

<研究課題>

大規模長期縦断調査とプロテオミクス解析による初期フレイルのバイオマーカー探索

研究代表者 東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム（プロテオーム）

研究副部長 三浦ゆり

【まとめ】

本課題は、長期縦断コホートをを用いてフレイルによる血漿タンパク質の発現変化を調べ、初期フレイルのタンパク質バイオマーカーを探索することを目的とした。継続的な握力低下を指標としてコホートから解析対象者を抽出し、個人差による変動を排除した効率的なプロテオーム解析を行って、運動機能の低下による血漿タンパク質変化を明らかにした。これらのタンパク質は、初期フレイルのバイオマーカー候補と考えられる。

1. 研究の目的

フレイルは、サルコペニアとともに高齢者の Quality of Life (QOL)を低下させる大きな原因となっている。初期のフレイルを発見し速やかな介入を行うことは、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バイオマーカーの策定が社会的要請となっている。フレイルは遺伝的要因よりも環境的要因（運動習慣、栄養習慣、社会的状況など）に大きく依存するため、環境的要因を反映して高感度に変化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の策定が有望と考えられる。と

ころが今までのプロテオーム解析による疾患バイオマーカー探索研究では、別人である「患者」と「健常者」を比較していたため個人差が大きく、疾患による変化を見つけることが難しかった (Fig. 1 上)。

そこで本研究では長期縦断コホートと協力して、同一人の「健常状態」と「虚弱状態」の比較を行うことで、個人差を抑制し、フレイルによるタンパク質の発現変化をより効率よく探索する (Fig. 1 下)。本研究は、他では得られない大規模長期縦断調査のサンプルを用い、個人差による変動を排除した効率的なプロテオミクス解析を行う。

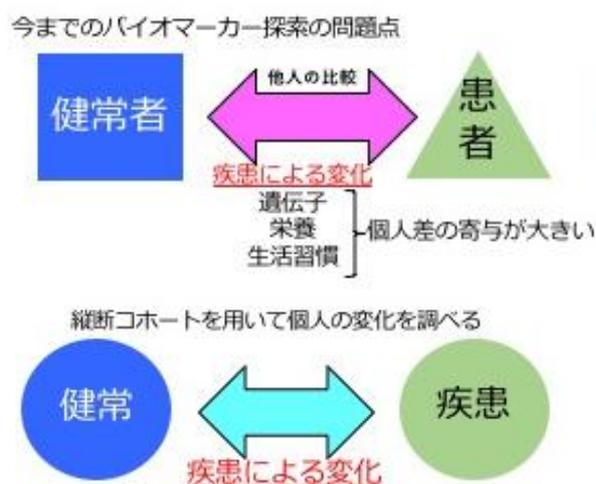


Fig. 1 研究のねらい

初期フレイルの指標となるタンパク質及びその翻訳後修飾を発見することにより、新たな健康管理システムの開発に繋がり、健康な超高齢社会の実現に向けて大きく貢献する。

## 2. 研究の方法と経過

### 2-1 SONIC 調査と解析対象者の抽出

SONIC 調査(Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians)は、3年ごとに70歳、80歳、90歳の継続調査を行う会場招待型の大規模長期縦断調査である。地域に特化しがちな縦断調査の弱点を克服し、現代社会のきわめて多様な高齢者のデータを取得するため、調査地域は関西と関東の都市部と非都市部を網羅している。調査項目は、運動機能(バランス、歩行、握力等)の他に、認知機能(MoCA-J、MMSE)、心理・社会学、歯学、医学(栄養調査、生化学検査など)について、幅広くデータを集めており、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。今回は、運動機能調査のデータをもとに、初回調査に比べて追跡調査(3年後及び6年後)において、継続的に一定以上、握力が低下したグループを解析対象者として抽出した。解析対象者の初回調査(1wave)と6年後調査(3wave)、すなわち握力低下前と低下後の血漿サンプルのプロテオームを比較解析することとした。

### 2-2 サンプルの前処理

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、すべてのサンプルについて血漿中のメジャー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。前処理を行ったサンプルのタンパク質を定量した。

