

【総説】

血液メタボロミクスによる老化マーカー同定

照屋 貴之¹⁾、柳田 充弘¹⁾、近藤 祥司²⁾

¹⁾ 沖縄科学技術大学院大学・G0 細胞ユニット

²⁾ 京都大学医学部附属病院・高齢者医療ユニット、糖尿病内分泌栄養内科

要約

血液メタボローム (全ての代謝産物プロファイル) は、遺伝、エピジェネティクス、生活習慣、健康状態等を反映しうる。適切な手法 (安定な試料、高性能分析機器、データ解析) を用いれば、血液を通じて健康・老化・疾患状態の情報を読み取ることが可能となる。我々は、独自のヒト血液メタボローム分析系を構築し、126 代謝物を同定した。各代謝物に関し、①日周変動の有無、②赤血球に豊富かどうか、③個人差の程度を分類した上で、健常な若年と高齢の血液メタボローム比較解析を行い、老化マーカーと呼べる代謝物 14 個を見出した。それらは、抗酸化、尿排出や窒素代謝、骨格筋など、老化関連生理機能を反映すると推測される。本稿では、我々の研究を通じてメタボロミクスによる老化研究について議論する。

キーワード：血液メタボローム、老化、赤血球、変動係数、相関係数

1. はじめに

メタボロミクスとは、生体中で起きている生化学反応によって生じる代謝物全体 (メタボローム) の網羅的解析である。質量分析計や核磁気共鳴装置 (NMR) により代謝物の定性的・定量的データを得るその技術は臨床検査に一部応用されつつある。新生児マススクリーニング (先天性代謝異常等検査) では、アミノ酸およびアシルカルニチンの一斉分析によって 16 疾患の診断に有用であり、法医学の分野では薬毒物分析に用いられている。分析技術の発達により、少量の生体試料から一度に数百の化合物を高感度・高精度に検出できるようになったことで、特異な代謝変動 (疾患マーカーなど) の発見効率が向上した。今後もより多くの疾患の診断に適用されると期待される。

近年、ヒトの老化に関するメタボローム研究から知見が得られ始めている。血液を対象にした多くの研究では従来、非細胞成分である血漿あるいは血清を対象に行わ

れてきた。その一因として、細胞由来代謝物を安定にハンドリングする難しさが挙げられる [1]。そこで、我々は代謝反応を迅速に停止し、分解や変化を抑えるための手法を追求し、全血 (Blood)、血漿画分 (Plasma)、血球画分 (RBC) の 3 種について分析を行った。後述するように、結果として再現性のある血球 (容積の 99% が赤血球) 由来代謝物データの取得に成功し、赤血球が老化研究の対象材料として有用であることが明らかになった。

2. 分析サンプルの調製、測定、データ解析

血液メタボローム研究を進めるためには、適切な試料調製法、再現性に優れた分離・検出法 (クロマトグラフィと質量分析計など)、膨大なデータの中から意義のある情報を抽出するためのデータ処理法などが必要である。我々は、過去に報告された手法 [2-4] に改良を加え、以下に概略する手法 [5, 6] を確立した。ヘパリン採血した静脈血サンプルを、全血、血漿、血球の 3 種について直ちに 55% メタノールで急速冷却する。それぞれのサンプル中に内部標準物質 HEPES および PIPES (10 nmol) を加えて混和し、フィルター濾過 (10 kDa cut-off) にてタンパク質等の高分子を除去する。エバポレーターにより溶媒除去後、50% アセトニトリルに再溶解し、測定サンプルとする。

連絡先：近藤祥司 〒 606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町 54

TEL : 075-751-3465

FAX : なし

E-mail : hkondoh@kuhp.kyoto-u.ac.jp

メタボローム分析には、両性イオン型官能基が充填剤に用いられた親水性相互作用カラム ZIC-pHILIC (メルクミリポア)を採用している。移動相にはアセトニトリルと炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.3) が用いられる。検出にはフーリエ変換型リニアイオントラップハイブリッド質量分析計 LTQ Orbitrap (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用い、イオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) による。測定はネガティブイオン化モードおよびポジティブイオン化モードで行われ、データ依存の MS/MS 法にて自動的にフラグメンテーションスキャンを行っている。

これらの組み合わせにより、代謝物ごとに特異的な①分離カラムでの保持時間、②質量電荷比 (m/z)、③MS/MS フラグメントパターンが得られ、それらの3つの情報を基に代謝物を同定することが可能となる。実際には、標準化合物の測定データとの比較によって同定するので、データベースの構築も重要である (類似性の高

