

35. コホート研究による長寿関連血中マーカーの探索

玉腰 暁子

Key words : ケースコホート研究, 長寿, 血中マーカー

*北海道大学 大学院医学研究科
予防医学講座 公衆衛生学分野

緒 言

我が国は、平均寿命が男性 79.55 歳、女性 86.30 歳（2010 年完全生命表）と世界最長寿国の一つである¹⁾。時間の経過とともに不可逆的に進行する形態的、生理的な生体の衰退現象、つまり老化を抑制し、健康に長生きすることは誰もが希望することであるが、老化は非常に複雑な現象であり、そのメカニズムには不明な点が多い。そこで、老化との関連が疑われている 4 種の血中マーカーに着目し、65 歳時点で採取保管した血漿を用いて検討を行うこととした。

着目したマーカーについて、今までの知見は次のとおりである。アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一種で、動脈硬化に予防的に働くことが知られている²⁾。その作用は、インスリン受容体を介さない糖取り込み促進、インスリン感受性の亢進、脂肪酸の燃焼、血管内皮修復による動脈硬化抑制、抗炎症などである。

一方、Angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) は、血管内皮細胞に炎症性病変を惹起し動脈硬化を生じさせること、脂肪細胞に慢性炎症を引き起こしインスリン抵抗性を増加させ、糖尿病発生に関わることなどが明らかにされつつある³⁾。カルボキシメチルリジン (CML) は最終糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) の 1 つであり、加齢と共に蓄積するほか、糖尿病患者で心疾患イベントの発生と関連すると報告されている⁴⁾。最後に、近年、抗老化ホルモンの 1 つとして注目されている α -Klotho 蛋白質は、心血管疾患の抑制に働き、血中 α -Klotho 蛋白質の低下は、高齢者における腎機能の低下や、ADL の低下、握力の低下、総死亡率の増加に関連するとされる⁵⁾。このように今回着目したマーカーは動脈硬化、インスリン抵抗性、炎症などを通じて、加齢/長寿と関連していると考えられるが、長期追跡による検討は乏しくその知見は十分ではない。

方 法

対象は、N 市で 1996 年より 2005 年まで、当該年に 65 歳に達する者を対象に、詳細に情報を収集するために特別に設けた健診を受診した約 3,000 名で、当該地域・当該年齢住民の約 50% をカバーするコホートである⁶⁾。研究開始時に自記式調査による生活習慣や環境要因、体力、認知機能、健診受診時の各種検査項目に加え、90% 以上の者から同意を得て採血し、血漿を冷凍保管してきた。そこで、本研究では、65 歳時に収集した保管血漿から、性、検体収集年で層化し、25% の割合でサブコホート計 717 例を抽出した。症例は、これまでに判明している死亡 (180 例)、がん罹患 (172 例)、要介護状態への移行者 (87 例) とし、サブコホートと合わせ 1,118 例を測定対象とした。合計数とならないのは、サブコホートに含まれる症例があることと症例の事象 (要介護から死亡、など) が重なる場合があるためである。

アディポネクチン (BLM)、Angptl2 (IBL)、CML (CELL BIOLABS (CBL))、 α -Klotho 蛋白質 (IBL) の測定には、いずれも Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を用い、測定者にはサブコホート、症例いずれの検体であるかわからない状態で実施した。

各マーカーの特性を検討するために、サブコホート内で生活習慣 (喫煙習慣、運動習慣、睡眠時間)、身体状況 (BMI、高血圧、脂質異常症、糖尿病)、身体機能 (歩行速度、握力) と測定値との関連を検討した。検定はマーカーの分布に従い、適切な方法を採用した。さらに、死亡との関連を検討するために、サブコホートと死亡者の値を比較した。

*現所属：北海道大学 大学院医学研究科 社会医学講座 公衆衛生学分野

結 果

測定できなかった検体を除き、アディポネクチンは1,118例、Angptl2は1,117例、CMLは1,032例、 α -Klothoは1,114例を検討対象とした。CMLでは、あるキットで測定した検体全てが他の検体の分布より10倍近い値を示したため、今回は検討対象から除外した。測定限界値以下の検体については、いずれの項目も測定限界値の半値を代入し、解析に用いた。

