

メタボローム解析を用いた慢性疲労症候群の診断バイオマーカーの開発

山野 恵美^{1,2}, 片岡 洋祐^{1,3,4}

1. はじめに

疲労・疲労感は日常的に経験され、発熱、痛みとともに身体のホメオスタシス（恒常性）の乱れを知らせる重要なアラーム信号の一つである^{1,2}。疲労は、過度の肉体的および精神的活動、または疾病によって生じた心身の活動能力・能率の減退状態と定義される。また、疲労は独特の不快感、休養の願望、活動意欲の低下を伴うことが多く、これを疲労感と呼ぶ³。2004年の文部科学省疲労研究班によるわが国における疫学調査では¹、一般市民の約60%が疲労感を自覚しており、そのうち半数以上が6か月以上続く慢性疲労に悩まされていると報告されている。さらに、その中には原因不明の強い疲労・倦怠感を主訴として半年以上も健全な社会生活が送れなくなる慢性疲労症候群（chronic fatigue syndrome：CFS）の患者も含まれる¹。CFSは1988年に米国疾病予防管理センター（CDC）によって原因不明の強い疲労を呈する疾患として報告され、現在では全人口の0.1～0.5%の発生率と見積もられているが、通

常の診察や従来の医学検査では特徴的な異常所見を見つけないことができず、治療法も確立していない。

これまでに、CFSの発症メカニズムとして、ウイルス等の感染、免疫機能異常、視床下部-下垂体-副腎系（HPA axis）の機能異常、酸化的リン酸化機能の障害や酸化ストレス等が想定されてきた^{4,5}。また、ミトコンドリアでのアデノシン5'-三リン酸（adenosine 5'-triphosphate：ATP）の産生能の低下が報告され、トリカルボン酸（tricarboxylic acid：TCA）回路内の酵素活性の異常等が議論されている⁶⁻⁸。しかしながら、異常を示す酵素や代謝反応系については具体的に同定されておらず、CFSの詳細な発症メカニズムはいまだ不明である。こうした背景から、CFSの診断はもっぱら医師による問診と診察に頼っており、しばしば医師によって診断結果が異なったり、診断に数か月、数年を要したケースがあったりするなど問題が指摘されてきた。したがって、病態メカニズムを反映し、客観的な診断を可能にする診断バイオマーカーの確立が望まれている。

筆者らは、これまでに疲労病態の分子メカニズムを明らかにするとともに、CFSの客観的な診断法および治療や予防法の開発を目指した研究を行ってきた。今回、CFSの疲労病態を反映する診断バイオマーカーを開発することを目的に、キャピラリー電気泳動質量分析法（CE-MS）を用いて、ヒトにおける血漿中の代謝物の網羅的な測定を行った。先行研究における複合疲労モデル動物を用いた血漿代謝物解析の結果と合わせて、紹介する。

2. モデル動物を用いた疲労研究

ヒトの疲労・疲労感は、過度な運動や精神・環境ストレス、睡眠リズム障害、がんなどの消耗性疾患あるいは細菌やウイルスの感染など、さまざまな原因により引き起こされる。このような複合的要因で惹起される疲労の分子メカニズムを解明するために、持続的なストレス負荷と睡眠不足を再現した実験モデル動物がしばしば用いられている。本モデルでは、水を深さ1.5～2.2 cmに張ったケージ内でラットを3～7日飼育する⁹。ラットは十分な休息をとれず、さらに筋緊張が低下するレム睡眠が持続的に剥奪されることにより、全身性の疲労状態に陥る。疲労負荷後、疲労度の定量的指標となる強制水泳試験において、遊泳時間の有意な減少を認める⁹。また、セロトニンなどの

¹ 理化学研究所科学技術ハブ推進本部健康生き活き羅針盤リサーチコンプレックス推進プログラム融合研究推進グループ新規計測開発チーム（〒650-0047 神戸市中央区港島南町6-7-1）

