

<研究課題> フレイルおよびサルコペニアのバイオマーカーとしての血清 miRNA 測定有用性の検証

研究代表者 兵庫医科大学内科学総合診療科 主任教授 新村 健

【まとめ】

フレイル・サルコペニアの新規バイオマーカーとしての miRNA 測定の可能性を検討した。地域在住高齢者コホート研究に参加した女性から、サルコペニアかつフレイル（プレフレイル）で、心・肺・腎・肝疾患、糖尿病のない9例と、サルコペニアがなく健康な9例との間で血清 miRNA profile を比較した。14個の miRNA がバイオマーカー候補として選出され、フレイル・サルコペニア診療における有用性が示唆された。

1. 研究の目的

健康寿命の延伸と、高齢者 QOL の向上を目指すうえで、フレイル対策は最重要課題の一つである。フレイルとは、加齢に伴う機能変化や生理的な予備能力の低下により、ストレスに対する脆弱性が増し、容易に健康障害を招きやすい状態であることから、人において老化の促進した状態と捉えることができる。フレイルの概念は医療介護福祉従事者のみならず国民にも広がりつつあるが、その診断基準としては様々なものが提唱されており、世界的に統一されたものがないことが課題になっている。その中で最も頻用されている診断基準が Cardiovascular Health Study における5項目の診断基準である。

一方、これまでに国内外からフレイルのバイオマーカー候補として、炎症性サイトカイン、ALT、成長ホルモン、インスリン様成長因子1、ビタミンDなどが報告されている。screening マーカーとしての意義はそれなりに認められるものの、これらには、①老化に伴うフレイル(Primary frailty)を正確に検出するものか、②予後評価に有用か、④介入効果判定に有効か、といった目的でのバイオマーカーの意義が確立していない。とりわけプレフレイル、フレイルへの効果的な介入法を確立していくうえでは、予後予測因子となりうる生物学的バイオマーカーを、臨床的な診断指標と組み合わせて評価していくことが必要と考えられた。

これまでに癌や心血管疾患特異的な microRNA (以下 miRNA) 発現パターンが報告されており、miRNA 解析は、Primary frailty においても特異的なバイオマーカーとして有用ではないかと予想した。今日、細胞老化と個体老化を介在する要因として液性因子が着目されており、その点でも miRNA は細胞間の情

報を仲介する液性因子であり、着目に値する。有用なバイオマーカーが発見できたならば、フレイルに対する予知・治療戦略はより明確になり、この領域の研究が一層発展していくものと期待される。以上より本研究では、フレイルのバイオマーカーとしての血清 miRNA 測定の有用性を検証することを研究の目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 FESTA 研究

我々は地域在住高齢者において学際的にフレイルと生活習慣との関係を明らかにする目的で、コホート研究 (Frail Elderly in Sasayama-Tamba Area=FESTA 研究) を立ち上げ、調査研究への参加者はこれまでに975名となった。2019年度末までには2017年度までに本研究に参加した840名に対する追跡調査を行い、会場での参加調査参加者は551名、電話でのアンケート調査には149名参加いただいた。最終的な2年追跡率は、83.3%となった。本研究すでに兵庫医科大学倫理委員会にて承認を得た(承認番号倫ヒ0342)。すべての調査参加者からは書面での同意を得ており、連結可能匿名化した血液サンプルは miRNA 抽出用の検体容器にて-80℃ deep freezer で保存している。

2-2 フレイル・サルコペニア診断と解析対象者の選別

本研究では、心理的及び身体機能的評価のみならず、詳細な医学的調査も行っており、合併疾患の除外を含め、慎重に選別されたサルコペニア+フレイルまたはプレフレイル集団を、マッチさせた健常(ロバスト)群と対比することが可能であった。フレイルの診断は J-CHS (Cardiovascular Health Study 日本版) により行い、体重減少、握力低下、歩行速度低下、疲労感、身体活動量低下の5項目のうち2項目以上に該当する症例を選出した。サルコペニアの診断は、Asian Working Group for Sarcopenia 2019 により行い、握力低下、歩行速度低下のいずれかと筋肉量減少を認められた症例をサルコペニアと診断した。

今回の解析対象者はすべて女性とし、サルコペニア・フレイル群はサルコペニアを有しフレイルまたはプレフレイルと診断された症例で、重篤な心、肺、腎、肝疾患がなく、糖尿病のない症例とした(9例)。対照となるロバ

