

- 4) Korenaga T, Meno K, Suzuki H, Sugimoto K, Shiraki K, and Uchida K.
Peptidomic and immunological analyses reveal novel circulating biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease. 第34回日本分子生物学会.
2011年12月13日, 横浜
- 5) 杉本和史、山本憲彦、白木克哉、竹井謙之、熊田卓、内田和彦. Pooled Sample を用いた血清中の NASH バイオマーカーペプチドの iTRAQ による同定. 第47回日本肝臓学会総会 (ワークショップ). 2011年6月2日, 東京
- 6) 為田雅彦、杉本和史、白木克哉、山本憲彦、竹井謙之、内田和彦. 二次元電気泳動と多段階質量分析を利用した新規 HCV 関連肝疾患進展マーカーの検出. 第47回日本肝臓学会総会. 2011年6月2日, 東京
- 7) 白木克哉、杉本和史、熊田卓、内田和彦. 網羅的プロテオミクスによる膵癌のバイオマーカーの探索. 第97回日本消化器病学会総会 (ワークショップ). 2011年5月15日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 総括研究報告書 各論

II. 総括研究報告 各論

1. 臨床サンプルと臨床データの収集とデータベース構築

A. 研究目的

茨城県北相馬郡利根町は、茨城県最南端の利根川流域にあり、昭和40年代後半から住宅都市として成長したが、現在、他のベットタウンと同様に高齢化が進んでいる。そこで、筑波大学の朝田らは、利根プロジェクトと称した2001年から今日まで継続する「認知症予防の地域介入縦断研究」を実施しており、そこで蓄積してきた時系列の臨床データと血清を活用し、認知症を発症した者としなかった者の分子基盤の解析を行うものである。MCIの診断には、5-Cogファイブ・コグ（記憶、言語、注意、視空間、推論の5つの認知機能検査）を用いている。表2、3に利根縦断研究に参加人数、採取血清数を示す。

表2 利根町縦断研究の参加者数

	2001年	2005年	2008年	2009年
Normal	1270	813	542	98
MCI	382	211	92	70
合計	1652	1024	634	237

表3 利根町縦断研究の血清サンプル数

	2001年	2005年	2008年	2009年
Normal	705	645	500	—*
MCI	194	153	90	—*
合計	899	798	590	

*2009年の血清は東日本大震災による停電のため溶解し使用対象としていない。

B. 研究方法

参加者は採血と5-Cogファイブ・コグの検査を同時に受けており、NDC、MCI、アルツハイマー病などの認知症やそのほかの精神神経疾患かについての診断を受けている。表3では、各年で新規の参加者からの採血者数を含んでいるため、サンプル数が蓄積しているが、縦断研究として、2001年から継続して参加し、血清サンプルが得られている参加者のうち時間軸にそって解析ができるものを選択した。

C. 研究結果

本研究において今年度において解析に供する血清サンプル数とこれらの参加者の臨床情報を表4に示す。

表4 本研究に使用した利根町縦断研究血清サンプルの数とその臨床情報

	NDC → NDC (n = 46)	NDC → MCI (n = 15)	MCI → MCI (n = 9)
Age (2005)	75.2 ± 0.7	75.5 ± 2.0	74.0 ± 2.7
Age (2008)	79.1 ± 0.7	79.3 ± 1.9	77.5 ± 1.3
Gender (Male/Female)	25/21	2/13	3/6
Years of education	10.5 ± 2.6	9.9 ± 0.5	11.6 ± 0.4
BMI	22.6 ± 2.6	24.2 ± 4.5	22.4 ± 4.4
GDS	2.0 ± 1.7	3.1 ± 0.8	2.7 ± 0.9
Cigarette smoking (%)	16 (34.8%)	1 (7%)	3 (33%)
Alcohol (%)	21 (45.7%)	2 (13%)	3 (33%)
History of disease (%)			
Cardiovascular disease	3 (6.5%)	0 (0%)	0 (0%)
Diabetes mellitus	4 (8.7%)	0 (0%)	1 (5%)
Hyperlipidemia	1 (2.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Hypertension	8 (17.4%)	4 (27%)	3 (33%)

