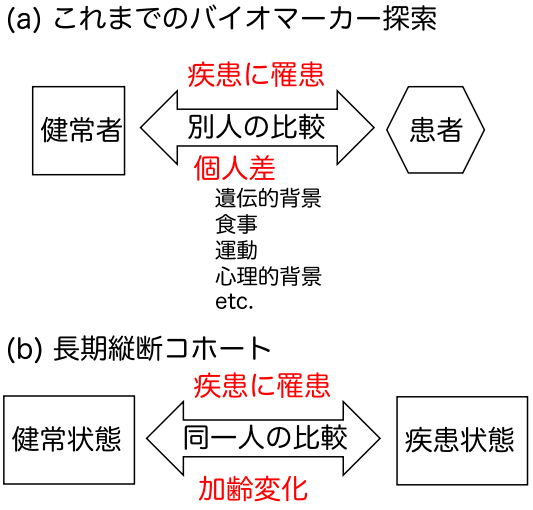
14　初期フレイルのバイオマーカー探索	三浦　ゆり

【目的】フレイルは、サルコペニアとともに高齢者の QOL を低下させる大きな原因となっている。運動機能の低下を初期のうちに発見し速やかに介入を行うことは、高齢者が健康な生活をおくるための大きな目標であり、このため高い精度で判定できる診断マーカーの策定が求められている。ところがこれまで、プロテオミクスによる疾患バイオマーカー探索研究は、別人である「患者」と「健常者」を比較していたため個人差によるばらつきが大きく、疾患に起因する変化を見つけることが難しかった。そこで本研究では長期縦断コホートとプロテオミクス（タンパク質の網羅的解析）及びグライコミクス（糖鎖の網羅的解析）を組み合わせて、個人ごとに「健常時」と「運動機能低下時」の比較を行い、フレイルを初期の段階で発見する診断指標を開発することを目的とする。

【方法】解析対象者は、長期縦断コホート SONIC（Septuagenarians、Octogenarians、Nonagenarians Investigation with Centenarians） の参加者から抽出した。SONIC は、3 年ごと、20 年間の予定で行われる大規模長期縦断研究である。今回は、初回調査時（1 wave）の年齢が 70 歳（1,000 名）を対象とし、運動機能調査のデータをもとに、3 年後（2 wave）及び 6 年後（3 wave）の追跡調査において、継続的に一定以上、握力が低下したグループを「低下群」、握力が維持された群を「安定群」として抽出した。解析対象者の 1 wave と 3 wave の血漿について、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法 （2D-DIGE）を用いてプロテオーム解析を行った。得られた二次元電気泳動画像を解析し、同一対象者ごとに 1 wave と 3 wave の画像を比較し、スポットの発現量（相対蛍光強度）が 1 wave に比べて 1.5 倍以上変化し、かつ分散分析により有意な変化（$p<0.05$）を示したスポットを、発現の変動したスポットとして抽出し、タンパク質の同定を行った。

【結果】SONIC 調査に 3 回連続して参加した 70 代、488 人の中から、握力低下群として 23 人（男性 9 人、女性 14 人）、安定群として 23 人（男性 9 人、女性 14 人）を抽出した。2D-DIGE を行った結果、低下群において握力低下前（1 wave）に比べて低下後 （3 wave）に発現が増加したスポットが 11、低下したスポットが 24 あった。これらをバイオマーカー候補スポットとした。これらのスポットのタンパク質を同定したところ、プロテアーゼインヒビターなどが増加し、ヘモグロビン結合タンパク質などが減少することが明らかになった。しかし、同じタンパク質と同定されるスポットのうち、特定のスポットだけがバイオマーカー候補となっている場合もあり、翻訳後修飾、即ち糖鎖修飾を含めて解析する必要性が示唆された。

バイオマーカー探索研究において長期縦断コホートを用いる利点



14. 初期フレイルのバイオマーカー探索

三浦　ゆり

東京都健康長寿医療センター 老化機構研究チーム プロテオーム研究

Key words：フレイル，バイオマーカー，長期縦断コホート，プロテオミクス，グライコミクス

緒　言

日本における高齢化は世界のどの国よりも早い速度で進行し、2019 年には 65 歳以上が総人口の 28.4%を占めるまでに至った。この超高齢社会を健全に維持するためには“健康寿命を延ばすこと”が最も重要だと考えられる。しかしながら、フレイルは日本の後期高齢者における要介護の原因の 1 位であり、高齢者の生活の質を低下させ、健康寿命を損なう大きな原因となっている。

