

第33回業績評価委員会 医学研究評価部会

研究開発テーマ①

過重労働・ストレス下における心血管イベントを
予測する因子：

メタボローム解析を主軸とした挑戦的研究

関東労災病院 循環器内科 柴田 正行

1. 研究開発領域 : 労働者の健康支援

2. 研究開発テーマ:

労働者における体内代謝産物の網羅的解析(メタボローム解析)
による過労死、過重労働、ストレスを予見する化学的指標の確立

3. 研究開発予定期間:

平成29年10月1日～平成31年3月31日

4. 研究開発組織

①研究代表者

氏名： 柴田 正行

所属施設及び役職名： 関東労災病院 循環器内科 第二部長

分担する研究項目：研究全体の統括、データ・サンプル回収、学会発表、論文作成
エフォート(研究専従率)： 20%

②研究分担者

氏名： 並木 淳郎

所属施設及び役職名： 関東労災病院 副院長・循環器内科 部長

分担する研究項目： 研究全体の統括
エフォート(研究専従率)： 8%

③研究分担者

氏名： 近藤 武志

所属施設及び役職名： 関東労災病院 循環器内科 副部長

分担する研究項目： データ・サンプル回収、学会発表
エフォート(研究専従率)： 8%

④研究協力者

氏名： 杉本 昌弘

所属施設及び役職名： 東京医科大学低侵襲医療開発総合センター 教授

分担する研究項目： 研究全体の統括、データ・サンプル解析、学会発表
エフォート(研究専従率)： 5%

5. 研究の目的及び意義

第3期労災疾病等医学研究について

3領域10テーマ(研究代表者所属施設)

1 労災疾病等の原因と診断・治療

腰痛 (中部労災病院)

社会福祉施設の介護職員における腰痛の実態調査、画像診断と予防対策

- ①介護職職員における腰痛の頻度、特徴に関する調査研究
- ②介護職職員の腰椎レントゲン、MRIを用いた画像検査と健常者データとの比較・研究
- ③介護職職員における腰痛の予防対策の確立

運動器外傷機能再建 (横浜労災病院)

運動器外傷診療の集約化による治療成績向上と早期社会復帰を目指した探索的研究

2 労働者の健康支援

生活習慣病 (東北労災病院)

- ①日本人の勤労者ならびに一般住民における新たな心血管リスクの解明と予防に関する亙理町コホート研究
- ②中国都市で働く日本人勤労者のストレスと健康障害に関する調査研究
- ③職場高血圧に関する調査研究
- ④精神的ストレスの心血管病発症機転に関する調査研究
- ⑤動脈硬化危険因子の3次元解析に関する研究

睡眠時無呼吸症候群 (山口労災病院)

睡眠時無呼吸症候群(SAS)の診断と治療に関する研究

作業関連疾患 (北海道せき損センター)

手根管症候群患者と作業内容(種類や期間など)との関連に関する研究

就労支援と性差 (愛媛労災病院)

- ①内分泌環境から見た女性労働者の健康管理研究
- ②夜間労働が女性の健康に及ぼす影響の研究
- ③副腎皮質ホルモンを指標とした女性の健康管理
- ④勤務条件・職種が女性の健康に影響に及ぼす影響についての研究

メタボローム (関東労災病院、横浜労災病院)

- ①労働者における体内代謝産物の網羅的解析による過労死、過重労働、ストレスを予見する生化学的指標の確立
- ②早期慢性膵炎の疾患概念の研究と新規診断法の確立

3 労災保険給付に係る決定等の迅速・適正化

外傷性高次脳機能障害 (東京労災病院)

従来の画像検査では検出できない高次脳機能障害の病態解明とその労災認定基準に関する研究

じん肺 (北海道中央労災病院)

- ①本邦におけるじん肺における膠原病、腎症特にANCA関連腎疾患の合併頻度に関する調査研究
- ②じん肺ハンドブックの作成に関する研究・開発
- ③じん肺続発性気管支炎の診断、治療法に関する研究

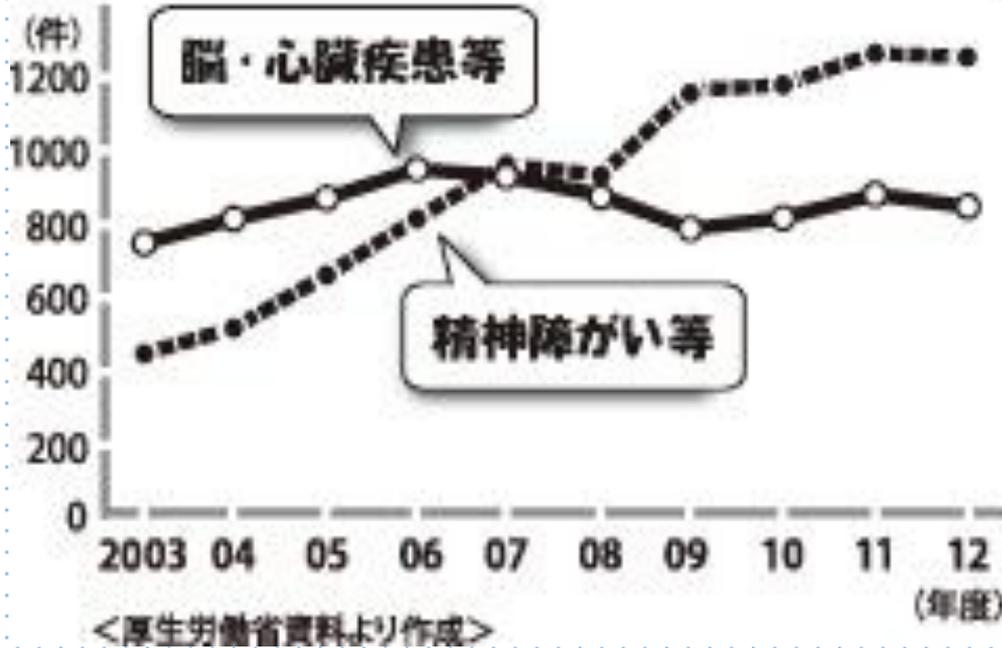
アスベスト (岡山労災病院)

- ①石綿肺癌診断における石綿繊維と種類に関する研究
- ②石綿肺の適正な診断に関する研究
- ③石綿健康管理手帳データベースにおける肺癌、中皮腫等の発生頻度に関する研究
- ④中皮腫の的確な診断方法に関する研究—鑑別診断方法と症例収集—