### 2-3 二次元電気泳動によるプロテオーム解析

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。まず、すべての解析対象サンプルを等量ずつ混合し、標準サンプルを作製した。標準サンプルと解析対象サンプルを異なる蛍光色素(標準サンプル; IC3-OSu, 解析対象サンプル; IC5-OSu: 同仁化学)を用いて蛍光標識した。次に、標準サンプルとそれぞれの解析対象サンプルを等量ずつ混合し、電気泳動サンプルを作製した。ProteoExtract™ Protein Precipitation kit (Calbiochem)を用いてサンプルのクリーンアップを行った後、pH4-7のpH勾配固定化ストリップゲル(Immobiline DryStrip: GEヘルスケア)を用いて等電点電気泳動を行った。泳動後のストリップゲルは、還元化とアルキル化処理を行い、SDS-PAGEで分離した。1サンプルあたり、2回ずつ電気泳動を行い、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)を用いて画像解析を行った。それぞれのタンパク質スポットは、それぞれのゲルの標準サンプルスポットの蛍光強度でノーマライズした。スポットの発現(相対蛍光強度)が、初回調査時に比べて1.5倍以上変化したスポット、あるいは分散分析により有意な変化を示したスポットを、発現の変動したタンパク質スポットとして抽出した。これらのタンパク質スポットを、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トシステム (KYA Technology) を用いて分離後、質量分析 (MALDI-TOF/TOF 5800, ABCIEX) を行った。得られたペプチドの質量分析データを Protein Pilot™ (ABCIEX) を用いてデータベース検索し、タンパク質を同定した。

### 3. 研究の成果

#### 3-1 解析対象者の抽出

SONIC の 70 歳調査では、運動機能のパラメーターとして、バランス、ステッピング、いずれからの立ち上がり速度、歩行速度、握力などを測定している。そこでまず、これらを総合的に評価できる Short Physical Performance Battery (SPPB : 0~12 点) の低下から、解析対象者を抽出することにした。しかし、初回と 3 年後のデータから SPPB を求めたところ、3 年間で SPPB が下がる人がほとんどいなかったため、握力を指標として解析対象者を抽出することとした。具体的には、初回調査に比べ、3 年後、6 年後の調査で継続的に握力が一定以上低下している人を解析対象者とした。対象者は、男性 10 人、女性 16 人が抽出された。そこで、これらの解析対象者の初回調査の血漿サンプルと 6 年後の継続調査の血漿サンプルのプロテオームを、比較することとした。

#### 3-2 2D-DIGE を用いた握力低下前と低下後のプロテオームの比較

血漿タンパク質の二次元電気泳動を行ったところ、Fig 2 のような画像が得られた。

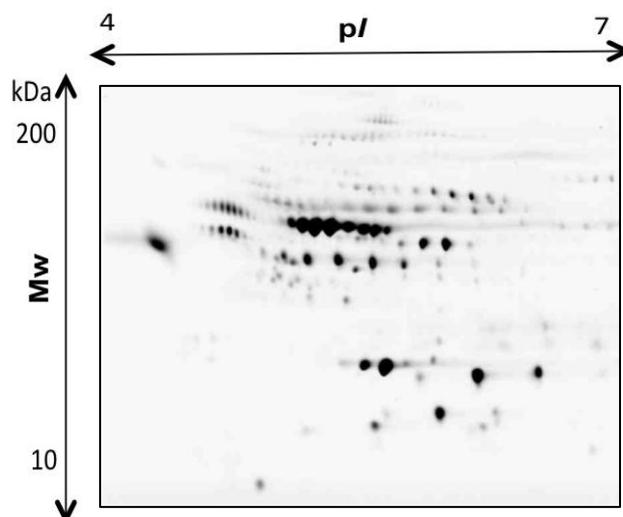


Fig. 2 血漿タンパク質の二次元電気泳動像

Progenesis SameSpots を用いて、スポットのアライメント、バックグラウンド補正、発現変化したスポットの抽出を行ったところ、全部で 524 スポットを検出し、握力低下前に比べて発現が増加したスポットが 30 スポット、発現が低下したスポットが 36 スポットであった。

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複数のスポットのうち、増加するスポットと減少するスポットの両方あるものも数多く見られた。これらは、翻訳後修飾の変化が示唆されるタンパク質と考えられた。

### 4. 今後の課題

SONIC の 70 歳調査の中から、初回調査、3 年後の継続調査、6 年後の継続調査において、継

続的に握力の低下した人を、運動機能低下群として抽出した。そして、初回調査と6年後の継続調査における採血から得たEDTA-血漿を解析サンプルとし、運動機能の低下前と低下後におけるタンパク質の変化について、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析により、網羅的に解析した。

今後、健康な人（握力が低下しなかった人）の6年間の経年変化を調べ、これらのスポットをさらに絞り込む必要がある。また、同じタンパク質として同定される複数のスポットの変動が異なるため、変動するスポットの翻訳後修飾についても明らかにする必要があると考えられる。

## 5. 研究成果の公表方法

本研究結果は、学会発表を含めまだ公表していないが、得られた成果は論文にまとめ、英文誌に投稿する予定である。