年)。このような経過の中で基礎老化研究や最先端代謝研究のノウハウ・知見を、健康長寿・寝たきり予防に応用することを目的として、本計画を着想した。まず2009年ころより我々は沖縄科学技術大学院大学柳田充弘教授とメタボローム解析に関し共同研究を開始した。柳田らは、最も初期の段階より、メタボロームに注目し、モデル生物(酵母)での長寿や飢餓での代謝マーカー検索の結果、論文発表実績(Pluskal T, et al.FEBS J.2011, Pluskal T, et al.Mol Biosyst.2010)も蓄積し、世界的メタボローム技術最先端ラボと呼べる。

2. 研究の目的

本計画では、最先端技術であるメタボローム解析を駆使し、今まで謎の多かった低分子メタボライトに焦点を絞り、寝たきり予防臨床応用を目指すものである。

3. 研究の方法

本計画ではメタボローム解析成果の健康長寿・寝たきり予防医療への応用を目指す。その具体的目標は以下の3本柱よりなる。

- 1) メタボローム解析によるヒト血液中新規長寿・代謝マーカー探索
- 2) 低分子筋肉増強作用による寝たきり予防効果の検証
- 3) メタボローム解析による既知健康物質の代謝変化効果検証と新規標的の同定

4. 研究成果

まず、1年目は、さまざまな基質のメタボロームでのピーク分析を行った。その中で、経口投与レスベラトロールのヒト・マウスでのメタボローム検出に成功した。次に経口・経皮投与の吸収効率の違いを、各臓器(筋肉、皮膚、肝臓、血液など)毎に、メタボローム比較検討を行った。興味深いことに、皮膚では、直接レスベラトロールのグルクロン酸抱合が行われることを見出した。皮膚培養細胞でも同様の知見を得た。よって、国際雑誌に論文報告した。次に皮膚吸収されたレスベラトロールの健康効果をメタボロームで検討した。複数の検討の結果、残念ながら有意な結果を見いだせず、筋肉増強効果も確認できなかった。

次に2年目より、ヒト血液メタボローム解析の最適化を行った。メタボライトは大変不安定であり、ヒト血液では多数のピークが出現することより、非常に重要なステップであると考えた。食事の影響、サンプル調節条件など、様々な条件を1年以上かけて検討し、非常に安定よくピークを検出できる方法を見出した。そこで、ヒト血液と酵母でのメタボローム比較を行った。興味深いことに、80%近いメタボライトは、共有されていた。以上の結果も、国際雑誌に論文報告した。

3番目に、ヒトの血液サンプルによる年齢差の群による比較検討を開始した。若年群(平均20歳代)と老年群(平均80歳代)において、ヒト血液中の126のコンパウンドに関する比較解析を行っている。その結果、興味深いことに、大きく分けて3群に分類できることが判明した。すなわち、比較的ばらつきが小さいもの、ばらつき個人差が大きい、年齢差のないもの、ばらつき個人差が大きく、年齢差のあるもの、である(未発表)。これらは、今後新規老化マーカーとして期待できると考えられた。

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)

Romanas Chaleckis, Masahiro Ebe,

Tomáš Pluskal, Itsuo Murakami,

Hiroshi Kondoh, and **Mitsuhiro**

Yanagida "Unexpected similarities

between the Schizosaccharomyces

and human blood metabolomes, and

novel human metabolites"

Molecular BioSystems 2014

(10):2538-51.

doi:10.1039/c4mb00346b.