² 大阪市立大学大学院医学研究科生理学第一（〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3）

³ 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター生命機能動的イメージング部門細胞機能評価研究チーム（〒650-0047 神戸市中央区港島南町6-7-3）

⁴ 理化学研究所CLST-JEOL連携センターマルチモダル微細構造解析ユニット（〒650-0047 神戸市中央区港島南町6-7-3）

Development of diagnostic biomarkers for chronic fatigue syndrome using metabolome analysis

Emi Yamano^{1,2} and Yosky Kataoka^{1,3,4} (¹ Health Metrics Development Team, RIKEN Compass to Healthy Life Research Complex Program, 6-7-1 Minatogima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan, ² Department of Physiology, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka, 545-8585, Japan, ³ Cellular Function Imaging Team, Division of Bio-function Dynamics Imaging, RIKEN Center for Life Science Technologies, 6-7-3 Minatogima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan, ⁴ Multi-modal Microstructure Analysis Unit, RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center, 6-7-3 Minatogima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890761

© 2017 公益社団法人日本生化学会

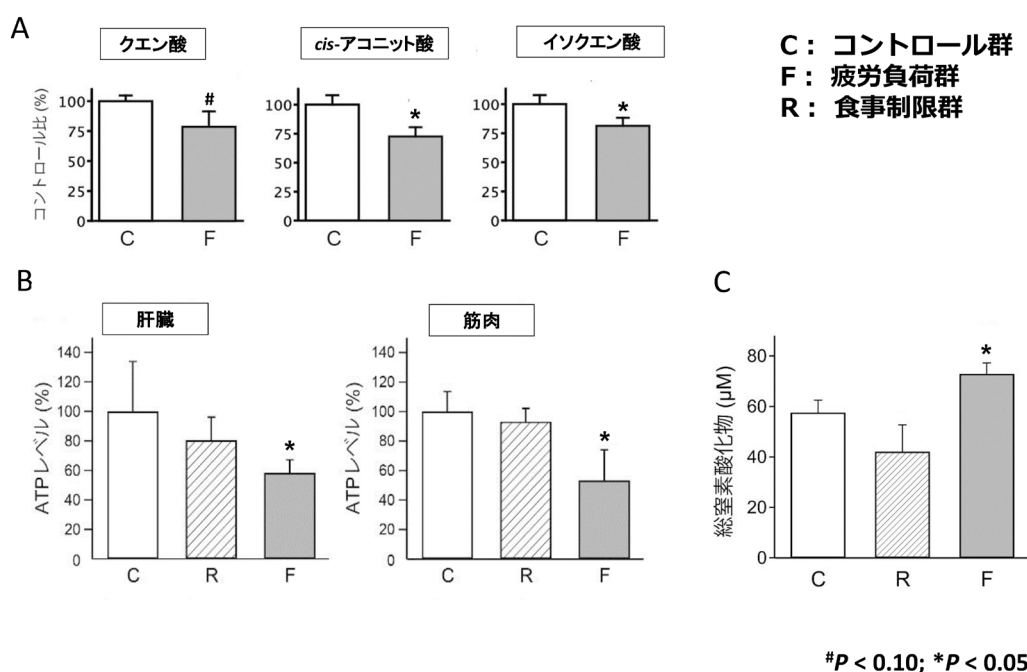


図1 疲労モデル動物における代謝変化

(A)LC-MSを用いた血漿中有機酸測定の結果を示す。コントロール（疲労非負荷）群と比較して、疲労負荷群ではクエン酸が減少傾向、cis-アコニット酸やイソクエン酸は有意な減少が認められた。(B)組織（肝臓、筋肉）におけるATP測定結果を示す。疲労負荷群では、コントロール群や食事制限群と比較して有意に低下していた。(C)血漿中総窒素酸化物（NOx）の定量測定結果を示す。疲労負荷群ではコントロール群や食事制限群と比較して、有意に増加していた（論文¹²⁾中の図を改変）。