このほかに、MCIからNDCにもどったもの、MCIからADに進行したものがあるが、それらは次年度解析する予定である。本研究では、認知症のない健常高齢者（非認知症老人; NDC, Non-demented control）ならびにMCIとアルツハイマー病について、2001年、2005年、2008年、2009年と臨床評価を行ったもので、2005年と2008年の血清を本研究の解析に供した。すなわち表4に NDC→NDC、NDC → MCI、MCI → MCIと示してあるのは、2005年NDC→2008年NDC、2005年NDC → 2008年MCI、2005年MCI →2008年MCIである。

データベースについては、リスク因子とリスク抵抗要因の分析には、ゲノム・遺伝的要因、疾患関連タンパク質、環境要因を総合的に解析できるように、上記の各項目以外にも測定した血清バイオマーカー濃度を入力や、結果の出力がでるようにした。

D. 考察

本研究においては、アポリポ蛋白E 遺伝子4 というリスクファクターを有しながらもアルツハイマー病を発症しない例に注目した解析が重要であり、整備した臨床情報ならびに血清サンプルの解析によって、これまで明らかにされていないリスク抵抗要因についての情報が得られる可能性がある。また介入による効果があるもの、なかったものの比較について詳細な解析が次年度以降の重要な課題である。本データベースの構築によってこれらの分析ができる環境を整備できた。

2. 新規バイオマーカー（タンパク質・ペプチド）の体内動態ならびにアッセイ系開発のための前処理条件、LC-MS条件の検討

①脳組織、脳脊髄液と血清における新規バイオマーカー（タンパク質・ペプチド）の動態

A. 研究目的

NDCならびにアルツハイマー病の脳組織・髄液・血清におけるバイオマーカーペプチドおよび親タンパク質の存在を明らかにする。本解析におけるバイオマーカーペプチドとはADPEP1315、ADPEP1250、ADPEP1039をさす。親タンパク質とは、それぞれのペプチドの由来するタンパク質をさす。本解析ではNeurexinおよびProthrombinをさす。

B. 研究方法

NDCならびにアルツハイマー病患者由来組織・髄液・血清の前処理を行った後、2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MS (Ultraflex, Bruker Daltonics)ならびに2D-nanoLC-ESI TOF MS/MS (Q-STAR, ABSciex)で各バイオマーカーペプチドの分析を行った。2D-LCにおいては、1次元目をSCXで6 fractionに分画し、2次元目をC18逆相カラムで分画した。

脳組織

2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MSによる分析には、組織5 mgならびに10 mgを用い、2D-nanoLC-ESI TOF MS/MS・組織2 mgを用いた。