2001 年に Fried が提唱したフレイルの基準は次の 5 項目である。フレイルはこれらの 3 項目以上に該当した場合、プレ・フレイルは 1〜2 項目に該当した場合と定義した［1］。

1. 体重減少：意図しない年間 4.5 kg または 5%以上の体重減少
2. 疲れやすい：何をするのも面倒だと週に 3〜4 日以上感じる
3. 歩行速度の低下
4. 握力の低下
5. 身体活動量の低下

一方でフレイルは「適切な介入・支援により、生活機能の維持向上が可能な状態」と定義されている。そのため、このようなフレイルの諸症状を初期のうちに発見し、速やかに介入を行うことが非常に重要であり、初期フレイルの状態を客観的に判定できる診断マーカーの策定が求められている。

フレイルには身体的な要因、精神心理的要因、社会的要因が複雑に関与しており、遺伝的要因よりも環境的要因（運動習慣、栄養状態、精神状態、社会的状況など）に大きく依存すると考えられる。そのためバイオマーカーを探索する際には、環境的要因を高感度に反映するバイオマーカー、即ち、タンパク質やその翻訳後修飾を指標とするバイオマーカーを策定することが有用であると考えられる。

ところが、今までのプロテオミクスによる疾患バイオマーカー探索研究は、別人である「患者」と「健常者」を比較していたため個人差によるばらつきが大きく、多くの検体数を解析してもなお、疾患に起因する変化を見つけることが難しかった。そこで本研究では、長期縦断コホートを用いて個人ごとに「健常状態」と「機能低下状態」の比較を行い、個人差のばらつきを抑制した効率の良い診断指標の開発に取り組む。さらに、プロテオミクス（タンパク質の網羅的解析）とグライコミクス（糖鎖の網羅的解析）を組み合わせることで、タンパク質の発現変化のみならず、機能の変化にも迫れるものと考える。運動機能低下によって変化するタンパク質や糖鎖の発症機序への関与を分子レベルで明らかにし、フレイルの予防戦略の開発にもつなげることを目的とする。

本研究が用いる長期縦断コホート（SONIC：Septuagenarians、Octogenarians、Nonagenarians Investigation with Centenarians）は、2010 年に始まり 20 年間の予定で行われる大規模長期縦断研究である。特定の地域を対象として行われることが多く、地域性が大きく影響していた従来型の縦断研究と異なり、対象者の居住地は関東と関西の都市部と非都市部を網羅している。初回調査時の年齢が 70 歳（1,000 名）、80 歳（1,000 名）、90 歳（600 名）を調査対象とし、同一対象者について 3 年毎に行う会場招待型の調査である。運動機能（バランス、歩行、握力等）、血液検査（生化学検査など）、問診、エコー検査などの医学的調査だけでなく、栄養・口腔内環境調査、心理・社会学的調査、認知機能検査（MoCA-J、MMSE）など幅広いデータ収集を行う

ため、多因子の関連するフレイルの研究にはきわめて有利である。SONIC コホートを用いることで、個人ごとに「健常時」と「運動機能が低下した時」を比較することが可能となるため、個人差によるばらつきを抑制し、運動機能低下を反映した変化を見いだせると考える。

プロテオーム解析を用いたフレイルに関するバイオマーカー探索は、認知症など他の老化関連疾患に比べ非常に報告が少ない。既存の報告においても、少ない検体数で健常者とフレイル患者を比較しており［2，3］、個人差のばらつきを多く含むものと考えられる。大規模縦断コホートを用いて、個人ごとに変化を比較する本研究はきわめて独創性が高い。

方　法

1.　実験の概要

次の手順でバイオマーカー候補タンパク質を探索した（現時点で 5）まで終了）。

1）　解析対象者の抽出

SONIC 調査に 3 回連続して参加した 70 代参加者の握力データを基に、「低下群」と「安定群」を抽出した。

2）　「低下群」の握力低下前後のプロテオーム比較

低下群の初回調査（1 wave）と 6 年後調査（3 wave）、即ち握力低下前と低下後の血漿サンプルのプロテオームについて、2D-DIGE 法を用いて比較解析し、発現変動したタンパク質スポットを調べた。