い異性体同士では、得られる情報も酷似するため区別することが難しい場合がある)。分子イオンのシグナル強度 (ピーク面積) は代謝物量と関連するので、サンプル間での相対的な比較は可能である。しかし、個々の代謝物ごとにイオン化効率が異なるため、同じ量の代謝物であっても種類ごとにシグナル強度は異なる。そのため、絶対定量においては標準化合物を用いた希釈系列測定による検量線の作成を必要とする。また、メタボロームには標準化合物が入手不可であるために同定できない代謝物データが多く含まれている。これらの未同定代謝物の化学構造を決定するには、最終的には分取・精製し、NMR 等で測定する必要がある。データ処理には代謝物解析用ソフトウェア MZmine 2 を用い、生データのスムージングやベースラインの補正処理、同位体由来ピークの識別などが施される。結果として我々は 126 代謝物を同定した (表 1)。

表 1 変動係数ごとの血液代謝物リスト (下線の代謝物の CV 値は、過去にデータなし。文献 10 より改変)

CV値	主な検出サンプル	代謝物の数	代謝物
<0.3	plasma	14	1-methyl-adenosine, 1-methyl-guanosine, arginine, asparagine, carnitine, glutamine, <u>glutarate</u> , histidine, methionine, methyl-histidine, myo-inositol, phenylalanine, tryptophan, tyrosine
	RBC	14	ADP, ATP, creatine, <u>diphospho-glycerate</u> , <u>fructose-6-phosphate</u> , <u>glucose-6-phosphate</u> , glutamate, glutathione disulfide, <u>malate</u> , <u>N-acetyl-glucosamine</u> , NAD^+ , <u>phosphoglycerate</u> , <u>UDP-glucose</u> , urate
0.3-0.4	plasma	15	butyryl-carnitine, citrulline, citrate, <u>cis-aconitate</u> , creatinine, CTP, cytidine, dimethyl-arginine, isoleucine, hypoxanthine, leucine, lysine, serine, taurine, uridine
	RBC	13	<u>6-phosphogluconate</u> , AMP, <u>butyro-betaine</u> , <u>citramalate</u> , <u>GDP</u> , <u>gluconate</u> , <u>glycerol-2-phosphate</u> , GTP, <u>IMP</u> , NADP^+ , <u>pentose-phosphate</u> , trimethyl-lysine, <u>UDP</u>
0.4-0.5	plasma	18	1,5-anhydroglucitol, adenosine, <u>arginino-succinate</u> , <u>CDP-choline</u> , <u>CDP-ethanolamine</u> , dimethyl-guanosine, <u>dimethyl-lysine</u> , glucose, <u>glucosamine</u> , <u>glycerate</u> , glycerophosphocholine, <u>N6-acetyl-lysine</u> , kynurenine, ornithine, proline, threonine, <u>UTP</u> , valine
	RBC	4	acetyl-carnitine, <u>ophthalmic acid</u> , <u>phosphocreatine</u> , propionyl-carnitine
0.5-0.7	plasma	9	2-oxoglutarate, betaine, <u>dimethyl-xanthine</u> , indoxyl-sulfate, <u>N2-acetyl-lysine</u> , N-acetyl-arginine, <u>N-acetyl-aspartate</u> , <u>N-acetyl-(iso)leucine</u> , xanthine
	RBC	13	adenine, aspartate, ergothioneine, <u>GDP-glucose</u> , <u>GMP</u> , <u>N-acetyl-glutamate</u> , <u>nicotinamide</u> , <u>S-methyl-ergothioneine</u> , sedoheptulose-7-phosphate, <u>succinate</u> , <u>trimethyl-histidine</u> , <u>UDP-acetyl-glucosamine</u> , <u>UDP-glucuronate</u>
0.7-1.0	plasma	3	caffeine, hexanoyl-carnitine, <u>methyl-lysine</u>
	RBC	8	carnosine, dimethyl-proline, <u>glyceraldehyde-3-phosphate</u> , pantothenate, S-adenosyl-homocysteine, S-adenosyl-methionine, tetradecanoyl-carnitine, <u>UMP</u>
1.0-2.5	plasma	12	<u>4-aminobenzoate</u> , <u>4-guanidinobutanoate</u> , <u>acetyl-carnosine</u> , chenodeoxycholate, decanoyl-carnitine, dodecanoyl-carnitine, glycochenodeoxycholate, hippurate, isovaleryl-carnitine, N-acetyl-ornithine, octanoyl-carnitine, quinolinic acid
	RBC	3	<u>trimethyl-phenylalanine</u> , <u>trimethyl-tryptophan</u> , <u>trimethyl-tyrosine</u>