Itsuo Murakami, Romanas Chaleckis, Tomáš Pluskal, Ken Ito, Kousuke Hori, Masahiro Ebe, **Mitsuhiro Yanagida** and **Hiroshi Kondoh**. Metabolism of skin-absorbed resveratrol into its glucuronized form in mouse skin. **PLoS One**. 2014 9(12): e115359. doi:10.1371/journal.pone.0115359

Takumi Mikawa, Koji Okamoto, Matilde E LLeonart, Akifumi Takaori-Kondo, Masayuki Yokode, Nobuya Inagaki , and **Hiroshi Kondoh** Posttranscriptional Regulation of Glycolytic enzyme Phosphoglycerate Mutase. **Science Proceedings** 2014 1(1) e380;p1-4 doi: 10.14800/380

T Mikawa, T Maruyama, K Okamoto, H Nakagama, ME LLeonart, T Tsusaka, K Hori, I Murakami, T Izumi , A Takaori-Kondo, M Yokode, G Peters, D Beach, and **Hiroshi Kondoh**. Senescence-inducing stress promotes proteolysis of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. **Journal of Cell Biology** 2014 204(5):729-45. doi: 10.1083/jcb.201306149.

Takeshi Tsusaka, Tingting Guo, Teiti Yagura, Toshiaki Inoue, Masayuki Yokode, Nobuya Inagaki, and **Hiroshi Kondoh** Deacetylation of PGAM in its distinct central region by SIRT2 downregulates its enzymatic activity.

Genes to Cells 2014 (10):766-77. doi: 10.1111/gtc.12176.

Takumi Mikawa, Matilde E LLeonart, Akifumi Takaori-Kondo, Masayuki Yokode, and **Hiroshi Kondoh** RING-mutant Mdm2-M459I Confers Anti-apoptotic Effect in Primary Cells **Journal of Cytology & Histology** 2014 5: i103. doi:10.4172/2157-7099.1000i103

Takako Okamoto, Masaki Mandai, Noriomi Matsumura, Ken Yamaguchi, **Hiroshi Kondoh**, Yasuaki Amano, Tsukasa Baba, Junzo Hamanishi, Kaoru Abiko, Kenzo Kosaka, Susan K, Murphy, Seiichi Mori, Ikuo Konishi. Hepatocyte nuclear factor-1 β promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear carcinoma. **Molecular carcinogenesis** 2015 54(1):35-49. doi: 10.1002/mc.22072.

Andrea Feliciano; Josep Castellvi; Ana Artero-Castro; Josep A Leal; Cleofé Romagosa; Javier Hernández-Losa; Vicente Peg; Angels Fabra; Francisco Vidal; **Hiroshi Kondoh**; Santiago Ramón y Cajal; Matilde E. Lleonart. miR-125b act as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2- α , CCNJ, and MEGF9. **PLoS One**. 2013 Oct 3;8(10):e76247. doi: 10.1371/journal.pone.0076247.

Okuda J, Niizuma S, Shioi T, Kato T,

Inuzuka Y, Kawashima T, Tamaki Y, Kawamoto A, Tanada Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Soga T, Takemura G, **Hiroshi Kondoh**, Kita T, Kimura T. Persistent overexpression of phosphoglycerate mutase, a glycolytic enzyme, modifies energy metabolism and reduces stress resistance of heart in mice. **PLoS One**. 2013 Aug 12;8(8):e72173. doi: 10.1371/journal.pone.0072173. eCollection 2013.

Hiroshi Kondoh, Takumi Mikawa, Matilde E. LLeonart Role of senescence induction in cancer therapy. **Aging, Cancer, and Noncancer Pathologies**, Vol 1,281-290, 2013.

近藤祥司 「骨粗鬆症のドロップアウトに対する解決策について」「かかりつけ医のための老年病、100の解決法」秋下雅弘編集 メディカルレビュー社 2015年6月出版 p154-5

近藤祥司 「運動療法における「動脈硬化予防」と「骨折予防」の違い」「かかりつけ医のための老年病、100の解決法」秋下雅弘編集 メディカルレビュー社 2015年6月出版 p216-7

近藤祥司 「私の好きな過剰なるもの」近畿化学工業界 2015 vol67 No4 p5-7

足立祥、**近藤祥司** 生活習慣病予防と長期臥床期間の関係について。日本医事新報 2015 2月1週号 4737 p62-63

【学会発表】(計4件)