3）　「安定群」の 6 年間のプロテオーム比較

安定群の 1 wave と 3 wave を比較し、同様に発現変動したタンパク質スポットを調べた。

4）　バイオマーカー候補スポットの抽出

同一対象者の握力低下前と低下後を比較する本研究では、個人差を抑制することはできるが、対象者の経年による変化（加齢変化）を同時に検出する可能性があると考えられる。そこで、低下群において発現変動したタンパク質スポットの中から、安定群においても同様に発現変動したスポット（加齢変化を反映すると考えられる）を除き、低下群においてのみ発現変動したタンパク質スポットを「握力低下のバイオマーカー候補スポット」とした。

5）　タンパク質の同定

これらの候補スポットのタンパク質は、インゲル消化と質量分析を組み合わせて同定した。

6）　糖ペプチド解析による糖鎖構造の同定

7）　バイオマーカー候補糖ペプチドの有用性の検証

2.　解析対象者の抽出

男女別に、1 wave、2 wave、3 wave において、握力が連続的に低下した参加者を「低下群」として抽出した。また対照として、1 wave、2 wave、3 wave において握力が変化しなかったグループを「安定群」として抽出した。安定群の抽出に当たっては傾向スコア解析を用い、性別、体重、居住地域、教育年数等、運動機能に影響を与える可能性がある他の因子が、低下群とほぼ同じ分布になるよう配慮した。

3.　検体の前処理

血漿は、タンパク質のダイナミックレンジが大きく、メジャーなタンパク質がマイナーなタンパク質の検出を妨害する。そこで、血漿中に最も多く存在するタンパク質であるアルブミンと IgG を、Albumin & IgG depletion spin trap（GE ヘルスケア）を用いて取り除いた。

4.　二次元電気泳動によるプロテオミクス

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法（2D-DIGE）を用いてプロテオミクスを行った。蛍光スキャナー（Typhoon FLA9500：GE ヘルスケア）を用いて二次元電気泳動像を取得し、Progenesis SameSpots（TotalLab）を用いてスポットのアラインメント、バックグラウンド補正等を行った。また、それぞれのスポットの発現量は、同時に泳動した標準サンプルの蛍光強度を用いてノーマライズした。同一対象者ごとに 1 wave と 3 wave の

画像を比較し、スポットの発現量（相対蛍光強度）が 1 wave に比べて 1.5 倍以上変化し、かつ分散分析により有意な変化（$p<0.05$）を示したスポットを、発現の変動したスポットとして抽出した。

バイオマーカー候補スポットについては、自動スポットピッキング装置（Ettan Spot Picker : GE ヘルスケア）を用いて電気泳動ゲルからスポットを切り取り、トリプシンによるゲル内消化を行った。トリプシン消化物を、ナノ LC オートインジェクタースポッターシステム（KYA Technology）を用いて分離後、質量分析（MALDI-TOF/TOF 5800、SCIEX）を行った。得られたペプチドの質量分析データについて Protein Pilot™（SCIEX）を用いてデータベース検索し、タンパク質を同定した。

結果および考察

1. 解析対象者の抽出

SONIC 調査に 3 回連続して参加した 70 代、488 人の中から、握力低下群として 23 人（男性 9 人、女性 14 人）、安定群として 23 人（男性 9 人、女性 14 人）を抽出した。それぞれの群の握力の変動は図 1 に示す。