3. 血液代謝物の日周変動と個人差

血液メタボロームの基本情報として、どの代謝物がどの程度日周変動するかの検証をまず行った。4名のボランティアに朝食前、朝食後、昼食前、翌日の朝食前の4時点で採血を実施し、126代謝物の変化をモニターした結果、7%にあたる9代謝物が2.5倍以上の変動を示した。具体的には、グリコケノデオキシコール酸（二次胆汁酸）、アシルカルニチン（脂肪酸代謝物）、4-アミノベンゼン酸（ポリフェノール代謝物）、カフェインなどいずれも食事に関係する代謝物であった。逆に93%にあたる117代謝物の測定値は一定であり、大部分の血中代謝物レベルは恒常的に保たれていることがわかった。この結果は、過去の報告 [7-9] とよく合致する。

次に、30名（20歳代の若年者から80歳代の高齢者まで）の空腹時（朝食前）血液を用いて、126代謝物の個人差を評価した。表1には、変動係数（Coefficient variation, CV = SD/mean）に基づいて分類した代謝物の一覧を示した。個人差（標準偏差）が小さいほどCV値は低くなる。我々はCV値が0.4未満の代謝物を個人差の小さい代謝物と見なした。そこには、一部のアミノ酸やカルニチンの他、赤血球中に豊富なATP、グルタチオン、尿酸、解糖系のリン酸化糖などが属する。一方、CV値0.4以上では、グルコース（CV=0.40）のように中程度のばらつきをもつ代謝物から先に述べたカフェイン（CV=0.92）、グリコケノデオキシコール酸（CV=1.20）、4-アミノベンゼン酸（CV=2.18）等、生活習慣の違いに由来する個人差を表す代謝物が分類された。これら126代謝物のうち75代謝物についてCV値が過去の文献とほぼ合致し、残りの51代謝物（下線で示す）のCV値は過去に報告のない新規データであった [10]。