スト群は、初回受診時にサルコペニアはなくロバストと診断され、さらに2年度の追跡調査でもロバストと診断された症例とした。さらにサルコペニア・フレイル群と年齢をマッチングさせた、重篤な心、肺、腎、肝疾患がなく、糖尿病のない症例とした(9例)。

2-3 miRNA 解析

血清中のmiRNAを抽出し、タカラバイオ社のmiRNomeパネルを用いてqPCR解析を行った。パネル上のmiRNA発現レベルをdelta Cqで表し、ロバスト群とサルコペニア・フレイル群との間で補正後データを比較解析した。相対発現量は、Ratio=-1X(サルコペニア・フレイル群の平均補正後Cq値-ロバスト群の平均補正後Cq値)で求め、Ratioの絶対値が0.585以上かつ、平均補正Cq値の2群比較(unpaired t test)でP値が0.05未満のものを有意差のあるmiRNAとして選定した。

2-4 臨床的背景の比較

ロバスト群とサルコペニア・フレイル群との間で、臨床背景、身体機能、血液検査指標、生活習慣関連指標を比較した。パラメトリック指標の比較はunpaired t testで、ノンパラメトリック指標の比較はMann-WhitneyのU検定で行い、P値が0.05未満の場合有意と判定した。各miRNAの平均補正Cq値と臨床指標、血液検査指標との関係は、Pearsonの相関でP値が0.05未満の場合有意と判定した。

3. 研究の成果

3-1 臨床背景

サルコペニア・フレイル群は、全例サルコペニアでJ-CHS項目は6名が3項目該当(フレイル)、3名が2項目該当(プレフレイル)であった。一方、ロバスト群は、全例非サルコペニア(ロバスト)でJ-CHS項目は4名が1項目該当(プレフレイル)、5名が0項目該当(ロバスト)であった(表1)。

表1に示す通り、臨床背景においてサルコペニア・フレイル群では、身長、体重は有意に低値だった。一方、年齢、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、MMSEスコア、合併疾患数、教育年数、喫煙者数、飲酒者数、体脂肪率にも差を認めなかった。四肢骨格筋index、握力はサルコペニア・フレイル群で低値だったが歩行速度、5回立ち上がりテストには有意差がなかった。超音波骨量測定器で計測した骨量は、サルコペニア・フレイル群でやや低値だったが有意差は認めなかった。

	ロバスト群 (n=9)	サルコペニア・フレイル群 (n=9)
年齢(歳)	80±8	79±8
身長(cm)	150±5	144±6

体重(kg)	51±4	42±5
BMI(kg/m ²)	23±2	20±3
収縮期血圧(mmHg)	137±18	127±13
拡張期血圧(mmHg)	76±10	75±11
MMSEスコア(点)	28±2	28±1
合併疾患数	0.8±0.4	1.2±1.1
教育年数(年)	12±2	12±2
喫煙者数	0	0
飲酒者数	2	1
体脂肪率(%)	30±4	29±7
四肢骨格筋index(kg/m ²)	6.14±0.26	5.03±0.49
握力(kg)	23±4	16±2
歩行速度(m/秒)	1.40±0.32	1.20±0.39
5回立ち上がりテスト(秒)	7.2±2.0	8.0±2.4
骨量(% YAM)	76±18	65±8
AWGS2019		
サルコペニア	9	0
非サルコペニア	0	9
J-CHS		
3項目該当	6	0
2項目該当	3	0
1項目該当	0	4
0項目該当	0	5

3-2 血液検査

今回我々が測定した、白血球数、赤血球数、Hb、Ht、血小板数、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪(随時測定)、血糖(随時測定)、AST、ALT、γGTP、クレアチニン、シスタチンC、高感度CRPにおいて、ロバスト群とサルコペニア・フレイル群との間で、有意差を認めた項目は認められなかった。

3-3 miRNA 解析

血清中検出された757個のmiRNAについて平均補正Cq値を比較し、最終的に表2に示す14個のmiRNAをサルコペニア・フレイルのバイオマーカー候補として選出した。Ratioマイナスは低下したmiRNA(7個)で、プラスは増加したmiRNA(7個)である。

miRNA	Ratio	P値
miR-548d-3p	-1.5786	0.0496
miR-556-3p	-1.4046	0.0144
miR-548a-5p	-1.1788	0.0335
miR-143-5p	-0.8673	0.0189

miR-1972	-0.8500	0.0420
miR-196b-3p	-0.8132	0.0005
miR-223-5p	-0.7312	0.0452
miR-205-5p	0.8912	0.0248
miR-34a-3p	0.9444	0.0082
miR-494-3p	1.1152	0.0872
miR-146a-3p	1.1280	0.0309
miR-296-5p	1.1339	0.0139
miR-548d-5p	1.1467	0.0496
miR-1179	1.7735	0.0133

