

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860421

研究課題名(和文) 栄養メタボロームプロファイリングによる内臓脂肪蓄積に関連する代謝物マーカーの解明

研究課題名(英文) Nutritional metabolome profiling reveals biomarkers for visceral fat accumulation

研究代表者

栗原 綾子 (KURIHARA, Ayako)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40645470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：世界的に肥満人口は増加し、全人口の約半数が肥満ないし過体重であることがWHOより報告されている。特に日本人は高度肥満に到達する前から耐糖能異常等の疾患を発症していることから、早期に肥満を予防するためのバイオマーカーが求められている。そこで本研究では山形県鶴岡市に居住する地域在住者のメタボロームプロファイリングを行い、肥満に関連するアミノ酸代謝を中心とする中心炭素代謝を含む、尿中75物質、血漿77物質を網羅的に測定した。尿、血漿ともに肥満による代謝の違いが明らかになり、予防に役立つバイオマーカー候補を示すことができ、肥満に関連するバイオマーカーとして、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)：According to WHO, population of overweight or obesity have been increasing in worldwide, about half population already have been them. Even if one have overweight, NCD are tend to appear or develop early among Japanese. However few biomarkers of obesity or overweight are known. We performed both two metabolome profiling, 32 urine samples and 1973 plasma samples, collected from residents in Tsuruoka City, identifying and quantifying 77 urine and 75 plasma metabolome. Both urine and plasma metabolome were different by obesity and some biomarkers for prevention were suggested. This study suggests that both urine and plasma metabolome profiling is useful for early prevention for obesity.

研究分野：栄養疫学

キーワード：メタボロームプロファイリング 肥満

1. 研究開始当初の背景

WHOによると、世界的に肥満者は増加しており、2014年時点では18歳以上で190億人以上が過体重、そのうち6億人以上が肥満であると報告されている。これは全人口の約半数が肥満ないし過体重であることを意味しているが、肥満は予防可能な疾患であることから、予防医学上重要な疾患と言える。

日本人では、BMI25以上の肥満の者の割合は20-60歳代男性で29.6%、40-60歳代女性で20.5%であり、この10年間の変動はほぼ一定である(平成24年度国民健康・栄養調査)。男性の40歳代で約40%、女性では70歳代で約25%がBMI25以上の肥満である。

肥満のうち、脂肪細胞の質的異常を伴う内臓脂肪蓄積型肥満が動脈硬化性疾患に大きな影響を及ぼすことが明らかにされ(2000年肥満治療ガイドライン)、内臓脂肪蓄積型肥満を重視した予防を進める一方で、その測定は容易ではない。現状では、ウエスト周囲径でスクリーニングを実施し、これに耐糖能異常などの合併症の有無でメタボリックシンドロームを診断している。しかし、欧米諸国と異なり、日本人では、高度肥満に到達する前から耐糖能異常等の疾患を発症していることから、生活習慣病への影響が大きく、早期に肥満の進展を予防するためのバイオマーカーが求められている。

一方で、近年いわゆるオミックス研究手法を疫学研究に取り入れ、疾患機序に基づいたバイオマーカーの発見を伴う新しい研究成果が報告されつつある。特にメタボロームは、生体内の低分子化合物(有機酸、アミノ酸など)や代謝産物であり、内因性には約3000物質があると推測され、遺伝子発現、たんぱく質の同化・異化という一連の代謝とシグナル伝達の過程を反映していることから、疫学研究での応用が進みつつある。

代謝性疾患をターゲットとした領域では、米国人肥満者73名および非肥満で健康な者67名を比較した報告(Newgard CB et al. Cell Metabolism 2009;9:311-26)では、インスリン抵抗性に血液中のバリン、ロイシン、イソロイシンからなる分枝鎖アミノ酸が関連していることを、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 et al. Nature Medicine 2011;17:448-53)では、血液中の分枝鎖アミノ酸とチロシン、フェニルアラニンが、将来の糖尿病発症に関連していることを明らかにするなど、成果が上がりつつある。