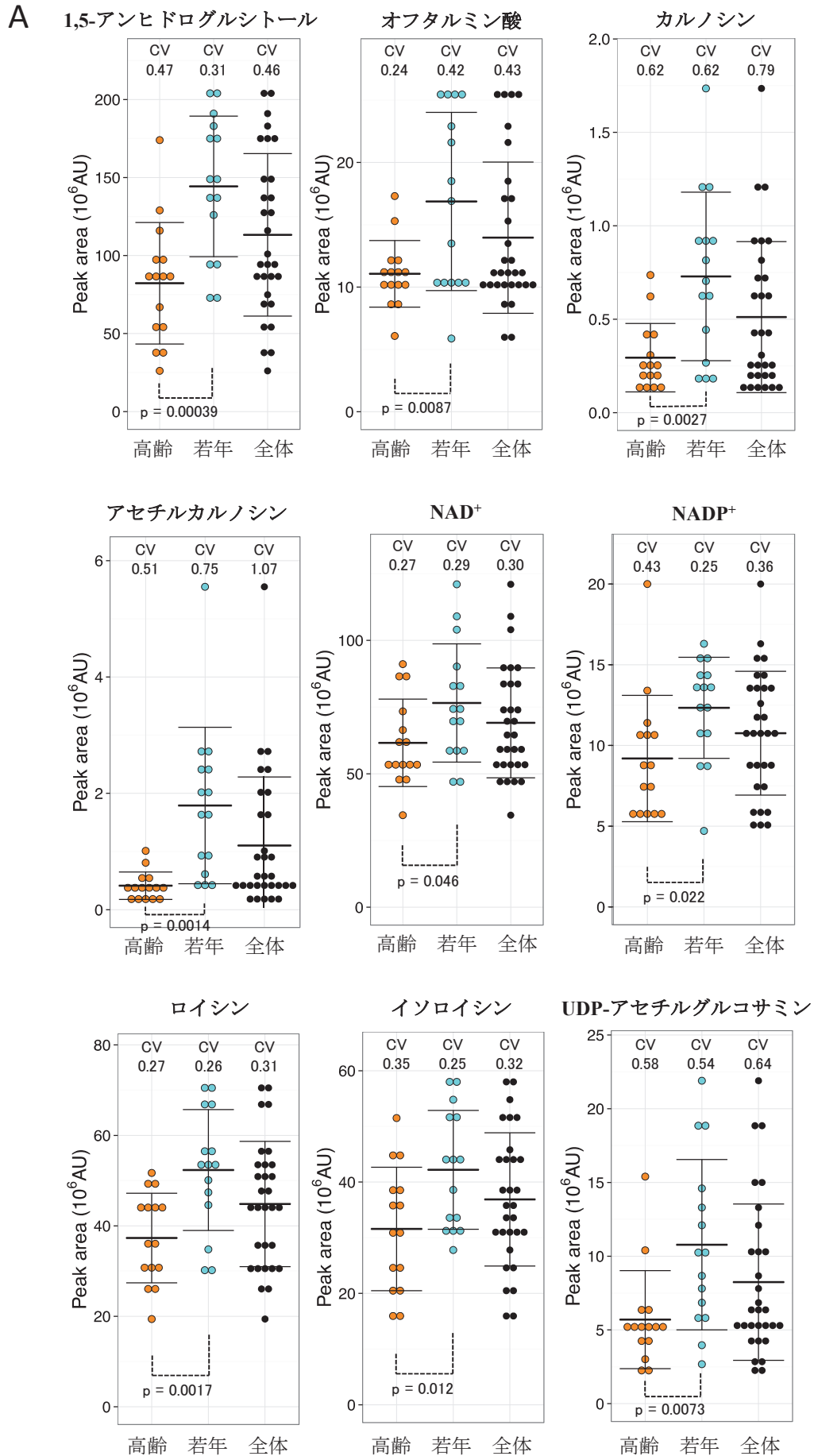
4. 老化に関する血液代謝物の同定

同定した126代謝物の中で、14代謝物（11%）に若年者（29 ± 4歳）と高齢者（81 ± 7歳）の間で統計学的有意差を認めた。高齢者で低下が見られたのは9代謝物であった（図1A）。1,5-アンヒドログルシトール（1,5-AG）は、糖尿病のマーカー（糖尿病で低値）として知られているが [11]、本研究の被験者のHbA1c値はいずれ

も正常である。健常者であっても老化に伴って1,5-AGの腎臓での再吸収能が低下し、尿中に漏出するため血中濃度が低下しているのかもしれない。酸化ストレスマーカーとして知られるオフタルミン酸は細胞内に大量に存在する抗酸化物質の一つであるグルタチオンの誘導体である。グルタチオン合成酵素によって産生される副産物であることから、グルタチオン合成活性の指標すなわち酸化ストレスマーカーと考えられている。カルノシンおよびアセチルカルノシンは抗酸化能をもつジペプチドで、筋肉や神経組織に豊富に存在し、疲労回復を担っているとも考えられている [12]。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリド（NADP⁺）は様々な酸化還元反応に関与する補酵素であり、これらの低下は赤血球における呼吸代謝能の低下を示唆している可能性などがある。ロイシン、イソロイシンは骨格筋の合成・分解に関与する重要な必須アミノ酸である [13]。UDP-アセチルグルコサミンは、グリコシル基転移酵素の基質であり、プロテオグリカンや糖脂質の合成に関与する代謝物である。

一方、若年者群に比べて高齢者群で高値を示した代謝物では、窒素の体外排出を担う尿素回路に関与するシトルリン、同じく窒素処理に関係するジメチルグアノシン、N-アセチルアルギニンに有意差を認めた（図1B）。これらの結果は、高齢者では尿素回路から尿中排出に至る窒素代謝能が低下していることを示唆している。尿素回路は肝臓および腎臓で活発なため、これらの機能低下が影響しているのかもしれない。パントテン酸は、クエン酸回路やβ酸化に関与する補酵素CoAの前駆物質である。

以上、若年者群と高齢者群で差が見出された14代謝物のうち、1,5-AG、シトルリン、パントテン酸については、過去にも同様の報告 [14-16] があり、11代謝物には既報が無かった。また、オフタルミン酸、カルノシン、UDP-アセチルグルコサミン、NAD⁺、NADP⁺、パントテン酸の6代謝物は血漿画分よりも赤血球画分に豊富な代謝物であることから [6, 10]、赤血球のメタボローム情報は老化研究において有用な材料になり得ると言える。