髄液

アルツハイマー病：AD 10人分のプールサンプル

NDC：ADN 9人分のプールサンプル

分析に用いた量：髄液500 μ L相当

血漿・血清

25 μ l

C. 研究結果

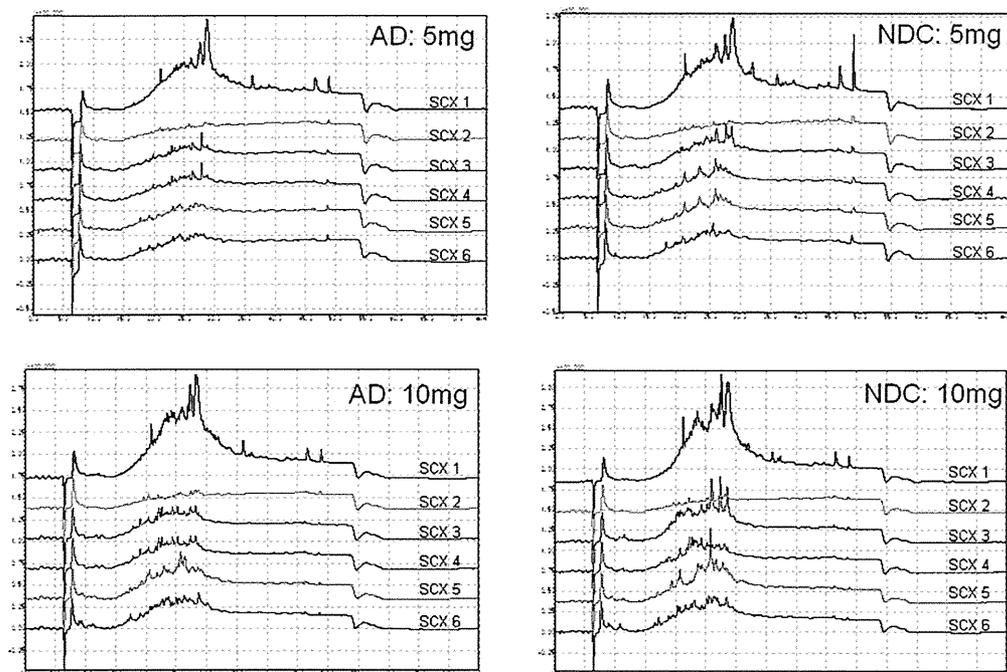


図5 脳組織由来ペプチドの2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MSにおける2次元目C18カラムクロマトグラム

AD：アルツハイマー病脳組織、NDC：NDC脳組織

図5に脳組織由来ペプチドの2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MSにおける2次元目C18カラムクロマトグラムを示す。アルツハイマー病脳組織 5 mg由来ペプチドサンプルの分析結果よりNeurexinは1A、3A、Bに帰属するペプチドが検出された。NDC脳組織 5 mg由来ペプチドサンプルの分析結果よりNeurexinは1A、1B、3Aに帰属するペプチドが検出された。アルツハイマー病脳組織 10 mg由来ペプチドサン

プルの分析結果よりNeurexinは2Aに帰属するペプチドがSCX6に検出された。NDC脳組織 10 mg由来ペプチドサンプルの分析結果よりNeurexinは2A、1Bに帰属するペプチドがSCX4に検出された。いずれの分析においてもADPEP1315に相当するペプチド断片は得られなかった。またProthrombinはタンパク質、ペプチドともに同定されなかった。

2D-nanoLC-ESI TOF MS/MSの分析においては、AD脳組織 2mg由来ペプチドサンプルの分析結果よりNeurexinは1Bに帰属する17ペプチド、3Aに帰属する28ペプチドが検出された。NDC脳組織 2mg由来ペプチドサンプルの分析結果よりNeurexinは1Bに帰属する4ペプチドが検出された。

脳組織におけるNeurexin由来ペプチドについては、アルツハイマー病脳組織において多くのペプチド断片が検出されたが、NDC脳では検出されなかった。髄液でも同様の結果であった。

D. 考察

脳脊髄液と血清におけるバイオマーカーの挙動については、同一患者の脳組織、脳脊髄液ならびに血清5例セットを用いて、両者におけるバイオマーカーの定量を行った。ADPEP1315ペプチドならびにADPEP1250ペプチドマーカーについて、同一患者の脳組織、脳脊髄液ならびに血清についての解析をLC-ESI TOF MS/MSを用いて解析した。バイオマーカーペプチドADPEP1315、ADPEP1250、ADPEP1039の親タンパク質であるNeurexinおよびProthrombin由来のペプチド断片について、脳組織・髄液・血清における存在について解析した結果、Neurexin由来ペプチドについては、アルツハイマー病で多くのペプチド断片が検出され、NDCでは検出されなかったことから、おそらくシナプスの傷害の結果、Neurexinの分解