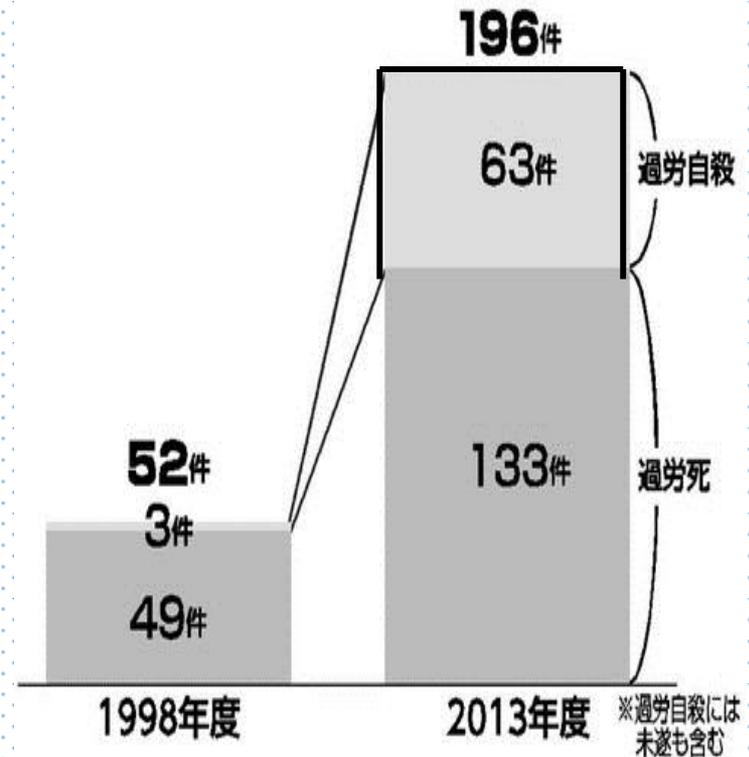
労働者健康安全機構 「重点研究」5分野

- 1.過労死等関連疾患(過重労働)
- 2.石綿関連疾患
- 3.精神障害(メンタルヘルス)
- 4.せき損等(職業性外傷)
- 5.産業中毒等(化学物質暴露)

過労死・過労自殺などの労災認定請求件数



過労死・過労自殺の認定件数



最近では電通問題もあり、社会問題となっている
残業時間の上限、いまだ不明瞭

H26年 過労死等防止対策推進法

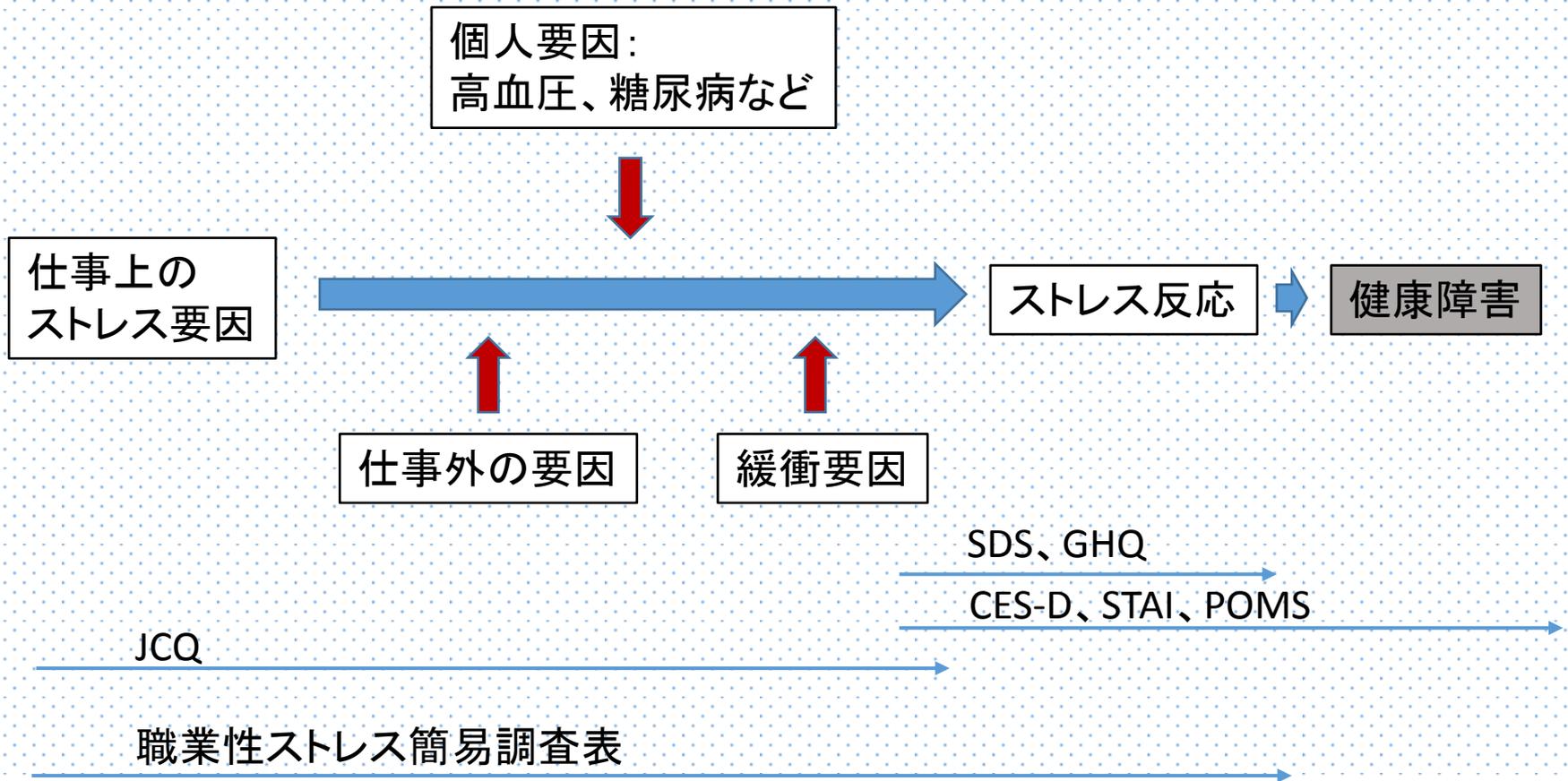


過労死 予防・対策

1. 国民への周知・啓蒙
2. 長時間労働是正に向けた企業への働き
3. 有給休暇の取得推進
4. メンタルヘルスケア
5. パワハラ等の予防・対策と相談体制の整備