サブコホート特性別に測定値を比べたところ、アディポネクチンが低いのは睡眠時間が長い者（傾向：男）、BMIが高い者（男女）、高血圧（傾向：女）、糖尿病（男女）、Angptl2が高いのは睡眠時間が長い者（女）、BMIが高い者（男女）、高血圧（女）、脂質異常症（傾向：男）、糖尿病（男）、低歩行速度（傾向：男）、CMLが高いのはBMIが低い者（傾向：女）、脂質異常症なし（女）、糖尿病なし（女）、握力が高い者（傾向：女）、 α -Klothoが低いのは喫煙（傾向：男）、BMIが高い者（傾向：男）、非高血圧（女）、脂質異常症（傾向：女）、非糖尿病（傾向：男）、握力が高い者（男）であった（表1）。

表1. 特性別測定値の分布 (サブコホート)

	アディポネクチン ^a		ANGPTL2 ^a		CML ^b		KLOTHO ^a					
		p		p		p		p				
男												
生活習慣												
喫煙習慣												
非喫煙	6.71	(5.28 - 8.60)	3.85	(3.04 - 4.59)	4.43	(3.03 - 6.92)	685.2	(570.3 - 1033.3)				
禁煙	6.48	(4.93 - 7.97)	0.339	3.82	(3.07 - 4.59)	0.396	4.25	(3.18 - 6.54)	0.283	639.8	(542.2 - 869.0)	0.065
現在喫煙	6.21	(4.78 - 8.31)	3.62	(2.88 - 4.51)	5.10	(3.56 - 6.29)	639.1	(536.6 - 817.8)				
運動習慣												
しない	6.21	(4.83 - 8.51)	3.84	(3.07 - 4.56)	4.28	(3.16 - 6.29)	638.4	(525.0 - 820.0)				
<1回/週	6.23	(4.95 - 8.14)	0.843	3.79	(3.11 - 5.05)	0.462	4.87	(4.09 - 6.92)	0.195	651.7	(540.1 - 916.4)	0.860
≥1回/週	6.48	(5.01 - 8.03)	3.72	(2.96 - 4.54)	4.67	(3.20 - 6.80)	656.7	(550.1 - 871.0)				
睡眠時間 (時間/日)												
< 7	6.24	(5.01 - 8.05)	3.75	(2.98 - 4.59)	4.48	(3.20 - 6.88)	659.8	(544.2 - 910.8)				
7-8	6.49	(5.00 - 8.37)	0.073	3.80	(3.06 - 4.55)	0.938	4.45	(3.30 - 5.80)	0.146	631.4	(538.2 - 795.5)	0.622
≥ 8	5.97	(4.80 - 7.83)	3.76	(2.88 - 4.65)	5.25	(3.80 - 7.29)	678.9	(575.2 - 920.7)				
身体状況												
BMI (Body Mass Index)												
<18.5 kg/m ²	10.34	(7.04 - 13.25)	3.60	(3.00 - 3.91)	4.51	(3.29 - 6.75)	653.1	(596.2 - 880.7)				
18.5-25	6.46	(4.98 - 8.31)	0.005	3.62	(2.89 - 4.53)	0.001	4.63	(3.34 - 6.54)	0.513	656.7	(550.1 - 871.0)	0.071
≥25	6.09	(4.59 - 7.39)	4.06	(3.49 - 5.05)	4.47	(2.96 - 6.07)	606.0	(477.7 - 820.0)				
高血圧												
あり	6.21	(4.73 - 8.11)	0.394	3.66	(2.94 - 4.53)	0.591	4.56	(3.30 - 6.34)	0.481	656.7	(550.1 - 896.1)	0.348
なし	6.46	(5.16 - 8.36)	3.82	(3.11 - 4.64)	4.59	(3.19 - 6.75)	638.4	(540.4 - 840.8)				
脂質異常症												
あり	6.46	(4.93 - 8.49)	0.968	4.03	(3.25 - 4.70)	0.057	4.55	(3.45 - 5.86)	0.724	652.1	(542.2 - 865.5)	0.376
なし	6.30	(4.96 - 8.06)	3.63	(2.95 - 4.45)	4.58	(3.19 - 6.75)	650.6	(544.2 - 857.2)				
糖尿病												
あり	5.74	(4.08 - 7.78)	0.006	4.44	(3.64 - 5.53)	<.0001	4.24	(1.13 - 5.79)	0.090	681.7	(600.5 - 976.3)	0.090
なし	6.48	(5.09 - 8.32)	3.65	(2.94 - 4.45)	4.64	(3.36 - 6.64)	638.7	(535.3 - 841.7)				
身体機能												
歩行速度												
遅い	5.97	(4.67 - 7.16)	4.02	(3.20 - 5.08)	5.14	(3.34 - 6.82)	760.2	(564.9 - 916.4)				
普通	6.46	(5.02 - 8.36)	0.327	3.76	(3.01 - 4.53)	0.055	4.43	(3.17 - 6.35)	0.449	638.4	(542.2 - 840.7)	0.648
速い	6.53	(4.93 - 8.34)	3.70	(2.93 - 4.35)	4.79	(3.80 - 6.77)	667.5	(540.3 - 850.3)				
握力												