が促進されたものと考えられる。一方、Prothrombinはその発現が脳組織で報告されており、アルツハイマー病における神経原線維変化部位（neurofibrillary tangles）に集積するという報告があるが、本解析では脳組織、髄液に同タンパク質由来の断片は検出されなかった。

これまでのプレリミナリーな結果と同様、それぞれのペプチドが由来するタンパク質（以後、親タンパク質とよぶ）の全アミノ酸配列上の位置を確認することができた。同一患者の脳組織、脳脊髄液ならびに血清では共通して検出される（おそらくプロテアーゼによって切断される）ペプチド領域があることが明らかになった。これら結果をもとに次年度のペプチドマーカーの解析とこれらのタンパク質・代謝物ペプチドの動態とくに脳内、脳血管関門と末梢血管における移動状況を分析にすすめたい。

②前処理条件、LC-MS条件の検討

A. 研究目的

上記の解析においても前処理条件によって検出されるバイオマーカーペプチドの種類が異なる可能性が考えられた。そこで次年度以降のLC-MS/MS アッセイによる各バイオマーカーの臨床有効性の検討においても必要であることから、LC-MSに供する前の簡易カラムによる前処理について検討を行った。

B. 研究方法

血清25 μ lを以下のカートリッジカラムで処理後（これを前処理とする）、nanoLC-ESI TOF MS/MS (Q-STAR, ABSiex)で血清ペプチドを解析した。

MAX (逆相・陰イオン交換ミックスモード固相)

MCX (逆相・陽イオン交換ミックスモード固相)

WAX (逆相・弱陰イオン交換ミックスモード固相)

WCX (逆相・弱陽イオン交換ミックスモード固相)

洗浄条件：10% アセトニトリル溶液

溶出条件：75% アセトニトリル-1% TFA溶液

洗浄条件・溶出条件は全てのカートリッジカラムで共通とした。

C. 研究結果

評価基準を以下のようにきめて評価を行った。

1. TIC、もしくはBPCにおいてグラジエント時間内に最も多くのピークが高感度に検出されること
2. リコンストラクトピーク数が最も多いこと
3. MS/MSクエリー数が最も多いこと
4. 既知バイオマーカーペプチド・帰属するタンパク質が検出されていること