3-4 miRNA と臨床背景、血液検査データとの相関

選出したサルコペニア・フレイルのバイオマーカー候補 miRNA と臨床背景、血液検査との単相関を検討した。有意と見なされた項目を列挙する。

miRNA	臨床背景	血液検査
miR-548d-3p	なし	総蛋白
miR-556-3p	体重、握力、BMI	クレアチニン、シスタチンC
miR-548a-5p	年齢、体重	クレアチニン
miR-143-5p	握力	なし
miR-1972	体重、握力、BMI	ALT
miR-196b-3p	体重、握力	なし
miR-223-5p	なし	なし
miR-205-5p	なし	アルブミン
miR-34a-3p	握力、骨量	なし
miR-494-3p	身長、体重、握力、骨量	なし
miR-146a-3p	体重、握力、BMI	血糖
miR-296-5p	握力、骨量	血小板数
miR-548d-5p	なし	中性脂肪
miR-1179	体重、握力、収縮期	なし

	血圧	
--	----	--

4. 今後の課題

4-1 考察

サルコペニア・フレイル群は当初は全例サルコペニアかつフレイル症例を選出する計画であったが、そのような症例の中には数例基礎疾患として心疾患、腎疾患を有する症例がいたため、最終的に2-2で述べた症例を選出した。3-1の結果の通り、ロバスト群とサルコペニア・フレイル群との間には体格、身体機能以外には有意差を認めなかったため、今回選出されたサルコペニア・フレイル群は、Primary frailty を反映する集団として妥当であったと考察した。

2 群間ですべての血液検査指標には有意差を認めなかったのかかわらず、14 種類の miRNA に有意差を認めたことは、miRNA がサルコペニア・フレイルの新規バイオマーカーとしての可能性を有することを支持する。個々の miRNA に着目すると、3-4の結果の通り、多くの miRNA は体重、握力と相関があり、身体的フレイルを反映する miRNA である可能性が示唆される。血液検査指標との関係では、逆に特定の指標と選出された miRNA 群との関係は見られず、むしろ個々の miRNA によって相関を示す血液検査指標は異なっていた。身体的フレイルにおける病態の複合性を考えた場合、このような miRNA 群による評価は J-CHS の診断基準以上に個体における生物学的老化を反映するものと期待できる。

4-2 課題と今後の展望

本研究成果は、サルコペニア・フレイルの新規バイオマーカーとしての血清 miRNA 測定の可能性を明らかにしたものである。よってまだバイオマーカーとしての意義や最適な使用方法などは明らかにできていない。

そのためには、①validation 研究として、次のコホート集団で、今回選出された miRNA 群を測定し、その測定が、本当に Primary frailty を正確に検出するものかを検証する必要がある。さらに②今回血清を解析に使用した 18 症例、次のコホート集団で miRNA 群を測定する症例を長期的に追跡し、個々の症例の予後を観察していくことも重要と考えている。バイオマーカーには、診断目的、重症度評価目的、予後評価目的、介入効果判定目的といった様々な用途がある。そこでサルコペニア・フレイルにおいて血清 miRNA の測定がどのような目的において最も有用か、そのバイオマーカーとしての意義を確立していく必要もある。

本研究は貴財団の援助により、このように大変興味深い研究成果を得ることができたが、上記の追加研究には、さらに多くの研究資金を必要とし、コホート調査研究を長

期間継続していく必要がある。現在の COVID-19 禍では、コホート研究の遂行は非常に困難な状況ではあるが、何とか多くの課題を克服し、研究を継続していきたいと考えている。

5. 研究成果の公表方法

現時点で、本研究成果は、まだいずれの学会、論文でも発表していない。それは4-2で述べた課題を解決し、インパクトの高い雑誌での発表を第一に目指していたからである。しかし COVID-19 禍のもと、コホート調査研究が一時中断状態にあり、課題解決に時間がかかる可能性が高いことから、本年度中に英語論文を作成し、早期の発表を目指す方針に変更したい。