脳内モノアミン代謝の異常⁹⁾や脳下垂体中葉からのαメラノサイト刺激ホルモン（α-melanocyte stimulating hormone：α-MSH）の発現・分泌亢進を含む神経-免疫-内分泌系の異常が確認されている¹⁰⁾。また、肝臓、筋肉、脳および血漿において20種類のタンパク質構成アミノ酸含有量が増加あるいは減少していることも確認されている¹¹⁾。

3. 疲労モデル動物におけるメタボローム解析

疲労病態特有の代謝物質の変化を網羅的に調べるため、同疲労モデル動物の血漿成分を対象にメタボローム解析（網羅的代謝物解析）を実施した¹²⁾。オス8週齢SD系ラットを使用し、無作為にコントロール群（非疲労負荷群）、疲労負荷群、および食事制限群に群分けした。疲労負荷群では、ラットを水を張ったケージで5日間飼育した¹¹⁾。コントロール群は、疲労負荷をせず通常ケージで5日間飼育した。摂食量の減少に伴う代謝変化を区別する目的で、通常摂食量の半分（疲労負荷群と同様の体重減少を示す1日あたり10gの餌）で5日間飼育した食事制限群を設定した。これら3群のラット血漿を用いてCE-MS、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）による代謝物測定を行い、さらに総窒素酸化物（NOx）測定も実施した。また、肝臓や筋肉などの各組織のATP量も測定した。

CE-MSを用いた測定により、48種類の代謝物が同定され、疲労負荷群では乳酸、コハク酸、分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）などが増加していた。一方、尿素回路・プロリン代謝において、疲労負荷によってシトルリンやヒドロキシプロリンが他の実験群と比較して減少していた。また、TCA回路前半のクエン酸、cis-アコニット酸、およびイソクエン酸に関して、より感度の高い条件を設定してLC-MSで測定したところ、コントロール群と比較して疲労負荷群ではクエン酸が減少傾向を示し、cis-アコニット酸、およびイソクエン酸は有意に減少していた。次に、組織におけるエネルギー産生や酸化ストレスとの関連を調べたところ、疲労負荷群では肝臓や筋肉でのATP量がコントロール群や食事制限群と比較して有意に低下していた（図1）。こうした結果は、疲労負荷による血漿中の代謝物の変化が組織のエネルギー産生の低下に起因することを示唆している。一方、疲労負荷群ではコントロール群および食事制限群と比較して酸化ストレスの指標となる血漿中のNOx量が有意に増加していた（図1）ことから、疲労病態では全身の酸化ストレスも亢進しており、ミトコンドリア機能の低下とも関係している可能性が示唆された。