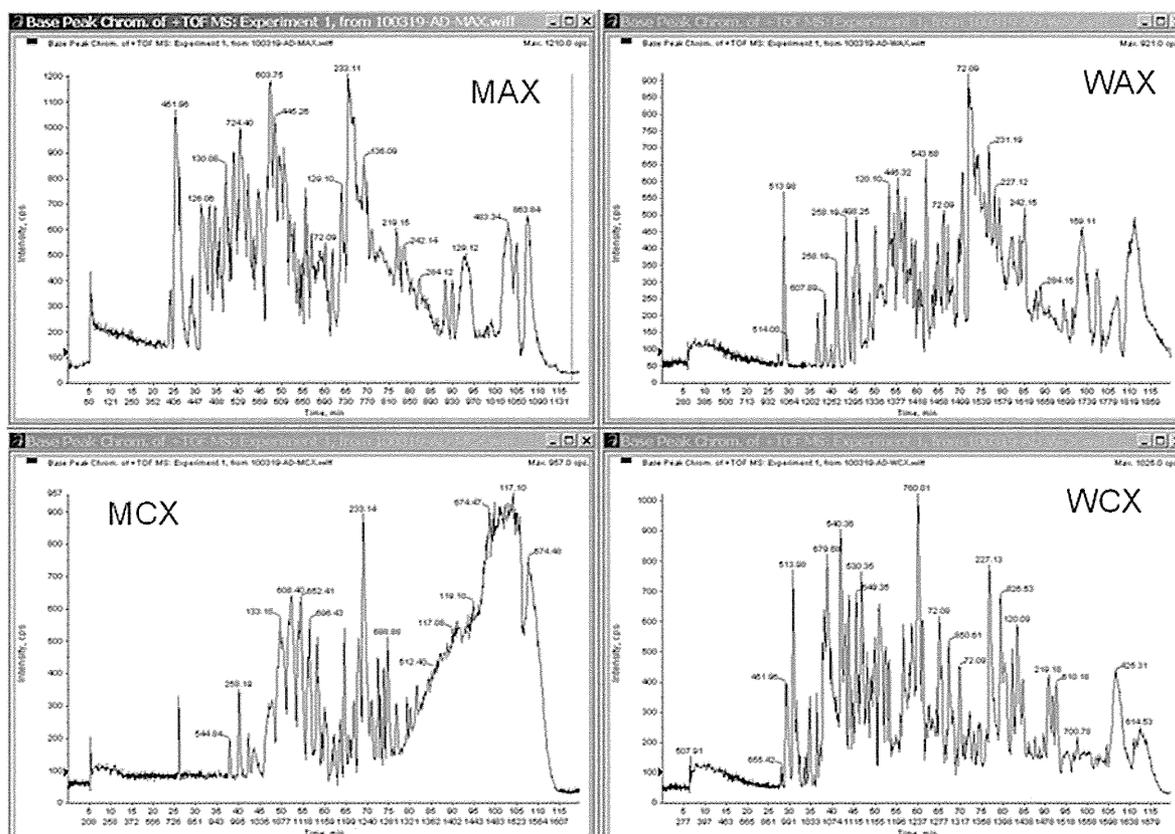


図6 各前処理条件でのTotal Ion Chromatogram (TIC)

図6で示すように、TICによる解析では、MCXを用いた固相前処理法は他の固相前処理法と比較してピーク数、感度が低いと考えられる。リコンストラクトピークの数においては、MAXを用いた固相前処理法が最も多いリコンストラクトピーク数を示した。さらに、同定結果からNeurexinはMCXを用いた固相前処理法で1B、WAXを用いた固相前処理法で3Aに帰属するペプチドが検出された。ProthrombinはMAXを用いた固相で検出された。ADPEP1250が検出された。ITIH4はすべての固相で帰属ペプチドが検出された。

D. 考察

MAXを用いた固相前処理法がもっとも効率よくペプチドを同定できると考えられる。

3. 利根町縦断研究の血清サンプルの解析：同時多項目免疫アッセイ法を用いた解析

1) 同時多項目免疫アッセイ法の再現性評価

A. 研究目的

本研究では、バイオマーカータンパク質をイムノアッセイで、バイオマーカーペプチドをLC-MSで解析する。イムノアッセイは、2つ抗体を用いたサンドイッチELISA法であるが、今回同時多項目免疫アッセイとしてビーズを用いたLuminex法による解析を行う。そこでまず本アッセイ法の分析手法としての評価を行うものである。

B. 研究方法

マイクロタイタープレートを用いたELISA法と異なり、Luminex法では、3種の蛍光色素を配合して、赤レーザーにより最大で500種類のビーズを判別することができる同時多項目免疫アッセイである（図7）。アナライトの定量には、ラベル化2次抗体に緑レーザーを当て強度を測定することで検量線から定量を行う。本解析システムの特徴は、ひとつのウェルで100種類以上のアナライトを同時にアッセイできる点にあり、サンプル量が限られている場合でも多くのアナライトを定量することができる。また分析手順も同時多項目でも単一項目でも、全く一緒のため時間と手間がかからないメリットがある。ただし、計測対象アナライトの濃度が異なる場合は、計測前の希釈倍率がことなるので同時に計測はできない。

今回使用した試薬キットは以下の通り。

ApoE, TTR, C3 (selected from HNDG1-36K)