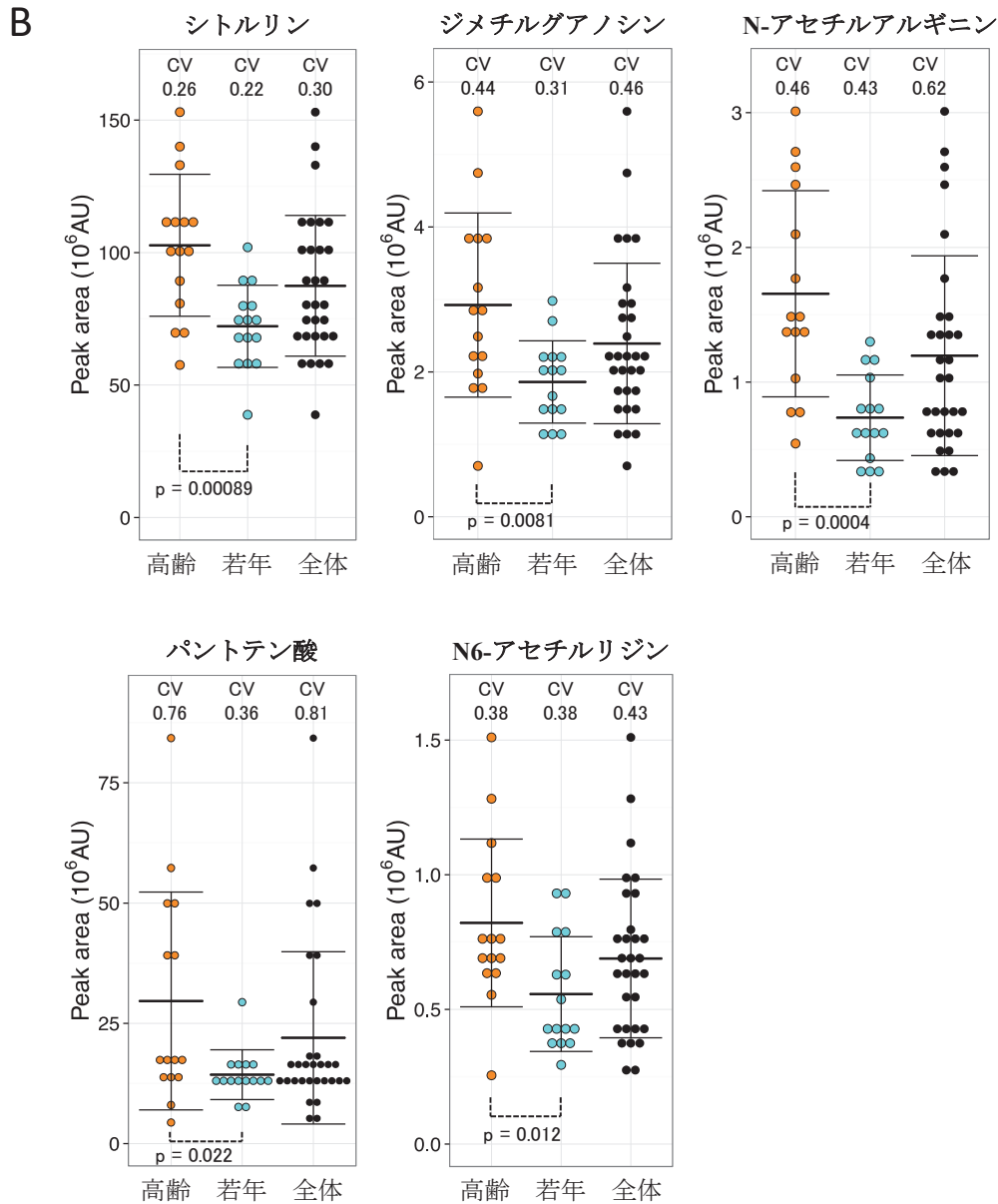


図1 若年者と比べ高齢者で有意な低下 (A) あるいは増加 (B) を認めた代謝物の全血サンプルにおける分布データ (文献 10 より改変)

5. 代謝物間の相関性評価

若年者と高齢者の間で差を示した 14 化合物について互いの相関性 (相関係数) を調べた。図 2 に概略図を示す。高齢者で増加している代謝物で、シトルリンは N6-アセチルリジン、N-アセチルアルギニン、ジメチルグアノシンとそれぞれ 0.84, 0.68, 0.64 と強い相関性を示した。また、高齢者で低下が認められたロイシンとイソロ