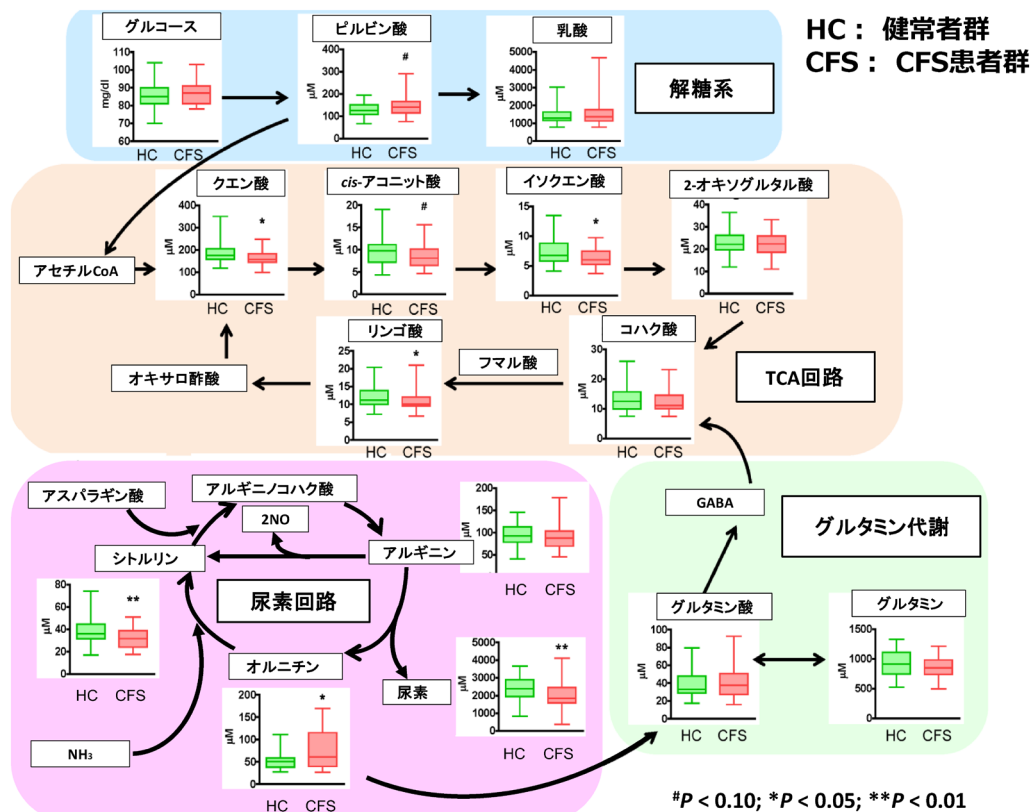


図2 メタボローム解析により定量化された代謝物質の経路図（一部抜粋）

解糖系、TCA回路、尿素回路の代謝物質においてCFS患者群と健常者群で濃度の違いが認められた（論文^{13）}中の図を改変）。

4. CFS患者サンプルを用いたメタボローム解析

1) CFS患者群と健常群における2群比較

筆者らは、CFSの病態メカニズムを反映し、客観的な診断を可能にするバイオマーカーを開発する目的で、CFS患者と健常人の血漿サンプルを対象にCE-MSによるメタボローム解析を行った¹³⁾。本臨床研究は、CFS患者に特徴的な代謝物質を発見するための試験1（トレーニングデータセット研究）と、その結果の妥当性を確認するための試験2（テストデータセット研究）に分け、各試験で異なる被験者を対象に実施した。試験1ではCFS患者47名（平均38.1歳、女性41名、男性6名）と健常者46名（平均38.8歳、女性41名、男性5名）、試験2ではCFS患者20名（平均36.2歳、女性10名、男性10名）と健常者20名（平均36.1歳、女性10名、男性10名）を対象とした。試験1・2ともにCFS患者はCDCによる診断基準¹⁴⁾を満たす者とした。試験1の結果、解糖系のピルビン酸、TCA回路前半のクエン酸やイソクエン酸、尿素回路のオルニチンやシトルリンにおいて、CFS患者群と健常者群との間に濃度の違いが観察され（図2）、CFS患者群ではTCA回路前半および尿素回路に特有の代謝変化が引き起こされていることが推

測された。次に、測定された全代謝物質を対象にパターン識別手法の一つであるSupport Vector Machine-Feature Selection (SVM-FS) 解析 [2群間を高精度に分類することを目的として、適切な変数（今回は代謝物質を意味する）を算出する方法]を行ったところ、CFS患者群と健常者群を判別する上でイソクエン酸、ピルビン酸、オルニチン、シトルリンが有効な代謝物質であることが示された。特に、①解糖系からTCA回路への流入とTCA回路前半の機能低下（ピルビン酸濃度の上昇とイソクエン酸濃度の低下）、および②尿素回路の機能変化（オルニチン濃度の上昇とシトルリン濃度の低下）が引き起こされていることを示すものであった。そこで、こうした代謝変化の指標として、ピルビン酸/イソクエン酸、オルニチン/シトルリンのそれぞれ二つの代謝物質量の比を設定し、試験1および試験2において、CFS患者群と健常者群で比較検討した。その結果、いずれもCFS患者群の方が有意に高いことが確認され、2群を判別する上で有効な指標であることが示唆された（図3）。これらの代謝物質質量比による診断精度を検証するため、多変量解析モデルを作成し、受信者動作特性曲線（receiver operating characteristic curve : ROC）を用いてROC曲線下面積（area under the curve : AUC）値を求めた。