3つのアナライトについてn=3で繰り返し測定を2回行って再現性の評価を行った。

xMAP テクノロジーのプロセスフロー

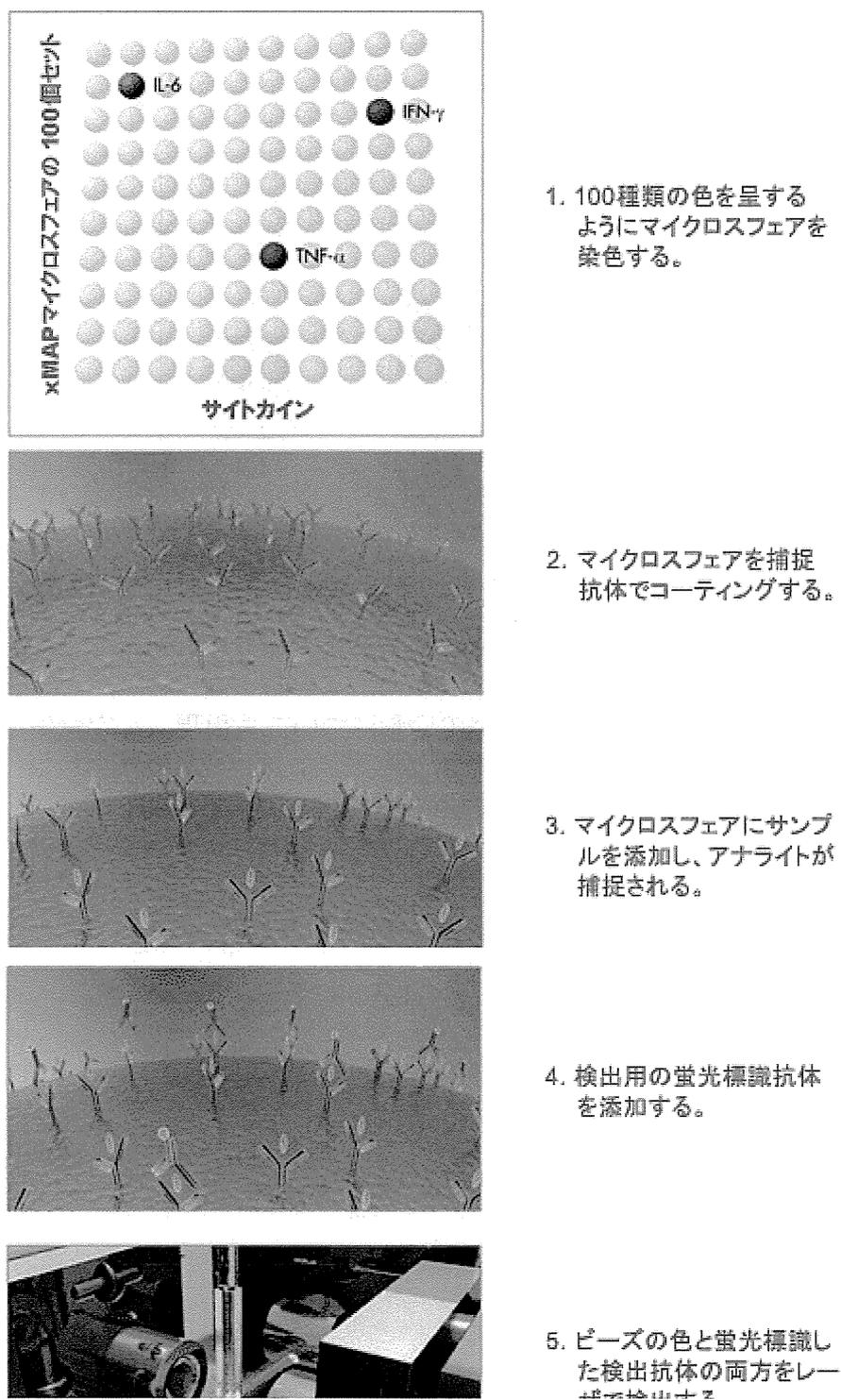


図7 Luminex 法による同時多項目免疫アッセイの仕組み

C. 研究結果

測定した3タンパク質のCV値の平均と標準偏差を図8に示す。