イシン (0.83)、カルノシンとアセチルカルノシン (0.73) の間でもそれぞれ強い相関性が示された。興味深いことに、高齢者で増加する代謝物群と低下する代謝物群に負 (逆) の相関 (<0.5) は認められなかった [10]。このことは、少なくとも独立した二つ以上の老化マーカー群の存在の可能性を示唆している。

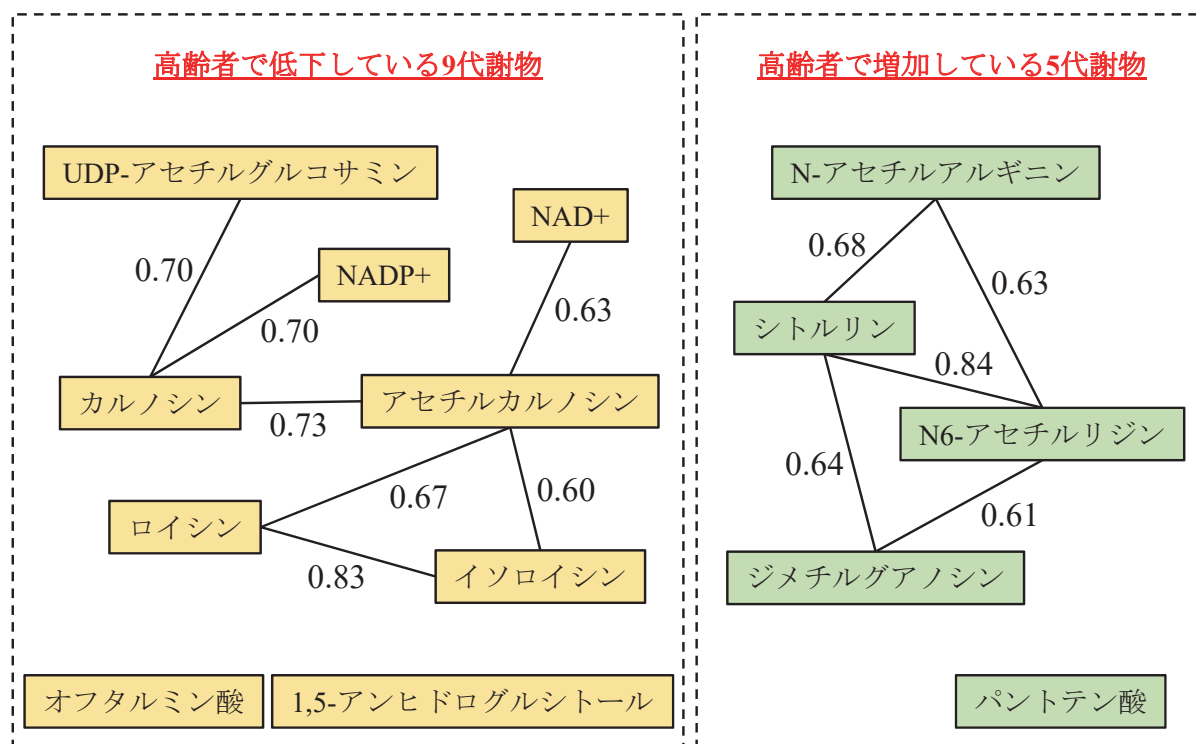


図2 老化関連代謝物の定量的データ相関（ピアソン相関係数。文献10より改変）

6. おわりに

全身の細胞代謝を橋渡しする血液メタボロームは“代謝物の好まざる滞留または欠乏”の側面あるいは両面を反映しているのかもしれない。高齢者では抗酸化能、窒素代謝能、腎臓・肝臓・筋肉機能が低下しておりメタボライトにも反映されるのかもしれない。これらの一つ一つの機能低下は老化において十分想定されるが、従来客観的指標に乏しかった。健常者であっても血液からこれだけ多くの老化に関連する情報が得られることは大変有意義である。

これまで様々なモデル生物を用いた老化研究が行われている一方、ヒト対象の老化研究は課題が多い。モデル生物に比べてヒトの寿命は非常に長く、老化現象は多様で複雑を極めることが一因かもしれない。特に、メタボロームのように環境的要因を含み、しかも増殖不可能な微量の生体情報を扱うには、適切な研究デザイン・分析手法が結果の信頼性を大きく左右する。先に述べたように、本研究で算出したCV値は過去の文献値（GC/MSやNMRなどの異なる分析系のデータ）とよく近似している（72%が±0.3の差）一方で、新規のCV値（51代謝物）の同定にも貢献した。これは、その科学的アプローチの新規性・確実性・正確性を含む総合的な分析能力が新規発見に結び付くことを端的に表している。