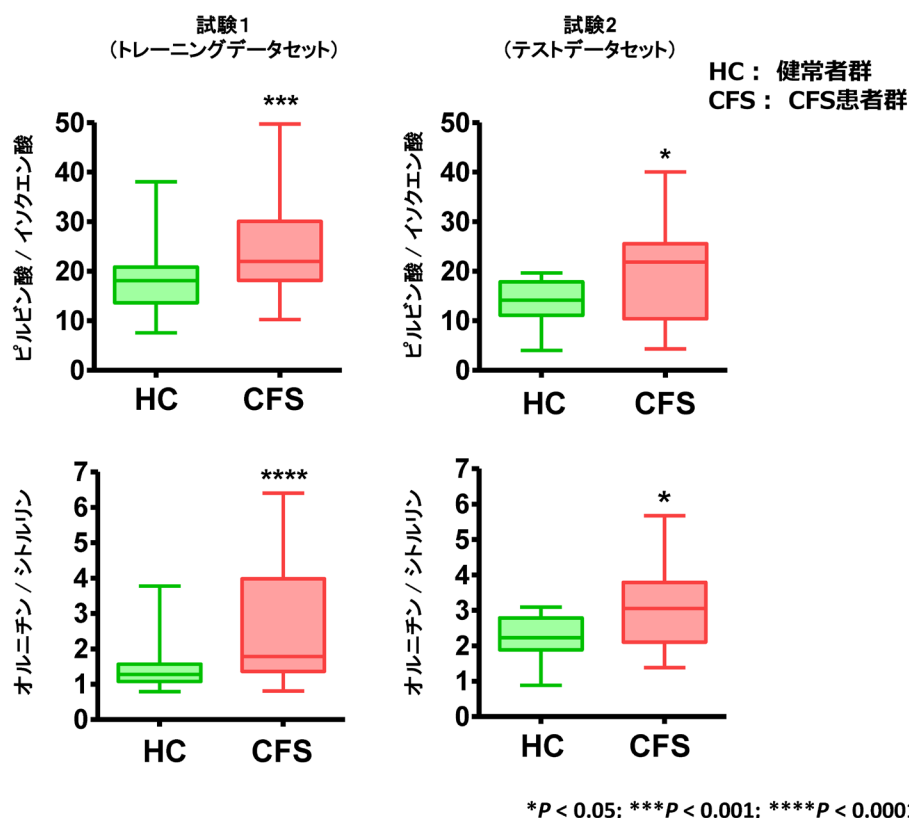


図3 試験1および試験2における2代謝物の量比の2群間比較

試験1 (トレーニングデータセット), 試験2 (テストデータセット) いずれにおいても二つの代謝物質質量比は健常者と比較してCFS患者群で有意に高いことが確認された。特に、ピルビン酸/イソクエン酸比の上昇はTCA回路前半の機能低下を表し、オルニチン/シトルリン比の上昇は尿素回路の代謝抑制を表しているものと考えられる。こうした独立した2種類の代謝物質の量比の変化は、エネルギー産生の低下と、それを補おうとする尿素回路からTCA回路への新たな代謝の流れを反映しており、慢性疲労症候群病態を特徴づけるものと考えられる (論文¹³⁾ 中の図を改変)。