- 1) 2015年11月14日 第6回 癌・炎症と抗酸化研究会 大分 「老化の多様性を規定する代謝特性～進化におけるトレードオフ」
- 2) 2015年11月14日 第26回日本老年医学会近畿地方会 京都 三河拓己、伊藤健、**近藤祥司** 「解糖系酵素 PGAM モデルマウスの解析」
- 3) 2015年9月26日 第8回Symphony 東京 三河拓己、伊藤健、堀晃輔、村上逸雄、稲垣暢也、横出正之、**近藤祥司** 「PGAM モデルマウスの解析」
- 4) 2015年7月23日 第36回日本炎症・再生医学会 東京 「ストレス老化シグナルに拮抗するワールブルグ解糖系転写後制御」
- 5) 2015年6月13日 基礎老化学会 横浜 「メタボロームアプローチによるヒト血液メタボライト解析 Metabolomic approach for human blood」
- 6) 2015年6月13日 基礎老化学会 横浜 「老化シグナルによる解糖系酵素 PGAM の転写後制御機構 Posttranscriptional regulation of PGAM by senescence inducing signal」
- 7) 2015年6月12-14日 第57回日本老年医学会学術集会、横浜 三河拓己、**近藤祥司**、「ストレス老化シグナルによる解糖系ユビキチン化制御とその病態意義」
- 8) 2015, 12th-14th May 2015 The Controlling Cancer Summit London. Mikawa T and **Kondoh H*** "Senescence inducing stress promotes proteolysis of

phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2”

9)2015年4月5日 第29回日本医学会総会 京都「老化はなぜ進むのか」

10)2014年12月16日 第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会 広島 三河拓己、**近藤祥司**「ストレス老化シグナルによる解糖系酵素 PGAM のユビキチン化制御」

11)2014年11月26日 分子生物学会 横浜 三河拓己、**近藤祥司**「ストレス老化シグナルによる解糖系代謝シフトの誘導する生体防御バリアー機構」

12)2014年11月15日 第5回癌・炎症と抗酸化研究 CIA 大分 三河拓己、**近藤祥司**「ストレス老化シグナルによる解糖系ユビキチン化制御とその病態意義；Beyond the Warburg effect」

13)2014年11月8日 日本皮膚学会西部支部 高松「ストレス老化シグナルによる解糖系ユビキチン化制御とその生体防御機構」

14)2014年9月27日 癌学会コアシンポジウム 横浜 「細胞老化誘導性 DNA ダメージによる解糖系ワールブルグ効果の制御機構」

15)2014年6月27日 日本基礎老化学会 名古屋 MIKAWA Takumi, **KONDOH Hiroshi** 「Senescence-inducing stress promotes proteolysis of phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2」

16)2014年6月26日 日本基礎老化学会

名古屋「Metabolomic approach for human blood」

17)2014年6月6日 第14回日本抗加齢医学会 シンポジウム 大阪「高齢者の多様性を反映する代謝マーカーの血液メタボローム探索」

18)2013年11月16日 老年医学会近畿地方会 京都 村上逸雄、Romanas Chaleckis、伊藤健、**近藤祥司**「マウスにおけるレスベラトロールの経皮吸収と代謝」

【図書】(計2件)

(ア) 近藤祥司著「シリーズ進化生物学の新潮流；老化という生存戦略；進化におけるトレードオフ」(日本評論社)、p222 2015

(イ) 近藤祥司監訳「老化生物学 老いと寿命のメカニズム」(MEDSI) p408 2015 原著「Biology of ageing」Roger B McDonald 著 (Garland Science New York & London 2014) p390

【産業財産権】

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

【その他】

ホームページ等

<http://www.anti-aging.jpn.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤祥司 (Hi roshi Kondoh)

京都大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：80402890

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

柳田充弘 (Mitsuhiro Yanagida)

沖縄科学技術大学大学院・教授

研究者番号：80025428