慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ステロイドホルモン・プロファイリングを用いた女性健康実現のための地域コホート研究
Sub Title	Profiling of steroid hormone for women's health and wellbeing : metabolomics cohort study
Author	飯田, 美穂(Iida, Miho) 近藤, 善紀(Kondo, Yoshiki) 涌井, 昌俊(Wakui, Masatoshi) 渡辺, 慶子(Watanabe, Keiko) 武林, 亨(Takebayashi, Toru)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	地域在住者コホート研究におけるステロイドホルモン代謝物の測定系構築を目指す中で、高齢女性における健康課題に重要な役割を担うとされる男性ホルモンと骨密度との関連に着目して検討を行った。その結果、閉経後女性における血中遊離テストステロン値は、既知の骨粗鬆症リスク因子を調整した上でも、骨密度と有意な正の関連を示し、その関連は同年代の男性に比してより強いことが示唆された。また、骨密度正常群と低下群の血中メタボローム プロファイリングを行った結果、特にL-Kynurenineという代謝物が、年齢、BMI、喫煙飲酒習慣調整後も有意に骨密度低下群で血中濃度が低く、バイオマーカー候補となる可能性が示唆された。 In the course of establishing a system for steroid hormone profiling in a cohort study of community residents, we focused on free testosterone, which is believed to play an important role in health issues among elderly women, and examined their association with bone mineral density (BMD). The study results suggested that blood free testosterone concentration levels are positively associated with BMD among postmenopausal women, even after adjusting for known osteoporosis risk factors such as age, BMI, smoking habit, drinking habit, and physical activity. The association was stronger than that in men of the same age, indicating the importance of gender-specific studies. Metabolomic analysis indicated that L-Kynurenine had significantly lower blood concentration levels in the low BMD group, even after adjustment for age, BMI, and smoking and drinking habits, suggesting that L-Kynurenine may be a candidate biomarker for low BMD. Further research is warranted.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2019～2022 課題番号：19K19416 研究分野：女性医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K19416seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：１９Ｋ１９４１６

研究課題名（和文）ステロイドホルモン・プロファイリングを用いた女性健康実現のための地域コホート研究

研究課題名（英文）Profiling of steroid hormone for women's health and wellbeing: metabolomics cohort study

研究代表者
飯田　美穂（Iida, Miho）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：７０５９４５０５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：地域在住者コホート研究におけるステロイドホルモン代謝物の測定系構築を目指す中で、高齢女性における健康課題に重要な役割を担うとされる男性ホルモンと骨密度との関連に着目して検討を行った。その結果、閉経後女性における血中遊離テストステロン値は、既知の骨粗鬆症リスク因子を調整した上でも、骨密度と有意な正の関連を示し、その関連は同年代の男性に比してより強いことが示唆された。また、骨密度正常群と低下群の血中メタボロームプロファイリングを行った結果、特にL-Kynurenineという代謝物が、年齢、BMI、喫煙飲酒習慣調整後も有意に骨密度低下群で血中濃度が低く、バイオマーカー候補となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
世界で最も高齢化が進んでいる我が国の女性にとって、健康長寿と高齢期のウェルビーイングの実現は社会的課題である。加齢に伴う性ホルモンの低下が様々な疾患やQOLの障害と関連している可能性が期待される中、女性ホルモンについては補充療法の効果や副作用に関する知見が多数存在するが、男性ホルモンについてはエビデンスの蓄積が不十分である。本研究成果より、一般地域在住女性において、血中男性ホルモン濃度が要介護状態の原因の多くを占める骨折ならびにその原因となる骨密度低下と有意に関連していることが明らかとなった。引き続きステロイドホルモンプロファイル解析を進め、性ホルモン産生の機序解明に関する知見を深めたい。

研究成果の概要（英文）：In the course of establishing a system for steroid hormone profiling in a cohort study of community residents, we focused on free testosterone, which is believed to play an important role in health issues among elderly women, and examined their association with bone mineral density (BMD). The study results suggested that blood free testosterone concentration levels are positively associated with BMD among postmenopausal women, even after adjusting for known osteoporosis risk factors such as age, BMI, smoking habit, drinking habit, and physical activity. The association was stronger than that in men of the same age, indicating the importance of gender-specific studies. Metabolomic analysis indicated that L-Kynurenine had significantly lower blood concentration levels in the low BMD group, even after adjustment for age, BMI, and smoking and drinking habits, suggesting that L-Kynurenine may be a candidate biomarker for low BMD. Further research is warranted.