こうした代謝性疾患の予防においては、栄養疫学アプローチの重要性が認識され、食物摂取頻度調査法(Food Frequency Questionnaire)を用いた多くの疫学研究が実施されている。しかしながら、食事からの栄養素摂取の複雑性や本人の記憶に頼った調査法であるといった点から、より客観的かつ定量性を持った評価方法が必要とされており(Jones DP, et al. Annu Rev Nutr

2012;32:18.1-18.20)、その解決策の一つとして、メタボローム解析を用いた栄養メタボロームプロファイリングが挙げられている(O'Sullivan et al. Am J Clin Nutr 2011;93:314-21.ほか)。

応募者らのチームでは、こうした新しい展開を実行へ移すため、疫学研究チームとメタボローム解析チームの融合型研究組織を構築、すでにメタボロームプロファイリング導入した新しい地域コホート研究(「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究」)を開始した。

2. 研究の目的

メタボロームの網羅的測定技術を用い、栄養素摂取、尿中極性代謝物(アミノ酸、核酸等)プロファイル、内臓脂肪蓄積との関連を検討することにより、内臓脂肪蓄積に関連する代謝物マーカーを明らかにするとともに、これらの代謝物マーカーに食事摂取が与える寄与について明らかにすることを目的とする。

具体的には(1)「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究」の平成26年度調査の参加者約300名に、BMI、腹囲測定および非侵襲的内臓脂肪蓄積度測定(以下、内臓脂肪測定)による内臓脂肪蓄積度の評価を行うとともに、早朝空腹時尿のメタボローム解析によって代謝プロファイリングを行い、その両者の関連性から、内臓脂肪蓄積に関連する尿中代謝物マーカーを明らかにするとともに、(2)コホート参加者を含む100名を対象に、食事記録法を用いた栄養調査、尿中メタボローム解析を実施し、栄養素摂取・食品摂取と尿メタボロームプロファイルの関連性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)内臓脂肪蓄積に関連する尿中代謝物マーカーの検討とメタボローム解析

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、参加時の年齢が35~74歳の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中、毎年3,000~3,500人を調査参加者数としてリクルートする計画で、平成25年終了時点で参加同意者が6800名を超え、順調に進んでいる。平成26年度も3000名程度の参加を見込んでいることから、コホート研究参加同意者から、内臓脂肪蓄積の高い群と低い群の2群について、年齢、性別、をマッチさせて層化無作為抽出した各150名、計300名を本研究の対象とする。

検体・データ収集

尿は、前日20時以降は水分摂取のみとした条件で採取した早朝尿を用い、運動習慣、飲酒・喫煙状況、現症・既往歴、服

薬状況等、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実施している質問票のデータを用いる。内臓脂肪測定は、BMI、腹囲測定および生体インピーダンス法による非侵襲的内臓脂肪測定を用いる。

メタボローム解析

メタボローム解析は、慶應義塾大学先端生命科学研究所(鶴岡市)において実施する。対象者から得られた尿は、ただちに-80 で凍結保存し、解凍後ただちに濾過・遠心し、CE-MS に導入してメタボローム解析を行う。

統計学的解析

初年度に収集した300名分のデータに基づき、内臓脂肪蓄積度と尿中メタボロームプロファイルとの関連性を、交絡因子を考慮しながら検討する。

(2) 食事記録調査に基づく栄養メタボロームプロファイリング研究

対象者の選定

30~74歳の男女で、現時点で、がん、心疾患、脳血管疾患の既往のない者とする。平成26年度は、(1)のコホート研究参加者を含む鶴岡地域在住者50名とし、性別・年齢群(35歳以上、75歳未満)で層別化してリクルートする。また、鶴岡とは異なる食事習慣の地域在住の50名についても度同様に性別・年齢群(35歳以上、75歳未満)で層別化してリクルートする。

検体・データ収集

食事記録調査は、連続しない3日間の食事について目安量記録法と写真法を併用し実施する。24時間蓄尿は調査日のいずれか1日に併せて実施する。栄養摂取量評価は応募者と地域在住の管理栄養士3名が行う。内臓脂肪測定も(1)に記した方法で、同様に行う。