など

労働者の過労・ストレス評価



職業ストレス: Job Content Questionnaire (JCQ)
精神的ストレス: Self-rating Depression Scale (SDS)

労働者の過労・ストレス



定量的・客観的な指標の確立が急務

かつ、簡便で侵襲性が低いもの



健康障害の前段階での介入可能

疲労評価項目

心理学的評価・・・質問調査票、面接

生理学的評価・・・自律神経系機能、心拍、血圧、脳波 など

内分泌学的評価・・・カテコールアミン系物質、コルチゾール、
 α アミラーゼ、各種ホルモン、酸化ストレス

免疫学的評価・・・NK細胞活性、リンパ球機能、サイトカイン、
CD抗体、免疫グロブリン(IgA)

生物学的評価・・・ヘルペスvirus

脳機能・・・認知能力、MRI、PET、近赤外線スペクト

遺伝子・・・遺伝子多型、mRNA



新たな指標として注目されるのがメタボローム解析を利用した代謝系指標

メタボローム(代謝物とは?)

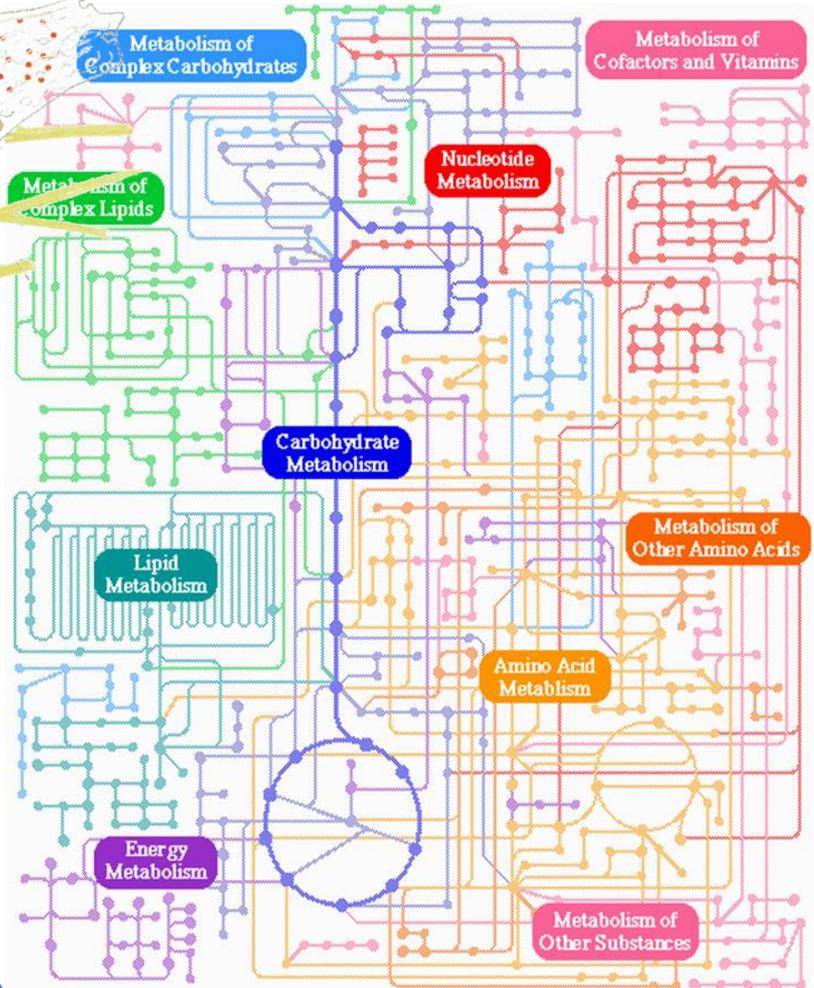
細胞

代謝マップ

2万の遺伝子、10万の機能性RNA、
100万のタンパク、3千の代謝物

メタボロームとは、
「細胞内の低分子の代謝物群(※)」

※アミノ酸、脂肪酸、糖など



生命現象の包括的な理解

ゲノム解析・トランスクリプトーム解析

プロテオーム解析

メタボローム解析

遺伝子、蛋白質レベルでの変化が必ずしも異常とは限らない

目的:

勤労者の過労死予防のため、過労死のなかでも特に心血管疾患に至る予測因子・関連因子となりうる定量的マーカーを、メタボローム解析を用いて推測・同定することを目標とする。

研究意義:

勤労者の過労死予防のため、その客観的マーカーが同定されると、発症する前に早期から介入できる可能性がある。さらに検体は唾液、尿、血液と体への侵襲が少ない。唾液、尿であれば病院以外でも採取が可能。

6. 国内外の研究状況と特色・独創的な点

代謝物のプロファイルと糖尿病の発症リスク Metabolite profiles and the risk of developing diabetes

ARTICLES

nature
medicine

Metabolite profiles and the risk of developing diabetes

Thomas J Wang¹⁻³, Martin G Larson^{3,4}, Ramachandran S Vasan^{3,5}, Susan Cheng^{2,3,6}, Eugene P Rhee^{1,7,8}, Elizabeth McCabe^{2,3}, Gregory D Lewis^{1,2,8}, Caroline S Fox^{3,9,10}, Paul F Jacques¹¹, Céline Fernandez¹², Christopher J O'Donnell^{2,3,8}, Stephen A Carr⁸, Vamsi K Mootha^{8,13,14}, Jose C Florez^{8,13}, Amanda Souza⁸, Olle Melander¹⁵, Clary B Clish⁸ & Robert E Gerszten^{12,8}

Emerging technologies allow the high-throughput profiling of metabolic status from a blood specimen (metabonomics). We investigated whether metabolite profiles could predict the development of diabetes. Among 2,422 normoglycemic individuals followed for 12 years, 201 developed diabetes. Amino acids, amines and other polar metabolites were profiled in baseline specimens by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS). Cases and controls were matched for age, body mass index and fasting glucose. Five branched-chain and aromatic amino acids had highly significant associations with future diabetes: isoleucine, leucine, valine, tyrosine and phenylalanine. A combination of three amino acids predicted future diabetes (with a more than threefold higher risk for individuals in top quartile). The results were replicated in an independent, prospective cohort. These findings underscore the potential key role of amino acid metabolism early in the pathogenesis of diabetes and suggest that amino acid profiles could aid in diabetes risk assessment.