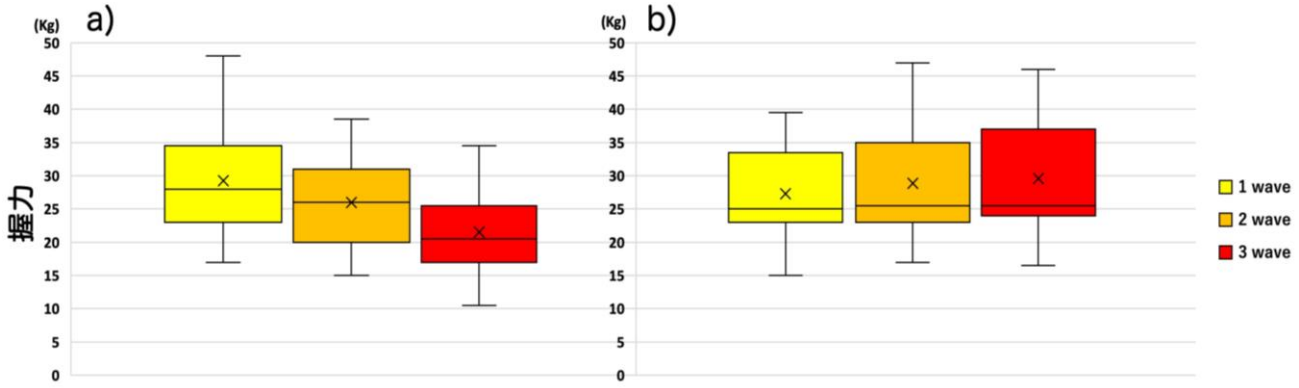


図 1. 解析対象者の握力の変化

6 年間にわたる 3 回の SONIC 調査（1 wave、2 wave、3 wave）に参加した 70 代 488 人の中から、連続的に握力が低下した「低下群」を抽出した。低下群の対照として、握力が低下せず、性別、体重、居住地域、教育年数などが低下群と同様の分布を示す「安定群」を抽出した。

1 wave における低下群と安定群の握力に有意差はなかった（t-検定、$p=0.3942$）が、3 wave においては有意差が認められた（t-検定、$p=0.0007$）a）低下群の握力変化　b）安定群の握力変化

×は平均値

2. 2D-DIGE による握力低下のバイオマーカー候補スポットの絞り込み

低下群 23 人及び安定群 23 人の 1 wave と 3 wave の検体、合計 92 検体について、2D-DIGE 法による二次元電気泳動画像を得た。Progenesis SameSpots を用いて画像解析を行った結果、1 検体につき 393 スポットを検出し、それぞれのスポットの相対発現量を算出した。まず低下群について、個人ごとに 1 wave と 3 wave のスポットの相対発現量を比較した後 23 人分を合算し、低下群において発現変動したスポットを明らかにした（Fold change≧1.5 and $p<0.05$）。その結果、低下群において握力低下前に比べて発現が増加したスポットは 27、発現が減少したスポットは 29 であった。次に安定群について、同様に 6 年間での発現変化を調べたところ、発現が増加したスポットは 26、減少したスポットは 9 であった。低下群と安定群の両方で同様に変化しているスポットを除き、低下群のみで変化するスポットを抽出したところ、増加したスポット 11、低下した 24 であった。これらをバイオマーカー候補スポットとした。

3. タンパク質の同定

これらのスポットをゲルから切り取り、トリプシンを用いたゲル内消化を行ってタンパク質を同定したところ、プロテアーゼインヒビターなどが増加し、ヘモグロビン結合タンパク質などが減少することが明らかになった。

また、同じタンパク質と同定されるスポットのうち、特定のスポットだけがバイオマーカー候補となっている場合もあり、タンパク質の糖鎖修飾を含めて解析する必要性があることが示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京都健康長寿医療センター研究所の川上恭司郎研究員、早稲田大学の小野口航博士、SONIC コホートの石﨑達郎博士、増井幸恵博士（以上 東京都健康長寿医療センター研究所）、権藤恭之博士、神出計博士、池邉一典博士（以上 大阪大学）、新井康通博士（慶応大学）との共同研究として行われたものです。ここに深く感謝いたします。

文　献

1） Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2001;56(3):M146-56. Epub 2001/03/17. PMID: 11253156 DOI: 10.1093/gerona/56.3.m146.

2） Lin CH, Liao CC, Huang CH, Tung YT, Chang HC, Hsu MC, et al. Proteomics analysis to identify and characterize the biomarkers and physical activities of non-frail and frail older adults. Int J Med Sci. 2017;14(3):231-9. Epub 2017/04/04. PMID: 28367083 DOI: 10.7150/ijms.17627.

3） Shamsi KS, Pierce A, Ashton AS, Halade DG, Richardson A, Espinoza SE. Proteomic screening of glycoproteins in human plasma for frailty biomarkers. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012;67(8):853-64. Epub 2012/01/06. PMID: 22219522 DOI: 10.1093/gerona/glr224.