メタボローム解析

得られた尿検体は、凍結保存後、(1)に記した方法で、同様にメタボローム解析を行う。

統計学的解析

収集した100名分のデータに基づき、内臓脂肪蓄積度と食品摂取、栄養摂取メタボロームプロファイルとの関連性を、交絡因子を考慮しながら検討する。

以上の解析を総合し、メタボローム解析によって明らかにされた尿中代謝物マーカーを指標として、どのような栄養素摂取が内臓脂肪蓄積に関連するかについて明らかにする。

4. 研究成果

(1) 食事摂取、栄養摂取のデータベース構築

食事記録調査による栄養摂取量の推定と尿のメタボローム解析を実施し、34名の協力者に食事調査と24時間蓄尿と随時尿の採取を行い、32名が最後まで調査に協力した。食事調査と24時間蓄尿を同時に行うことは協力者にとって負担が大きく、実施主体のサポートが重要であるが、管理栄養士チームの多大なサポートがあり、脱落が2名と集団の大きな変動はなく、安定的に調査を実施し、データセットを構築することができた。

一方で、都市部住民ボランティアを対象に同様の食事調査を実施する予定であったが、平成26年度実施のデータセット整備に時間を要したため、食事調査の実施を見送らざるを得なかった。

同程度の集団として、本研究と同様の食事調査ならびに内臓脂肪測定をすでに実施しており、尿検体のメタボローム解析が可能である他研究機関との共同研究計画を立案した。本研究実施期間中に栄養成分表の改定があったこともあり、共同研究のため、共通の栄養計算ソフトを用いて、栄養摂取データセットの読み替え作業を行った。

今後、共同研究先の検体についてもメタボローム解析を進め、測定値の検証とともに解析を進めていく。

(2) コホート集団の内臓脂肪蓄積度と尿メタボロームのデータベースの構築

「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究」の平成26年度調査(ベースライン調査最終年)の参加者約300名について、尿のメタボローム解析、新たに開発された非侵襲的内臓脂肪計を用いた内臓脂肪量の測定と一般的なライフスタイル状況の収集を行いデータベースを構築した。

内臓脂肪測定は、コホート研究参加者約3000名に実施することができた。今後は、メタボローム解析データ値の検証を行いつつ、サンプルサイズを大きくして検討を進めていく。

(3) 肥満による蓄尿メタボロームプロファイリング

24時間蓄尿を実施した32名のメタボローム解析を終えており、尿中メタボロームプロファイリングにより肥満に関連する代謝物マーカーの検証を行った。

男女別に肥満群(男性BMI 29.3以上、女性BMI 24.9以上)と標準体重群(男性BMI 20.5-23.5、女性BMI 18.8-20.8)の代謝プロファイルについてPCA主成分分析を用いて比較した結果、図1、2のような結果が得られ、肥満群(緑)と標準体重群(赤)では、アミノ酸代謝プロファイルが異なることが示された。

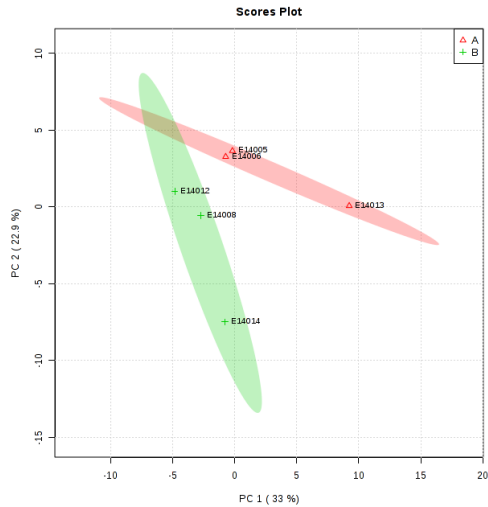


図 1 男性における肥満群と標準体重群の尿中アミノ酸代謝プロファイルを用いた PCA 主成分分析(緑色 = 肥満群、赤色 = 標準体重群)