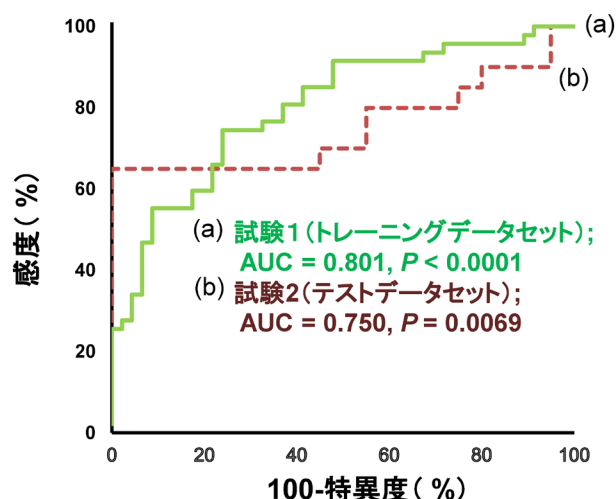


図4 試験1および試験2におけるROC曲線

試験1 (トレーニングデータセット: a), 試験2 (テストデータセット: b) いずれのデータセットにおいても、ピルビン酸/イソクエン酸およびオルニチン/シトルリンの2指標を組み合わせることによって高いAUC値を得ることができ、高精度で2群を判別できることが示された (論文¹³⁾ 中の図を改変)。

ROC曲線は縦軸を感度(%) (真陽性率: 有病者のうち、検査結果が陽性)、横軸を100-特異度(%) (偽陽性率: 健康な人のうち、検査結果が陽性) として描いたグラフであり、このグラフ曲線の下方面積 (AUC値) が1.0に近いほど診断能が高いことを意味する。ROC解析の結果、二つの代謝物質質量比を組み合わせた指標はCFS患者群と健常者群を高精度に判別することを可能にし、CFSの客観的な診断に有効な診断バイオマーカーとなりうることが示された (図4)。

2) 疲労病態に特徴的な代謝

血漿中の代謝物量の増減は各臓器における代謝変化を反映している。血漿メタボローム解析から疲労病態に特徴的な代謝変化が推察された。すなわち、TCA回路前半の機能低下により、産生できるATP量が減少する。エネルギー産生の低下を補うべく、尿素回路内のオルニチンからシトルリンへの代謝が抑えられ、グルタミン代謝への流れを誘導することでグルタミン酸-γ-アミノ酪酸 (GABA)-

コハク酸経路を介したTCA回路への新たな代謝経路を生み出し、TCA回路後半におけるATP産生を亢進してエネルギー産生を補おうとするメカニズムが考えられた。最近、肝組織そのもののメタボローム解析と関連酵素群の発現解析から、こうした疲労病態特有の代謝経路の亢進が確認されつつある。また、こうした代謝経路の亢進は低下したエネルギー産生を補う一方、組織における炎症を惹起することもわかってきた。したがって、疲労時の代謝変化は血中の炎症性サイトカイン量を増加させ、脳でのミクログリアの活性化や神経炎症を惹起することで、疲労感を誘発することにも関与しているものと考えられている。

3) CFSの診断バイオマーカー

今回、我々が発見した代謝物質の二つの量比（ピルビン酸／イソクエン酸、オルニチン／シトルリン）を組み合わせて用いることによりAUC値は0.7以上になることが確認され（図4）、CFSの客観的診断が可能になることが示された。また、代謝物質の変化は病態自体を反映している可能性がある。代謝はある程度、食事等によってコントロールすることが可能であり、今後、患者の病態に合わせた個別化医療の実現にも貢献するものと期待される。

文 献

- 1) 渡辺恭良 (2009) 医学のあゆみ, **228**, 593-604.