下位1/2	7.06	(5.33 - 8.87)	0.360	3.46	(2.88 - 4.29)	0.496	4.23	(2.80 - 5.67)	0.773	656.7	(562.1 - 967.1)	0.032
上位1/2	6.49	(5.46 - 7.52)	3.61	(2.80 - 4.43)	4.00	(2.66 - 5.06)	623.2	(544.9 - 896.1)				
女												
生活習慣												
喫煙習慣												
非喫煙	9.80	(7.19 - 12.76)	3.74	(3.11 - 4.52)	4.70	(3.24 - 6.59)	692.0	(551.2 - 870.8)				
禁煙	9.21	(6.73 - 10.66)	0.272	3.72	(3.20 - 4.15)	0.465	4.68	(3.76 - 8.75)	0.553	649.0	(595.8 - 798.8)	0.260
現在喫煙	11.54	(9.98 - 13.37)	3.40	(2.92 - 3.82)	5.20	(4.09 - 6.70)	818.8	(639.1 - 1078.4)				
運動習慣												
しない	10.00	(7.07 - 12.78)	3.82	(3.19 - 4.59)	4.74	(3.07 - 6.56)	678.1	(558.9 - 883.5)				
<1回/週	10.28	(8.30 - 12.32)	0.763	3.48	(2.90 - 4.08)	0.269	4.71	(4.02 - 6.46)	0.567	599.5	(532.7 - 714.7)	0.199
≥1回/週	9.76	(7.20 - 13.03)	3.71	(3.09 - 4.47)	4.79	(3.43 - 6.95)	728.4	(584.8 - 870.8)				
睡眠時間 (時間/日)												
< 7	10.00	(7.19 - 13.32)	3.69	(3.06 - 4.38)	4.88	(3.45 - 6.54)	670.8	(538.7 - 871.3)				
7-8	9.90	(7.56 - 12.69)	0.568	3.78	(3.16 - 4.57)	0.019	4.60	(2.93 - 7.01)	0.626	730.7	(595.8 - 867.3)	0.899
≥ 8	8.57	(6.45 - 10.97)	4.11	(3.60 - 5.41)	4.58	(2.81 - 5.77)	728.7	(607.5 - 842.5)				
身体状況												
BMI (Body Mass Index)												
<18.5 kg/m ²	12.63	(10.81 - 18.07)	3.18	(2.76 - 3.93)	4.72	(3.15 - 7.07)	706.8	(613.7 - 1023.0)				
18.5-25	10.02	(7.34 - 13.45)	<.0001	3.70	(3.10 - 4.41)	0.004	4.90	(3.48 - 6.70)	0.077	690.2	(547.9 - 870.8)	0.642
≥25	7.66	(5.93 - 10.46)	4.21	(3.34 - 4.81)	3.88	(1.13 - 6.13)	691.6	(600.5 - 830.1)				
高血圧												
あり	9.34	(6.91 - 12.64)	0.081	3.85	(3.30 - 4.73)	0.030	4.65	(3.14 - 6.41)	0.683	746.4	(605.3 - 909.9)	0.032
なし	10.32	(7.25 - 12.84)	3.63	(3.07 - 4.35)	4.77	(3.34 - 6.77)	670.8	(544.2 - 853.3)				
脂質異常症												
あり	9.98	(7.20 - 12.76)	0.738	3.73	(3.08 - 4.49)	0.849	4.55	(3.00 - 6.26)	0.008	673.6	(551.2 - 845.0)	0.090
なし	9.83	(7.19 - 12.78)	3.72	(3.14 - 4.46)	4.99	(3.91 - 7.56)	718.9	(571.5 - 899.8)				
糖尿病												
あり	7.41	(6.24 - 9.22)	0.003	4.44	(2.69 - 5.03)	0.374	2.87	(1.13 - 4.54)	<.001	715.7	(607.5 - 840.7)	0.781
なし	10.11	(7.25 - 13.15)	3.71	(3.10 - 4.43)	4.88	(3.44 - 6.84)	689.0	(556.7 - 870.7)				
身体機能												
歩行速度												
遅い	9.85	(7.53 - 11.57)	3.72	(3.17 - 4.60)	4.59	(2.74 - 5.49)	697.0	(602.9 - 896.6)				
普通	10.00	(7.23 - 13.34)	0.293	3.78	(3.11 - 4.48)	0.733	4.77	(3.29 - 6.70)	0.173	708.2	(556.6 - 874.1)	0.623
速い	9.45	(5.85 - 12.58)	3.51	(3.05 - 4.27)	4.97	(3.67 - 6.84)	632.1	(534.3 - 830.1)				
握力												
下位1/2	9.81	(7.36 - 13.32)	0.855	3.61	(3.10 - 4.25)	0.697	3.91	(1.70 - 5.34)	0.089	716.5	(585.4 - 871.3)	0.271
上位1/2	10.08	(7.95 - 13.05)	3.68	(3.07 - 4.57)	4.39	(3.29 - 6.32)	670.1	(523.9 - 907.9)				