研究分野：女性医学

キーワード：テストステロン　ステロイドホルモン　骨密度　メタボローム

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９，F－１９－１，Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

世界で最も高齢化が進んでいる我が国の女性にとって，健康長寿と高齢期のウェルビーイングの実現は重要な社会敵課題である．加齢に伴う健康寿命延伸・QOL 向上において，ステロイドホルモンが果たす役割の重要性が明らかになってきた．とくに高齢女性においては，更年期状態の把握以外に女性ホルモン濃度を測定する意義は乏しいと認識されてきたのに対し，閉経後の卵巣からもエストラジオールやテストステロン等が，閉経後の副腎から性ホルモンの前駆体である DHEA が高濃度に分泌されていることが明らかとなり，これらの網羅的なプロファイルと認知機能低下，フレイルや動脈硬化性疾患，骨粗鬆症等との関連について検証する意義は大きいと考えられる．

性ホルモンであるエストロゲンとアンドロゲンは，ともにコレステロールから合成されるステロイドホルモンで，そのカスケード反応系列中には様々な代謝物が存在する．また，ステロイドホルモンは糖や脂質代謝を含む生体内の広範な代謝とも密接に関わり（図 1），生活習慣病の背景要因としての役割を持つことや，肥満に伴うステロイドホルモンの変化を介した糖・脂質代謝異常の発現機構も明らかにされつつある．一方で，ステロイドホルモン合成経路全体のプロファイルを俯瞰的に分析した研究や，ステロイドホルモンが加齢に伴い変化する生体内全体の代謝プロファイルに与える影響について統合的に解析された研究は少ない．

近年，生体内の代謝物を網羅的に測定するメタボローム解析技術の急速な進展が，生体試料中に存在する千種類以上の代謝物を一斉分析することを可能にした．申請者らは，2012 年度より，11,002 名の一般地域住民による前向きコホート研究である「鶴岡メタボロームコホート研究」を立ち上げ，すべての血液・尿検体について，高精度かつ網羅的なメタボローム解析を実施する　体制を築き，基礎調査時の全検体の代謝物測定を完了した．そこで本研究では，ステロイドホルモンの網羅的プロファイリングと生体内の代謝物であるメタボロームのプロファイリング，そして疾患情報や健康調査結果などを包括的かつ統合的に解析することで，高齢女性の健康状態に関連する代謝プロファイルを明らかにすることができるのではないか，という学術的問いから，研究計画を立案した．

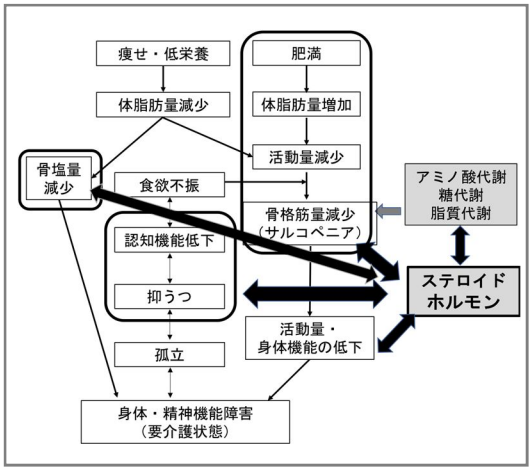

図 1. フレイルカスケードにおけるステロイドホルモンの役割

２．研究の目的

本研究の目的は，大規模コホート集団において閉経後女性における生体内のステロイドホルモンのプロファイリングを実施するとともに，血中・尿中代謝プロファイル，疾患情報，健康調査結果等と，測定したステロイドホルモンのプロファイルを総合的に解析することで，高齢女性の健康状態や QOL に関連する代謝プロファイルおよびステロイドホルモンプロファイルを明らかにし，女性の健康寿命・QOL 向上に繋げることである．

３．研究の方法

(1) LC-MS/MS によるステロイドホルモンのプロファイル測定の構築の試み

研究協力者の協力を得て，ステロイドホルモンのプロファイリング技術を疫学研究に導入するための基礎的検討を行った．液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）は，幅広い分子量と極性範囲の有機化合物を直接イオン化できることから様々な分野で用いられている手法で，ステロイドが生体内での濃度レンジが広くかつ微量であり，また多種多様という点を特徴として持つことから，ステロイド研究においても有用な測定法として用いられている．一方で，これまでに報告されている LC-MS におけるステロイド測定系は，疾患特異的ステロイドに限定されたものが多く，さらには健常人濃度域が測定可能な感度に達していないものも存在する．これらを克服する，すなわち単一の測