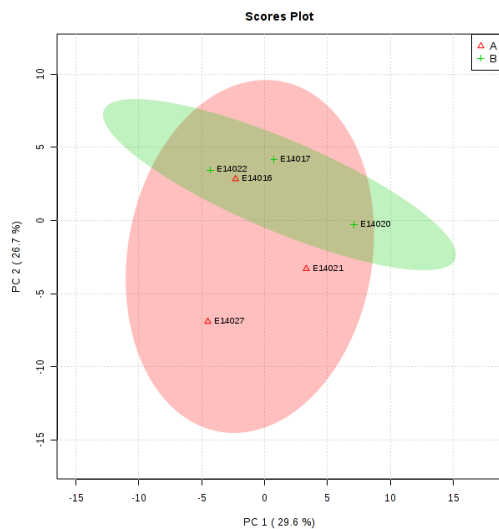


図 2 女性における肥満群と標準体重群の尿中アミノ酸代謝プロファイルを用いた PCA 主成分分析(緑色 = 肥満群、赤色 = 標準体重群)

t 検定を用いて検定を行った結果、男性で 4 物質、女性で 3 物質がアミノ酸代謝において肥満と有意な関連があった。具体的には、肥満群では標準体重群に比べて男女ともにヒスチジン代謝に関連する物質の濃度が有意に高かった。男性では分枝鎖アミノ酸の分解と生合成に関連する物質が、女性ではシスチン・メチオニン代謝、グリシン・セリン・トレオニン代謝に関連する物質で濃度が有意に高かった。

(4) 肥満による血漿メタボロームプロファイリング

蓄尿メタボロームプロファイリングでは集団が小さいため、血漿メタボローム解析においても同様の傾向があるか解析を行った。対象者は平成 24 年度にコホート調査に参加した鶴岡市在住者のうち、血漿メタボローム解析を終えた約 2000 名である。血漿メタボロームプロファイルにより肥満に関連する代謝物マーカーの検討を行った。

男女別に肥満群(男性 BMI26.4 以上、女性 BMI26.3 以上)と標準体重群(男性 BMI22.8-23.9、女性 BMI22.2-23.4)の代謝プロファイルについて PLS 判別分析を用いて比較した。図 3,4 のような結果が得られ、肥満群(緑)と標準体重群(赤)では、アミノ酸代謝プロファイルが異なることが示された。

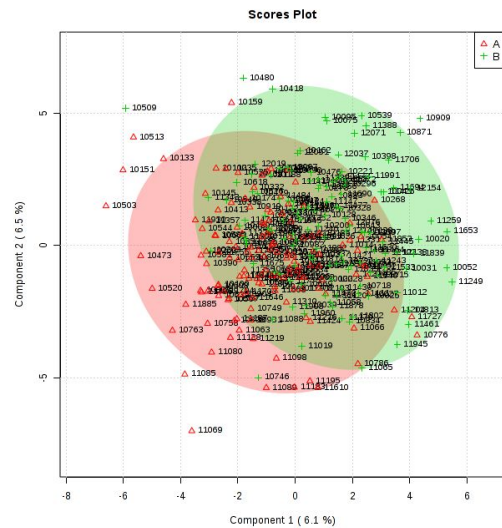


図 3 男性における肥満群と標準体重群のアミノ酸代謝プロファイルを用いた PLS 判別分析(緑色 = 肥満群、赤色 = 標準体重群)

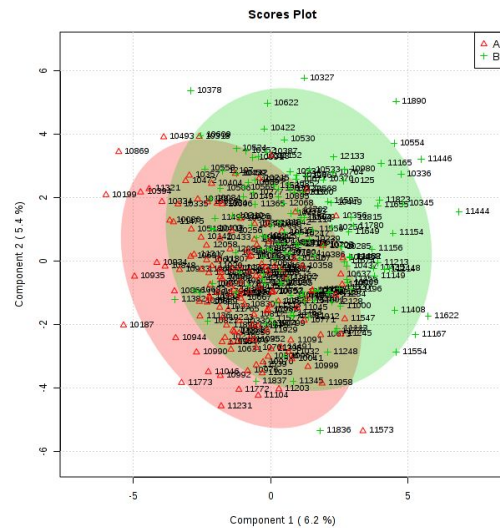


図 4 女性における肥満群と標準体重群のアミノ酸代謝プロファイルを用いた PLS 判別分析(緑色 = 肥満群、赤色 = 標準体重群)