Metabolic diseases are often present for years before becoming clinically apparent. For instance, by the time relative insulin deficiency manifests as hyperglycemia and a diagnosis of type 2 diabetes is made, considerable pancreatic beta cell insufficiency has already occurred¹. Current clinical and laboratory predictors such as body mass index or fasting glucose can be helpful in gauging diabetes risk², but they often reflect extant disease, are most useful when assayed in temporal proximity to the development of overt diabetes and may provide little additional insight regarding pathophysiological mechanisms. Given the availability of effective interventions for delaying or preventing the onset of type 2 diabetes and the increasing burden of the condition worldwide, earlier identification of individuals at risk is particularly crucial³⁻⁶.

Emerging technologies have made it more feasible to acquire high-throughput profiles of a whole organism's metabolic status (metabolite profiling, or metabonomics)⁷⁻¹⁰. These techniques, which allow assessment of large numbers of metabolites that are substrates and products in metabolic pathways, are particularly relevant for studying metabolic diseases such as diabetes. Furthermore, in addition to serving as potential biomarkers of disease¹¹, metabolites may have unanticipated roles as regulatory signals with hormone-like functions^{12,13} or effectors of the disease process itself¹⁴.

Recent cross-sectional studies have documented differences in blood metabolite profiles before and after glucose loading¹⁵⁻¹⁷ and in obese compared with lean individuals¹⁴. These studies have noted differences in the abundance of C3 and C5 acylcarnitines, glutamine and glutamate, additional amino acids and other small molecules. These observations raise the possibility that alterations in plasma metabolite concentrations could presage the onset of overt diabetes and therefore aid in the identification of at-risk individuals by adding information over standard clinical markers. We performed metabolite profiling in participants from two large, longitudinal studies, with the goal of identifying early pathophysiological changes that might also serve as new predictors of future diabetes.

RESULTS

Metabolite profiling in the Framingham Offspring Study

We performed a nested case-control study in the Framingham Offspring Study. Among 2,422 eligible, nondiabetic subjects who underwent a routine examination between 1991 and 1995, 201 individuals developed new-onset diabetes during a 12-year follow-up period (cases). We performed metabolite profiling on the baseline samples from 189 of these individuals, for whom we found 189 propensity-matched control subjects from the same baseline examination who

¹Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ²Cardiology Division, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ³Framingham Heart Study of the National Heart, Lung, and Blood Institute and Boston University School of Medicine, Framingham, Massachusetts, USA. ⁴Department of Mathematics and Statistics, Boston University, Boston, Massachusetts, USA. ⁵Cardiology Section, Boston Medical Center, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, USA. ⁶Division of Cardiology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ⁷Renal Division, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ⁸Blood Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA. ⁹Division of Endocrinology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁰National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Intramural Research, Bethesda, Maryland, USA. ¹¹Jan Mayer US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center, Tufts University, Boston, Massachusetts, USA. ¹²Department of Experimental Medical Science, Lund University, Malmö, Sweden. ¹³Diabetes Unit, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁴Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁵Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö, Sweden. Correspondence should be addressed to T.J.W. (twang@partners.org) or R.E.G. (rgerszten@partners.org).

Received 7 April 2010; accepted 19 January 2011; published online 20 March 2011; doi:10.1038/nm.2307

- アメリカのコホート研究 (Framingham Offspring Study) の参加者のうち、1991–95年検診で糖尿病(-)だった2422人を12年間追跡
- 新規糖尿病患者189名と、糖尿病なし189名の代謝物プロファイルを比較 (LC–MS法によるメタボローム解析で、61の代謝物を測定 [定量可は48])
- 得られた結果を、スウェーデンのコホート研究 (Malmö Diet and Cancer study) で確認・検証

コホートスタディ

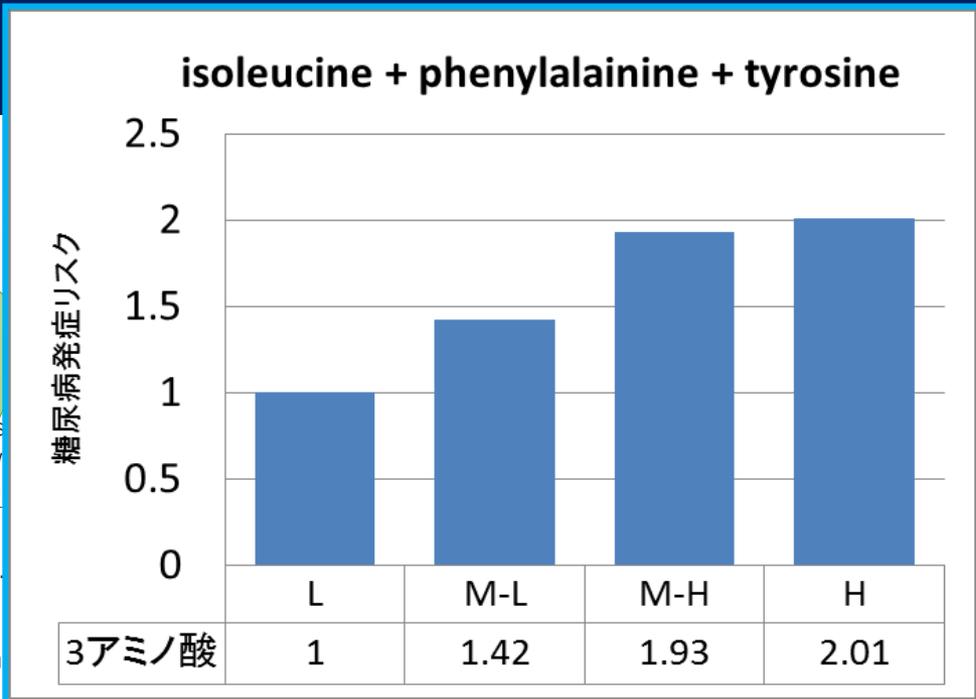
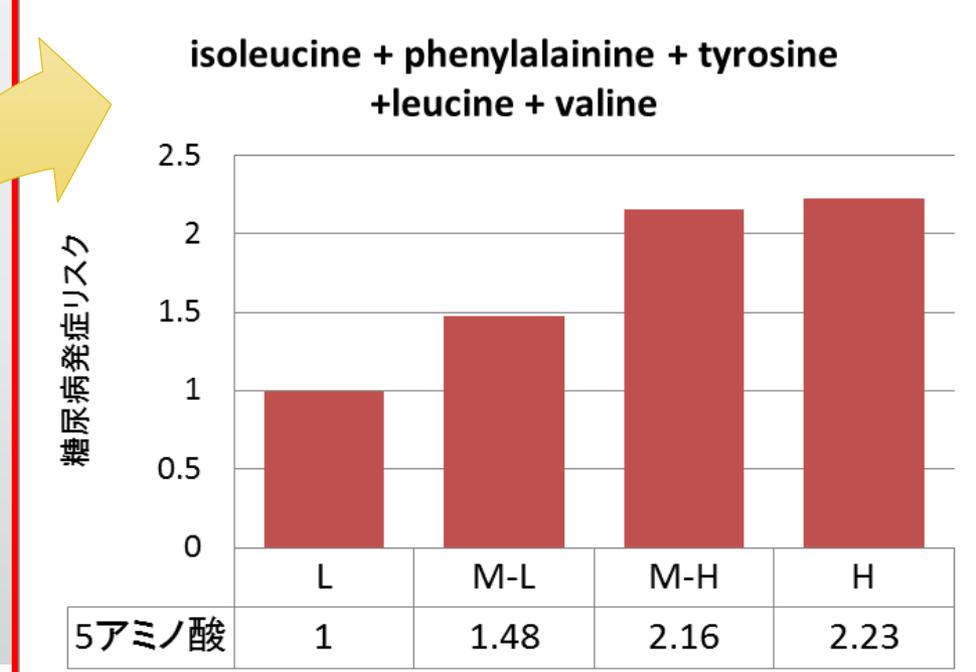