検定方法 ^aLog変換後、t testまたはOneway Anova; ^bWilcoxon/Kruskal-Wallis Tests

サブコホート特性別に測定値を比べた。

各マーカーの死亡者の平均値をサブコホート全体と比べると、Angptl2 は男女とも死亡例で高く、CML は女で死亡例に低い傾向であったが、その他は両群に大きな差はなかった。

表2. サブコホート・死亡例別平均値

		男			女		
		N	平均値	標準偏差	N	平均値	標準偏差
アディポネクチン	サブコホート	363	6.87	3.06	354	10.72	5.08
	死亡例	184	7.30	3.89	76	11.03	4.31
ANGPTL2	サブコホート	363	3.95	1.28	354	3.94	1.21
	死亡例	183	4.30	1.90	76	4.33	1.86
CML	サブコホート	335	5.59	11.95	331	5.52	5.05
	死亡例	154	4.62	2.69	70	4.39	1.96
α -Klotho	サブコホート	361	772.62	527.53	354	759.96	401.15
	死亡例	183	805.98	464.96	76	798.13	396.74

各マーカーの死亡者の平均値をサブコホート全体と比べた。Angptl2 は男女とも死亡例で高く、CML は女で死亡例に低い傾向であった。

考 察

65歳の者のみで構築したコホート研究で保管してきた血漿を利用し、アディポネクチン、Angptl2、CML、 α -Klothoの長寿マーカーとしての意義を検討した。プレリミナリな結果ではあるが、Angptl2は死亡例で高く、CMLは死亡例で低いという結果を得た。