肥満群と標準体重群の判別に寄与する物質を検討した結果、図 5、6 の結果が得られた。肥満群では標準体重群に比べて男女ともに、アミノ酸代謝 5 経路に関連する物質が、男性ではアミノ酸代謝経路のうち、分枝鎖アミノ酸代謝に関連する物質 3 種が高い血漿濃度を示し、有用なバイオマーカー候補と考えられた。候補物質には蓄尿メタボローム解析では定量できない物質も含まれており、血漿メタボロームによるバイオマーカー探索についても、その有用性が示唆された。

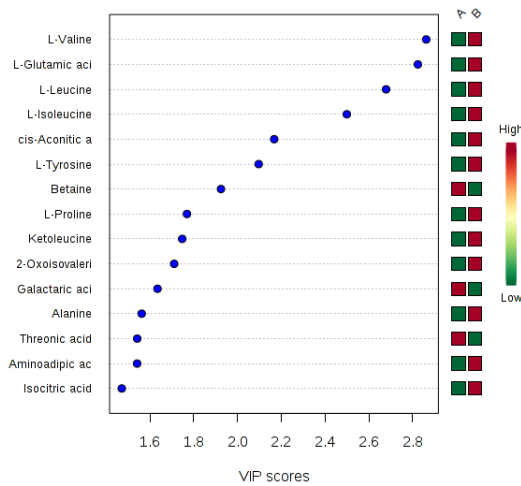


図 5 男性における肥満群と標準体重群の判別に特に寄与の大きな物質

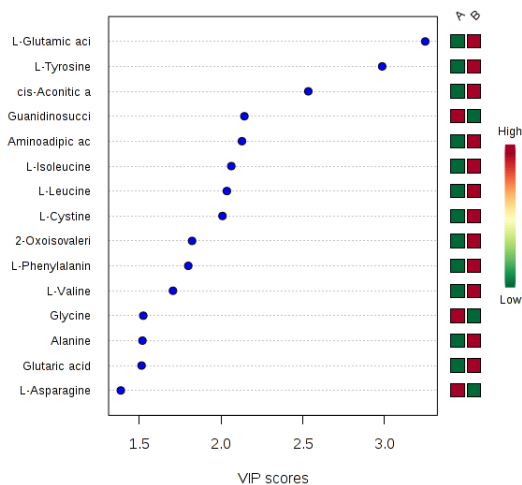


図 6 女性における肥満群と標準体重群の判別に特に寄与の大きな物質

これまでに肥満とメタボロームの関連を示した研究は少なく、また、検体採取と並行してメタボローム解析を実施したコホート

研究の成果は見当たらない。従って、本研究は畜尿と血漿の 2 つのプロファイリングにより肥満における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、欧米人と比較して、生活習慣病発症において肥満の影響が大きい日本人におけるバイオマーカー候補を示した点で重要である。

平成 26、27 年度で得られた集団ならびにデータセットについて、今後さらにサンプルサイズを大きくし、メタボローム解析と統計解析を進め、メタボロームプロファイリングによる肥満に関連する代謝物マーカーの検討と食事摂取・栄養素摂取と代謝物マーカーの関連の検討を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Iida M et al, Profiling of plasma metabolites in postmenopausal women with metabolic syndrome, Menopause, Volume 23.7, July 2016, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMID%3A27070805>

(2) Harada S et al, Metabolomic profiling reveals novel biomarkers of alcohol intake and alcohol-induced liver injury in community-dwelling men, Environ Health Prev Med, 2016 Jan. 21(1):18-26, 査読有
 DOI:10.1007/s12199-015-0494-y

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 栗原綾子、地域在住者の代謝プロファイリングと肥満による代謝経路変化、第 62 回日本栄養改善学会学術総会、2015 年 9 月 24 日-26 日、福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル(福岡県福岡市博多区)

(2) 栗原綾子、地域在住者における肥満と血漿中メタボロームの関連、第 61 回日本栄養改善学会学術総会、2014 年 8 月 20 日-22 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原綾子(Kurihara Ayako)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40645470