システム生物学の一分野として、血液メタボロミクスによる老化研究は、まだ開かれたばかりである。今後さらなる手法の改善により、老化に対する“化学的”理解が深まると期待される。血液メタボローム解析は、個人差を伴う複雑な変化を網羅的に捉えることで、広視野な老化度評価を可能にするという点より、その将来性や

応用は今後大きく期待される。

参考文献

1. Gil A, Siegel D, Permentier H, *et al.* Stability of energy metabolites-An often overlooked issue in metabolomics studies: A review. *Electrophoresis* 36: 2156-2169, 2015.
2. Zhang Y, A J, Wang G, *et al.* Organic solvent extraction and metabonomic profiling of the metabolites in erythrocytes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877:1751-1757, 2009.
3. Kinoshita A, Tsukada K, Soga T, *et al.* Roles of hemoglobin Allosterity in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis. *J Biol Chem* 282: 10731-10741, 2007.
4. Darghouth D, Koehl B, Junot C, *et al.* Metabolomic analysis of normal and sickle cell erythrocytes. *Transfus Clin Biol* 17: 148-150, 2010.
5. Pluskal T, Nakamura T, Villar-Briones A, *et al.* Metabolic profiling of the fission yeast *S. pombe*: quantification of compounds under different temperatures and genetic perturbation. *Mol Biosyst* 6: 182-198, 2010.
6. Chaleckis R, Ebe M, Pluskal T, *et al.* Unexpected similarities between the *Schizosaccharomyces* and human blood metabolomes, and novel human metabolites. *Mol Biosyst* 10: 2538-2551, 2014.

7. Kaya M, Moriwaki Y, Ka T, *et al.* Plasma concentrations and urinary excretion of purine bases (uric acid, hypoxanthine, and xanthine) and oxypurinol after rigorous exercise. *Metabolism* 55: 103-107, 2006.
8. Benowitz NL. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu Rev Med* 41: 277-288, 1990.
9. Campbell CB, McGuffie C, Powell LW, *et al.* Postprandial changes in serum concentrations of individual bile salts in normal subjects and patients with acute viral hepatitis. *Am J Dig Dis* 23: 599-608, 1978.
10. Chaleckis R, Murakami I, Takada J, *et al.* Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 4252-4259, 2016.
11. Dungan KM. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. *Expert Rev Mol Diagn* 8: 9-19, 2008.
12. Park YJ, Volpe SL, Decker EA. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J Agric Food Chem* 53: 4736-4739, 2005.
13. Buse MG, Reid SS. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *Journal of Clinical Investigation* 56: 1250-1261, 1975.
14. Ouchi M, Oba K, Yamashita H, *et al.* Effects of sex and age on serum 1,5-anhydroglucitol in nondiabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 120: 288-295, 2012.
15. Lawton KA, Berger A, Mitchell M, *et al.* Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics* 9: 383-397, 2008.
16. Pitkanen HT, Oja SS, Kemppainen K, *et al.* Serum amino acid concentrations in aging men and women. *Amino Acids* 24: 413-421, 2003.

Identification of aging makers by blood metabolomics

Takayuki Teruya¹, Mitsuhiro Yanagida¹ and Hiroshi Kondoh²

¹ G0 Cell Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST)

² Geriatric Unit, Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Abstract

Blood metabolome (the profiles for metabolites) represents individual differences in genetic or epigenetic factors, lifestyle and health state. It would be largely informative to understand the health status, aging and diseases. We have developed and established the analytical system of human blood metabolome. Metabolites are categorized in several ways; (1) daily variable or not, (2) enriched in red blood cells or not, (3) individually variable or not. We found 14 blood compounds that show significant differences between healthy young (29 ± 4 y of age) and elderly (81 ± 7 y of age) people. They might reflect the changes in anti-oxidative function, kidney or liver function, skeletal muscle, which are involved in aging-relevant physiological changes. In this paper, we review the metabolomics for aging research including our latest study.

Keywords : Blood metabolome, Ageing, Red blood cells, Coefficient of variation, Correlation coefficient