Table 5 Results for the amino acid combination cohort sample

Model	Three amino acids (isoleucine, phenylalanine and tyrosine)	Five amino acids (isoleucine, phenylalanine, tyrosine, leucine and valine)
Models adjusting for age, sex, BMI and fasting glucose (n = 601)		
Per s.d. (score)	1.33 (1.08–1.63)	1.33 (1.08–1.58)
P	0.008	0.007
First quartile	1.0 (referent)	1.0 (referent)
Second quartile	1.12 (0.64–1.98)	1.07 (0.60–1.91)
Third quartile	1.43 (0.81–2.53)	1.67 (0.95–2.95)
Fourth quartile	1.73 (0.96–3.10)	1.94 (1.08–3.49)
P for trend	0.03	0.005
Models adjusting for age, sex, BMI, fasting glucose and parental history (n = 500)		
Per s.d. (score)	1.36 (1.08–1.70)	1.38 (1.09–1.74)
P	0.008	0.007
First quartile	1.0 (referent)	1.0 (referent)
Second quartile	1.42 (0.73–2.73)	1.48 (0.76–2.89)
Third quartile	1.93 (1.00–3.71)	2.16 (1.11–4.20)
Fourth quartile	2.01 (1.02–3.99)	2.23 (1.12–4.42)
P for trend	0.03	0.01

Values are odds ratios (95% confidence intervals) for diabetes, from conditional logistic regressions. The amino acid combination is modeled according to the formula $\beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$, with X_j denoting the standardized value for the j th amino acid and β_j denoting the regression coefficient from the conditional logistic regression model containing the indicated metabolites.

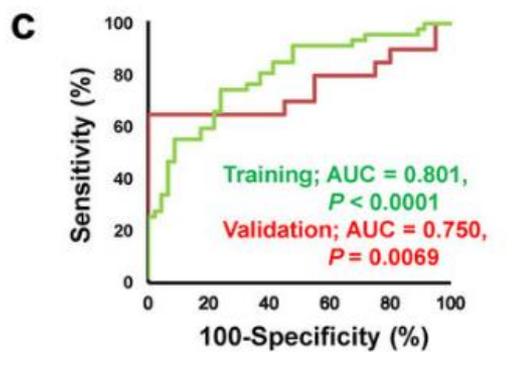
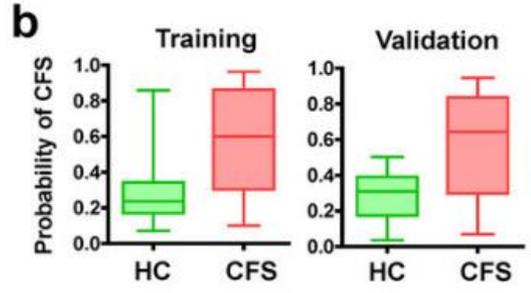
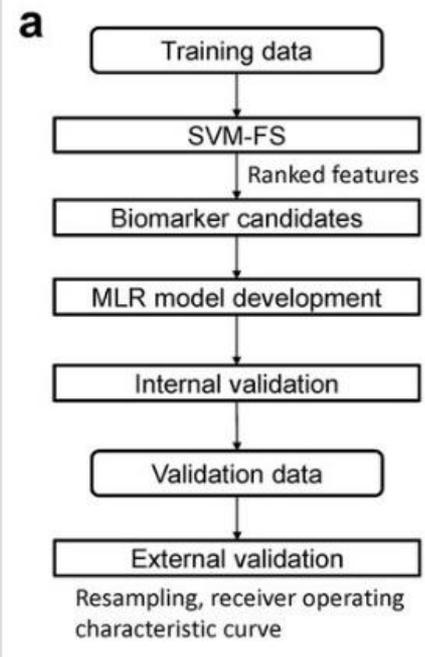
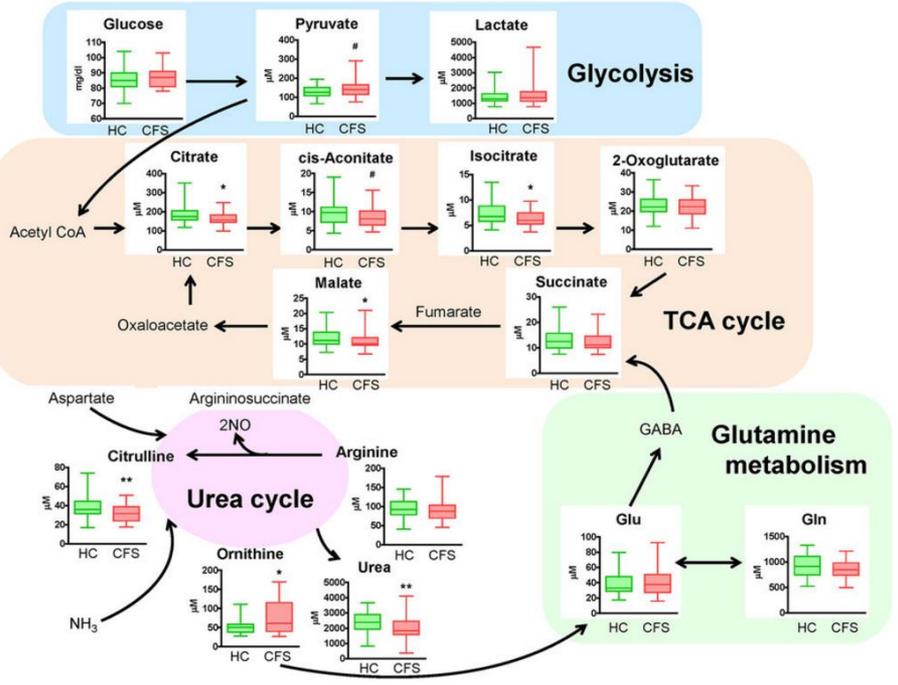


SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Index markers of chronic fatigue syndrome with dysfunction of TCA and urea cycles

Received: 23 June 2016
 Accepted: 21 September 2016
 Published: 11 October 2016

Emi Yamano¹, Masahiro Sugimoto², Akiyoshi Hirayama², Satoshi Kume³, Masanori Yamato³, Guanghua Jin³, Seiki Tajima^{3,4}, Nobuhito Goda⁵, Kazuhiro Iwai⁶, Sanae Fukuda^{1,7}, Kouzi Yamaguti^{1,8}, Hirohiko Kuratsune^{7,8}, Tomoyoshi Soga², Yasuyoshi Watanabe^{1,9} & Yosky Kataoka^{1,3}



尿メタボローム（乳癌・大腸のマーカ―）

Imaging, Diagnosis, Prognosis

N^1,N^{12} -Diacetylspermine as a Sensitive and Specific Novel Marker for Early- and Late-Stage Colorectal and Breast Cancers

Kyoko Hiramatsu,¹ Keiichi Takahashi,² Taturu Yamaguchi,² Hiroshi Matsumoto,² Hidenori Miyamoto,² Souichi Tanaka,⁵ Chikako Tanaka,² Yoshiko Tamamori,³ Mari Imajo,⁶ Masashi Kawaguchi,⁶ Masakazu Toi,² Takeo Mori,⁴ and Masao Kawakita⁶

Table 1. Summary of DiAcSpm levels in benign gastrointestinal disease cases and postoperative cancer cases in complete remission

	No. cases	DiAcSpm/cutoff value	
		<1	≥1
Benign tumors			
Adenoma	15	13	2
Carcinoid	2	2	0
Neurilemoma	1	1	0
Lipoma	1	1	0
Inflammatory bowel diseases			
Ulcerative colitis	4	2	2*
Crohn's disease	2	0	2*
Radiation enterocolitis	1	0	1*
Acute inflammatory diseases			
Cholecystitis	1	0	1
Appendicitis	1	0	1
Others			
Hemorrhoids	8	7	1
Hernia	3	2	1
Uterine prolapse	1	1	0
Intestinal obstruction	2	2	0
Gastric ulcer	1	1	0
Intestinal ulcer	1	1	0
Gallstone disease	2	2	0
Malabsorption syndrome	1	0	1*
Postoperative cancer cases in CR	4	4	0

*Patients in the active phase of the disease.
 *Patient with hepatitis C.