Angptl2はメタボリック・シンドローム、糖尿病に関連するマーカーとして、近年、注目を集めている。今回の検討でもサブコホート対象者では、男女ともBMI25以上で高く、また男では脂質異常症、糖尿病状態が高いなど、今までの知見と同様の結果を得た。さらに、死亡者ではサブコホート構成者と比較し、高値を示した。一方、CMLは加齢に伴い値があがることが知られていることから考えると、今回の結果は矛盾していた。CMLは1キットで異常値が出たため検討対象から除外したが、その他にもサブコホート例に大きく外れ値を示した者があり、その影響を受けている可能性もある。今後、詳細に検討したい。

本研究では、高齢期の始まりでありほとんどの者が元気な65歳の時点における生活習慣、身体状態、そしてそれらの複合としての血中マーカーが、その後の検査所見、体力、認知機能、満足度など心身共に健康であることにどのように貢献するのかを検討することを目的とした。測定に予定より時間を要したため、ケースコホートデザインでの解析までは至らなかった。しかし、今回の測定結果を基に得られる結果は、今後さらに増加する高齢者が、元気ですこやかに過ごすための基礎資料となり、現在関心の高い健康寿命の延伸への貢献が見込まれる。また、国内で65歳と年齢を限定した高齢者対象コホート研究はこれが初である。コホート研究で対象者の年齢が高すぎると高齢期を生き残った一部のスーパー高齢者での検討となってしまうこと、日本では現在でも多くの者が65歳までに定年を迎えそれを境に生活習慣や社会とのかかわりが大きく変化すること、特定の年齢に限定することで背景となる社会文化的要因を揃えることができること、などから、今回の一市に在住する65歳を対象としたコホート研究で老化、長寿に関連する血中マーカーを検索し、生活習慣等とあわせて予後との関連を検討することは、単に研究面だけでなく、現場での応用面からも有意義であることから、引き続き解析を進める予定である。

本コホート研究は現在も追跡を継続していることから、70歳以降の死亡、要介護状態への移行等との関連についても、今回測定する各項目値との関連を検討することが今後可能となり、さらに長期的な影響についても明らかにできる見込みである。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学環境安全保健機構の川村 孝、あいち健康の森健康科学総合センターの津下一代、名古屋大学大学院医学系研究科の若井建志である。本研究遂行のため、検体を測定くださった藤田保健衛生大学医療科学部の鈴木康司先生、熊本大学大学院生命科学研究部の尾池雄一先生に深謝いたします。また、長期に渡るコホート研

究を支えてくださっている日進市保健センターの皆さま，ならびに研究参加者の皆さまに感謝申し上げます。最後に，本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 第 21 回生命表（完全生命表）の概要. http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/21th/dl/21th_05.pdf
- 2) Vaiopoulos, A. G., Marinou, K., Christodoulides, C. & Koutsilieris, M. : The role of adiponectin in human vascular physiology. *Int. J. Cardiol.*, **155** : 188-193, 2012.
- 3) Doi, Y., Ninomiya, T., Hirakawa, Y., Takahashi, O., Mukai, N., Hata, J., Iwase, M., Kitazono, T., Oike, Y. & Kiyohara, Y. : Angiotensin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama study. *Diabetes Care*, **36** : 98-100, 2013.
- 4) Hanssen, N. M., Beulens, J. W., van Dieren, S., Scheijen, J. L., van der A, D. L., Spijkerman, A. M., van der Schouw, Y. T., Stehouwer, C. D. & Schalkwijk, C. G. : Plasma advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular events in individuals with type 2 diabetes: a case-cohort study with a median follow-up of 10 years (EPIC-NL). *Diabetes*, **64** : 257-265, 2015.
- 5) Semba, R. D., Cappola, A. R., Sun, K., Bandinelli, S., Dalal, M., Crasto, C., Guralnik, J. M. & Ferrucci, L. : Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66** : 794-800, 2011.
- 6) Kitamura, T., Kawamura, T., Tamakoshi, A., Wakai, K., Ando, M. & Ohno, Y. : Rationale, design, and profiles of the New Integrated Suburban Seniority Investigation (NISSIN) Project: a study of an age-specific, community-based cohort of Japanese elderly. *J. Epidemiol.*, **19** : 237-243, 2009.