定系で網羅的かつ高感度に測定できれば，診断学的応用が期待されるとともに，健常人を対象とした疫学研究への適用も可能となると考えた．そこで，既報よりも対象ステロイド数を増やすとともに，既報と異なる誘導体化法を用い，カラムや移動相条件の最適化を通じて，より高分離な一斉分析系の構築を目指すことを目的に，表 1 に示す 25 種類のステロイド標品を評価に用いて基礎的検討を進めた．その結果，ステロイドの一斉分離は予想以上に困難であり，グループ分けに基づくプロファイル測定系の構築も視野に入れるべきであることが示唆された．

そのため，当初予定をしていたステロイドプロファイリング実施計画を変更し，高齢女性における重要な健康課題の 1 つであるサルコペニアへの関与が大きいと考えられる遊離型テストステロン(free T)に着目し，女性の骨密度との関連解析に注力することとした．

表 1．評価に用いた 25 種のステロイド一覧

Group	Name	Symbol
Pregnanolone	Pregnenolone	P5
	17-hydroxypregnenolone	17OHP5
	16-hydroxypregnenolone	16OHP5
Progesterone	Progesterone	P4
	17-hydroxyprogesterone	17OHP4
	16-hydroxyprogesterone	16OHP4
	21-deoxycortisone	21DOE
	21-deoxycortisol	21DOF
Androgen	Dehydroepiandrosterone	DHEA
	Testosterone	T
	Dihydrotestosterone	DHT
	Androstenedione	AD4
	11-hydroxyandrostenedione	11OHAD4
Estrogen	Estrone	E1
	Estradiol	E2
	Estriol	E3
Gluco-corticoid	11-deoxycortisol	S
	Cortisone	E
	Cortisol	F
Mineral-corticoid	11-deoxycorticosterone	DOC
	Corticosterone	B
	11-dehydrocorticosterone	A
	Aldosterone	Ald
Hybridsteroid	18-hydroxycortisol	18OHF
	18-oxocortisol	18oxoF

(2)骨密度と男性ホルモンの関連ならびに骨密度の生体内メタボロームプロファイル解析

① 研究対象者の選定

山形県鶴岡市に在住・在勤する 35-74 歳の一般市民を対象とした「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究」の女性参加者である．第 2 次包括調査(2018-2020 年度)に参加した 65 歳以上 80 歳以下の女性のうち，骨密度検査ならびに血中 free T 濃度測定を実施し，かつ骨粗鬆症薬またはステロイド薬未使用者 816 名を解析対象に，男性ホルモンと骨密度との関連解析を実施した．病歴や服薬情報は自記式質問票を用いて収集した．次に，骨密度を規定する生体内全体のメタボロームのプロファイリングを実施するために，ベースライン調査(2012-2014 年度)に参加したメタボローム測定済の自然閉経後女性のうち，骨密度検査を実施し，かつ骨粗鬆症薬またはステロイド薬未使用者 759 名を対象とした．

② 骨密度の測定

測定部位は橈骨遠位端で，測定法は dual-energy X-ray absorptiometry(DXA 法)，使用機器はすべて同一のものを用いた（使用機器:ALOKA Dichroma Scan DCS-600EXV)．

③ 検体採取およびメタボローム解析

血液検体は，前日 20 時以降は水分摂取のみとした条件下で早朝空腹時に採取した．血中 free T(pg/mL)は，免疫法を用いて測定した．メタボローム解析は，早朝空腹時に採取した血漿を，キャピラリー電気泳動・質量分析（CE/MS）法により実施し，極性代謝物質の濃度を網羅的に完全定量した．本研究では，CE/MS 法で十分な精度で安定的に測定できる血漿中の 115 種の低分子化合物のうち，90%以上の対象者に検出された 94 物質を解析に用いた．各物質濃度は対数変換して解析に用いた．

④ 統計学的解析

解析対象者を，若年成人平均値(YAM)80%以上の骨密度正常群，YAM80%未満の骨密度低下群に分類した．血中 free T 濃度の 3 分位数に基づき 3 群(T1/T2/T3)に分類し，群間の特性比較を行った．さらに，骨密度低下群を従属変数，血中 free T 濃度群(T1/T2/T3)を説明変数としたロジスティック回帰分析に加えて，骨密度(連続量変数)を従属変数，血中 free T 濃度(T1/T2/T3)を説明変数とした分散分析，血中 free T 濃度(連続変数)を説明変数に用いた線形回帰分析を実施した．いずれも調整変数は年齢，BMI，喫煙習慣，飲酒習慣，身体活動量，学歴を用いた．骨密度の生体内メタボローム