- 2) 久米慧嗣, 山野恵美, 片岡洋祐 (2014) 医学のあゆみ, **249**, 299-303.
- 3) 日本疲労学会用語委員会 (2011) 日本疲労学会誌, **6**, 1.
- 4) Prins, J.B., van der Meer, J.W., & Bleijenberg, G. (2006) *Lancet*, **367**, 346-355.
- 5) Devanur, L.D. & Kerr, J.R. (2006) *J. Clin. Virol.*, **37**, 139-150.
- 6) Myhill, S., Booth, N.E., & McLaren-Howard, J. (2009) *J. Clin. Exp. Med.*, **2**, 1-16.
- 7) Barnes, P.R., Taylor, D.J., Kemp, G.J., & Radda, G.K. (1993) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **56**, 679-683.
- 8) Jammes, Y., Steinberg, J.G., Mambrini, O., Bregeon, F., & Deliaux, S. (2005) *J. Intern. Med.*, **257**, 299-310.
- 9) Tanaka, M., Nakamura, F., Mizokawa, S., Matsumura, A., Nozaki, S., & Watanabe, Y. (2003) *Neurosci. Lett.*, **352**, 159-162.
- 10) Ogawa, T., Shishioh-Ikejima, N., Konishi, H., Makino, T., Sei, H., Kiryu-Seo, S., Tanaka, M., Watanabe, Y., & Kiyama, H. (2009) *J. Neurochem.*, **109**, 1389-1399.
- 11) Jin, G., Kataoka, Y., Tanaka, M., Mizuma, H., Nozaki, S., Tahara, T., Mizuno, K., Yamato, M., & Watanabe, Y. (2009) *Nutrition*, **25**, 597-607.
- 12) Kume, S., Yamato, M., Tamura, Y., Jin, G., Nakano, M., Miyashige, Y., Eguchi, A., Ogata, Y., Goda, N., Iwai, K., Yamano, E., Watanabe, Y., Soga, T., & Kataoka, Y. (2015) *PLoS One*, **10**, e0120106.
- 13) Yamano, E., Sugimoto, M., Hirayama, A., Kume, S., Yamato, M., Jin, G., Tajima, S., Goda, N., Iwai, K., Fukuda, S., Yamaguti, K., Kuratsune, H., Soga, T., Watanabe, Y., & Kataoka, Y. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, e34990.
- 14) Fukuda, K., Straus, S.E., Hickie, I., Sharpe, M.C., Dobbins, J.G., & Komaroff, A. (1994) *Ann. Intern. Med.*, **121**, 953-959.

著者寸描

●山野 恵美 (やまの えみ)



理化学研究所健康生き活き羅針盤リサーチコンプレックス推進プログラム新規計測開発チーム研究員。博士（社会健康医学）。

■略歴 2010年京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻博士後期課程修了。大阪市立大学大学院医学研究科生理学第一・特任助教を経て、17年4月より現職。

■研究テーマと抱負 大学院時代、公衆衛生学を専攻し予防医学の観点からヒトの健康増進に寄与することを旨として、疲労・ストレスをキーワードに、様々な臨床研究に取り組んできた。今後も、疾患の鑑別診断に臨床応用可能なバイオマーカーの開発等に精進したい。

■趣味 旅行、食べ歩き。

●片岡 洋祐 (かたおか ようすけ)



理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター細胞機能評価研究チームチームリーダー。（兼）理化学研究所CLST-JEOL連携センターマルチモダル微細構造解析ユニットユニットリーダー。（兼）理化学研究所健康生き活き羅針盤リサーチコンプレックス推進プログラム新規計測開発チーム研究員。博士（医学）。

■略歴 1996年京都大学大学院医学研究科博士課程修了。その後、大阪バイオサイエンス研究所・研究員、関西医科大学・講師、大阪市立大学大学院医学研究科・講師、理化学研究所分子イメージング科学研究センター・チームリーダーを経て、2013年より現職。

■研究テーマと抱負 生理学・脳科学・疲労科学が専門分野。特に、疲労・老化における脳内神経炎症や、幹細胞・前駆細胞の免疫調節機能に関する研究に従事。現在、電子顕微鏡画像のビッグデータ化と従来のオミックスデータとの融合を目指す。

■ウェブサイト <http://www.clst.riken.jp/ja/science/labs/bdi/ipi/cfi/>

■趣味 音楽を聴き、お酒を飲みながら料理をすること。