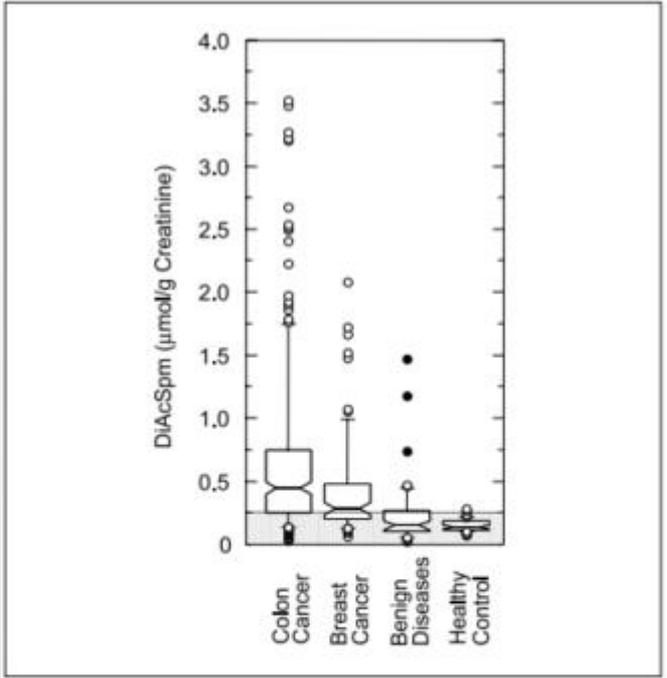


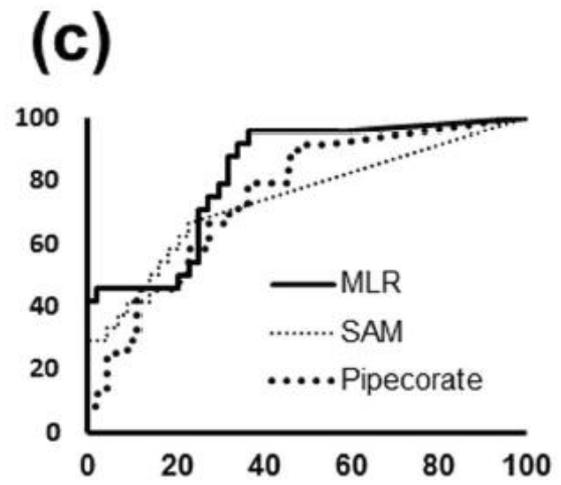
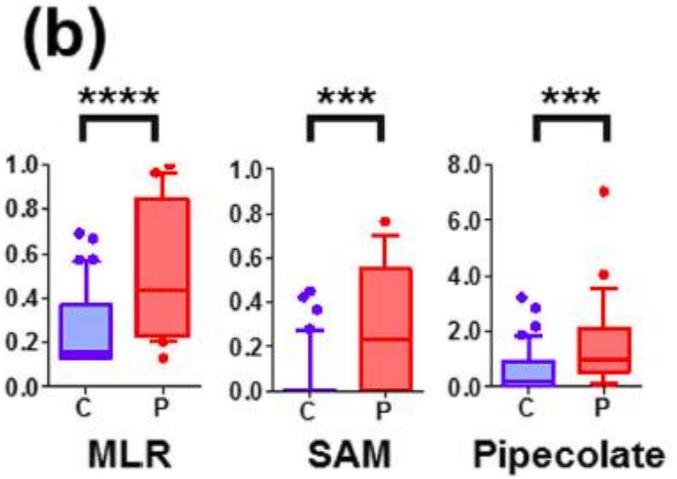
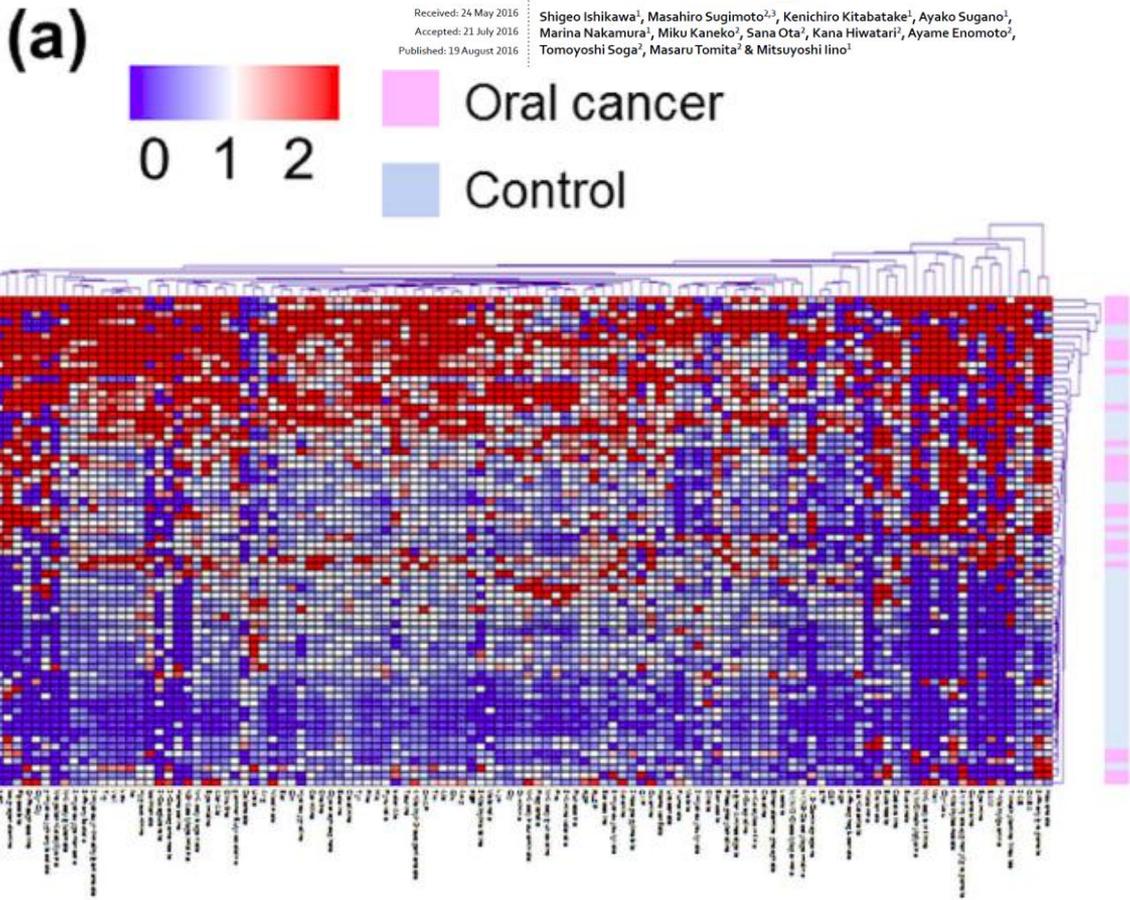
Fig. 1. Sensitivity of DiAcSpm for colon cancer and breast cancer. Urinary DiAcSpm levels (percentiles) in cancer patients, patients with benign diseases, and healthy controls. DiAcSpm values are expressed as $\mu\text{mol/g}$ creatinine and are in box plot format. Values included in each box, middle 50% of values of the studied population. Middle bar, median value, with the 95% confidence interval (notches). Values included between the bottom and top bars, values of 90% of the population. Dots outside the bars, values of the remaining individuals. Points above 4.0 $\mu\text{mol/g}$ creatinine (8 and 1 among colon and breast cancer patients, respectively) are omitted. Raw median values (with ranges in parentheses) of DiAcSpm for 248 colon cancer patients, 83 breast cancer patients, and 52 healthy controls were 0.457 $\mu\text{mol/g}$ creatinine (0.035-24.6), 0.283 $\mu\text{mol/g}$ creatinine (0.069-6.4), and 0.139 $\mu\text{mol/g}$ creatinine (0.077-0.285), respectively. Solid symbols in the benign disease group are patients who were in the active phase of inflammatory bowel diseases (see text).