プロファイル解析については，対数変換した各血漿メタボローム濃度を用いて部分的最小二乗判別分析を行い，94 物質の血漿メタボローム全てを用いて 2 群の判別を試みた．また，共分散分析（共変量として年齢，BMI，活動量，喫煙習慣，飲酒習慣を用いた）により，2 群間の血漿濃度の差を比較し，多重比較の調整に FDR 法を用いた．統計解析には SAS9.4 (SAS Institute Inc)ならびに MetaboAnalyst4.0 を使用した．

４．研究成果

(1) 地域在住高齢女性における血中 free T 濃度と橈骨骨密度との関連

全対象者の血中 free T 濃度(pg/mL)は 0．96±0.44 で，橈骨遠位端の骨密度が YAM<80%の割合は 66.5%であった．血中 free T 濃度の 3 分位数に基づき 3 群に分けて特性を比較した結果，群間で年齢差は認めず，一方血中 free T 濃度が高い群ほど BMI が高く，高血圧ならびに耐糖能異常の割合が高く，そして橈骨遠位端の骨密度が YAM<80%の割合が低かった(表 2)．年齢，BMI，喫煙習慣，飲酒習慣，身体活動量，学歴を調整した重回帰分析の結果，いずれの解析手法を用いても血中 free T 濃度と骨密度に正の関連を認めた(表 3)．なお，同コホート研究に参加する同年代の男性と比較をしたところ，オッズ比は男性に比べて女性で高く，地域在住高齢男女において，血中 free T 濃度と骨密度は，女性においてより強い関連があることが示唆された．本成果は第 93 回日本衛生学会学術総会で発表した．

(2) 地域在住高齢女性の骨粗鬆症における血中メタボローム解析

94 の血中代謝物を用いて骨密度正常群と低下群の判別分析を行った結果，2 群の判別に寄与する物質が複数同定された(図 2)．次に，各物質の血中濃度の 2 群間比較を行った結果，計 3 物質が有意差を認め，年齢，BMI，活動量，喫煙習慣，飲酒習慣を調整した結果，L-Kynurenine が有意差を持って骨密度低下群で血中濃度が低いことが示された．実際，in vitro の研究において，骨芽細胞形成過程でキヌレニン経路が活性化されること，また in vivo では Tryptophan を Kynurenine に代謝する律速酵素である IDO1（indoleamine-2,3-dioxygenase1）ノックアウトマウスが骨量減少症を呈することが示されていることが報告されている．ヒトでの骨密度低下のバイオマーカー候補になり得るか，更なる検討が必要である．

表 2．解析対象者の特性

	T1	T2	T3
Free T[pg/mL]	0.6±0.1	0.9±0.1	1.4±0.4
年齢 [歳]	70.4±3.8	70.2±3.6	70.9±3.9
BMI [kg/m²]	22.2±3.3	23.5±3.3	24.5±3.4
高血圧 1)	58.1%	63.3%	67.4%
脂質異常症 2)	66.0%	60.6%	62.8%
耐糖能異常 3)	8.7%	10.8%	17.8%
身体活動量 [METs*時/日]	13.3 (7.2,21.4)	13.1 (7.2,21.0)	14.0 (8.2,22.3)
学歴[高卒以上]	19.0%	22.8%	20.1%
現在喫煙	1.6%	0.8%	0.3%
現在飲酒	20.2%	24.3%	22.4%
橈骨骨密度 [g/cm²]	0.48±0.07	0.50±0.07	0.51±0.07
YAM<80%	69.2%	62.9%	55.9%

1)高血圧：収縮期血圧≧140 OR 拡張期血圧≧90 OR 降圧薬服用中 2)脂質異常症：TG≧150 OR LDL-C≧140 OR HDL-C≦40 OR 高脂血症薬服用中 3)耐糖能異常：空腹時血糖値≧126 または HbA1c≧6.5%または糖尿病治療薬使用中．

表 3．血中 freeT と骨密度低下の関連

(A) 多重ロジスティック回帰分析

	OR	95%CI	P
Free T 濃度	1.61	1.13-2.29	0.009
年齢	0.90	0.86-0.94	<0.001
BMI	1.06	1.01-1.11	0.02
現在喫煙あり	0.36	0.04-3.23	0.36
現在飲酒あり	0.94	0.65-1.34	0.72
身体活動量	1.00	0.99-1.02	0.52
高卒以下	1.24	0.85-1.81	0.26

(B) 線形回帰分析ならびに共分散分析

	β	SE	95%CI	P
Free T [pg/mL]	19.6	5.7	8.5-30.7	0.001
Free T: Tertiles				
T1 (0.1-0.7)	Reference			
T2 (0.8-1.0)	12.1	6.2	-0.1-24.3	0.052
T3 (1.1-3.6)	18.6	6.2	6.5-30.7	0.003

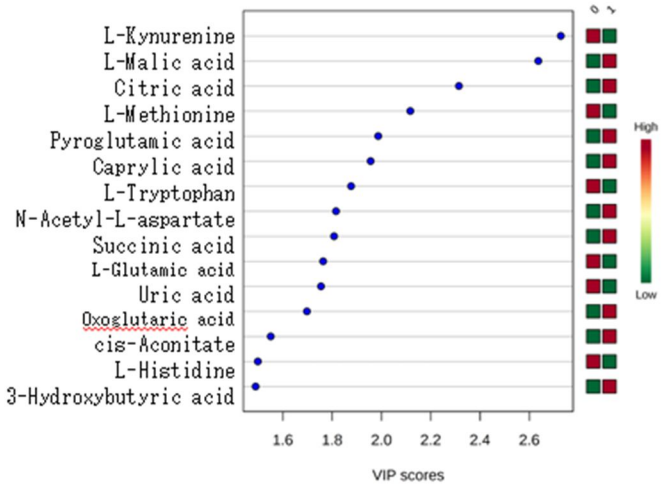

図 2. 骨密度正常群・低下群の判別分析における VIP(Variable Importance in Projection:変数重要度)スコア. 値が大きいほど予測モデルの予測性能に対する寄与度が大きいとされ、特に１以上でモデルの構築に重要な成分とされている.

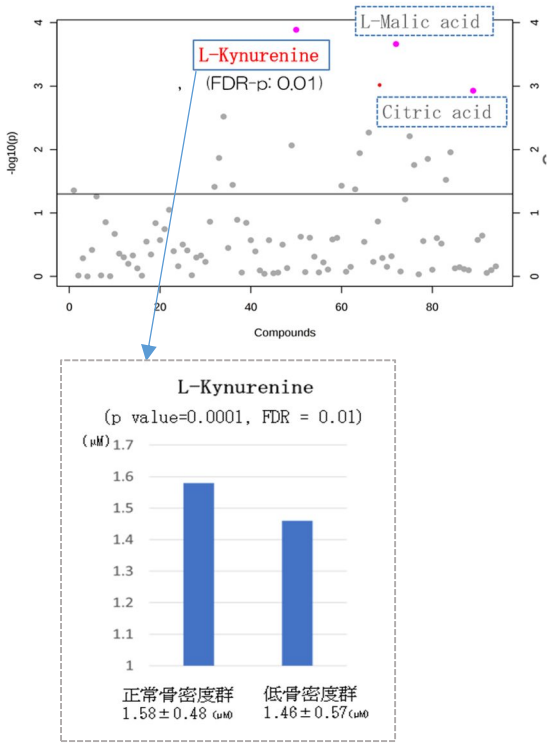

図3. 骨密度と関連がみられた代謝物.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Watanabe K, Iida M, Harada S, Kato S, Kuwabara K, Kurihara A, Takeuchi A, Sugiyama D, Okamura T, Suzuki A, Amano K, Hirayama A, Sugimoto M, Soga T, Tomita M, Kobayashi Y, Banno K, Aoki D, Takebayashi T	４．巻 155
２．論文標題 Metabolic profiling of charged metabolites in association with menopausal status in Japanese community-dwelling midlife women: Tsuruoka Metabolomic Cohort Study.	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Maturitas	６．最初と最後の頁 54-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.maturitas.2021.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Iida M, Harada S, Takebayashi T	４．巻 26
２．論文標題 Application of Metabolomics to Epidemiological Studies of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 J Atheroscler Thromb.	６．最初と最後の頁 747-757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.RV17036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 渡辺慶子、飯田美穂、小林佑介、冨永英一郎、阪埜浩司、武林　亨、田中　守、青木大輔
２．発表標題 メタボローム解析を用いた閉経期日本人女性の加齢と閉経による代謝プロファイリング
３．学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
４．発表年 2020年

１．発表者名 飯田美穂、原田成、加藤寿寿華、松元美奈子、佐田みずき、平田あや、 宮川尚子、土岐了大、枝川竣、桑原和代、岡村智教、武林亨
２．発表標題 地域在住高齢者における 血清遊離テストステロン値と橈骨骨密度との関連
３．学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	近藤　善紀 (Kondo Yoshiki)		
研究協力者	涌井　昌俊 (Wakui Masatoshi)		
研究協力者	渡辺　慶子 (Watanabe Keiko)		
研究協力者	武林　亨 (Takebayashi Toru)		

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関