唾液メタボローム（口腔癌のマーカ―）

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening

Received: 24 May 2016
 Accepted: 21 July 2016
 Published: 19 August 2016
 Shigeo Ishikawa¹, Masahiro Sugimoto^{2,3}, Kenichiro Kitabatake¹, Ayako Sugano¹, Marina Nakamura¹, Miku Kaneko¹, Sana Ota², Kana Hiwatari², Ayame Enomoto², Tomoyoshi Soga², Masaru Tomita² & Mitsuyoshi Iino¹



心血管関連

「過労死」(Karoshi)分野の研究では、現在のところヒットする文献少数

動物実験ではストレスモデルにおいて数種のアミノ酸
(BCAAs、フェニルアラニン)異常の報告¹⁾

心血管疾患との関連において、Vicente B.らは心筋虚血(冠動脈形成術
施行患者)を持つ患者のメタボロームprofileを2012年にJACCで発表²⁾

2015年にはWurtz P.らは心血管疾患の予測因子の同定のために幾つか
の大規模 study から得られた血漿を、NMRを用いて解析を行い、
phenylalanine、monounsaturated and polyunsaturated fatty acidをリスク
因子として同定³⁾

1) Kume S, *et al.* PLoS 2015, 10.

2) Vicente B, *et al.* J Am Coll Cardiol. 2012, 59, 1629–1641.

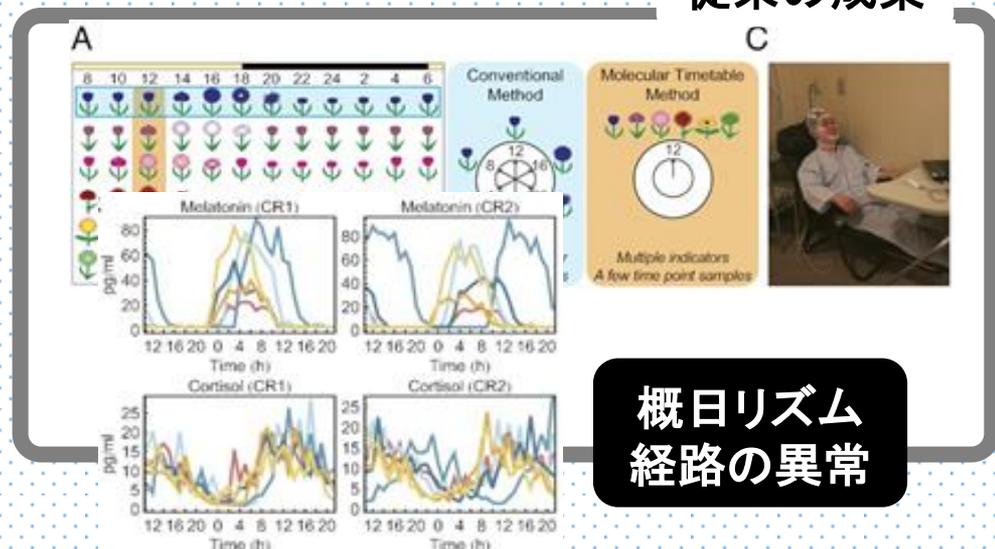
3) Wurtz P, *et al.* Circulation 2015, 131, 774–785

疲労の蓄積と血中メタボロームの期待されるメカニズム

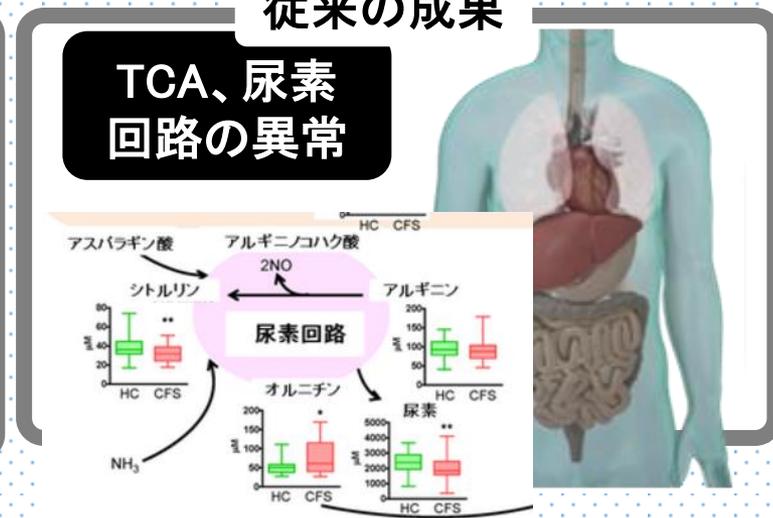
Kasukawa, Sugimoto et al, PNAS, 2012
Minami, Sugimoto et al, PNAS, 2009

Yamano, Sugimoto et al, Sci Rep, 2016

従来の成果



従来の成果



疲労を客観的に可視化する体液(血液・唾液・尿)の検査

多数のマーカーで評価し(1)高精度な評価指標、(2)個人ごとの違い(サブクラス探索)を行うことが可能

#ACS患者と対照の発症していない健常人とのメタボロームprofileの比較

#その代謝物質が残業時間の多い健常人では？



過労死を予測する因子？

7. 関連した研究

本研究の協力者である杉本博士はメタボローム解析を用いて唾液を用いた口腔がんなどの検出と採取条件の検討1)～3)、血液を用いた慢性疲労の検出4)、尿を用いた糖尿病性腎障害のタイプ識別5)などを発表している。

さらに血液検体の保存条件、代謝物抽出方法の安定性の試験6)、生活習慣が唾液メタボロームに与える影響などの検討を行ってきた7)。

1) Sugimoto *et al.* *Metabolomics*. 2010, 6, 78–95.

2) Ishikawa *et al.* *Sci Rep*. 2016, 6, 31520.

3) Ishikawa *et al.* *Amino Acids*. 2017, 49, 761–770.

4) Yamano *et al.* *Sci Rep*. 2016, 6, 34990.

5) Hirayama *et al.* *Anal Bioanal Chem*. 2012, 404, 3101–3109.

6) Hirayamae *et al.* *Electrophoresis*, 2015, doi: 10.1002/elps.201400600

7) Sugimoto *et al.* *Metabolomics*, 2013, 10, 454–463

8. 実施計画及び目標

対象：

- ①当院を受診されたACS患者、60歳までの勤労者
 - ②年齢と性別を一致した、当院健康診断部を受診する60歳までの勤労者
 - ③当院の職員で残業時間が80時間を越える者
- 各々、20例を目標とする。

9. 倫理的配慮

人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（平成26年文部科学省・厚生労働省告知第3号）に則り、関東労災病院の倫理委員会の承認を得て実施される。個々の対象者には十分な説明を行い、同意を得る。個人情報には最大限の注意を払い、データファイルは全て暗号化され、個人の特定は不可能にする。

* 倫理委員会 審査済 (No. 2017-15)