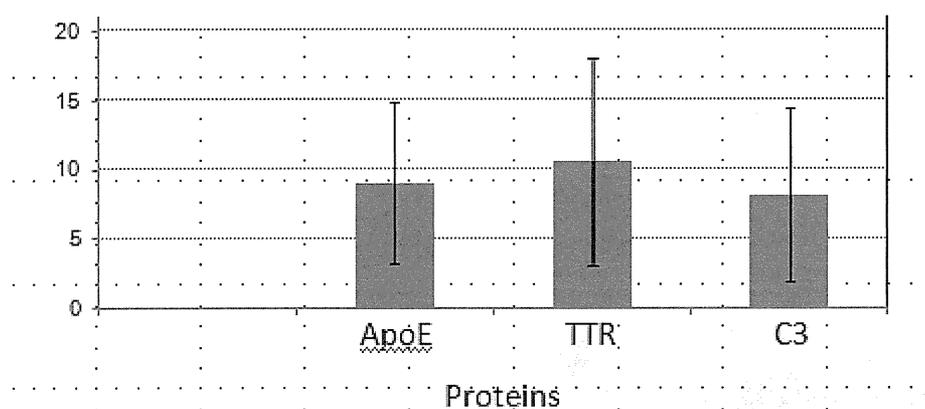


図8 3タンパク質の平均と標準偏差

同一測定日における複数well間の定量値の変動についても再現よく定量値が得られた。

異なる測定日間の同一タンパク質の定量値の変動について3タンパク質の定量値を図9-図11に示す。

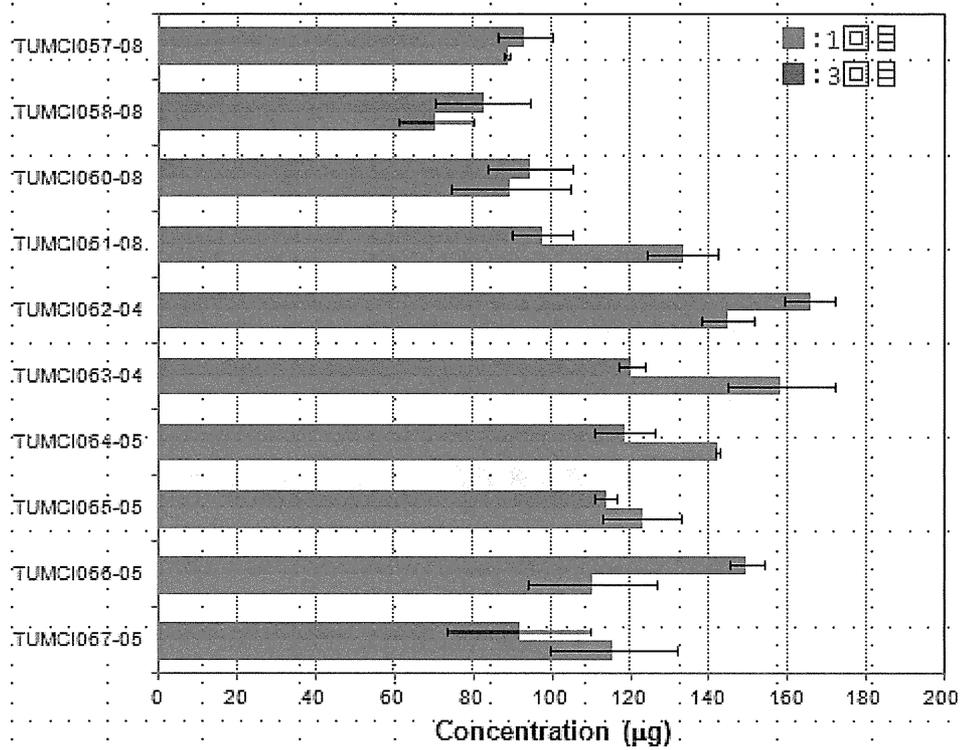


図9 ApoE 定量値の比較

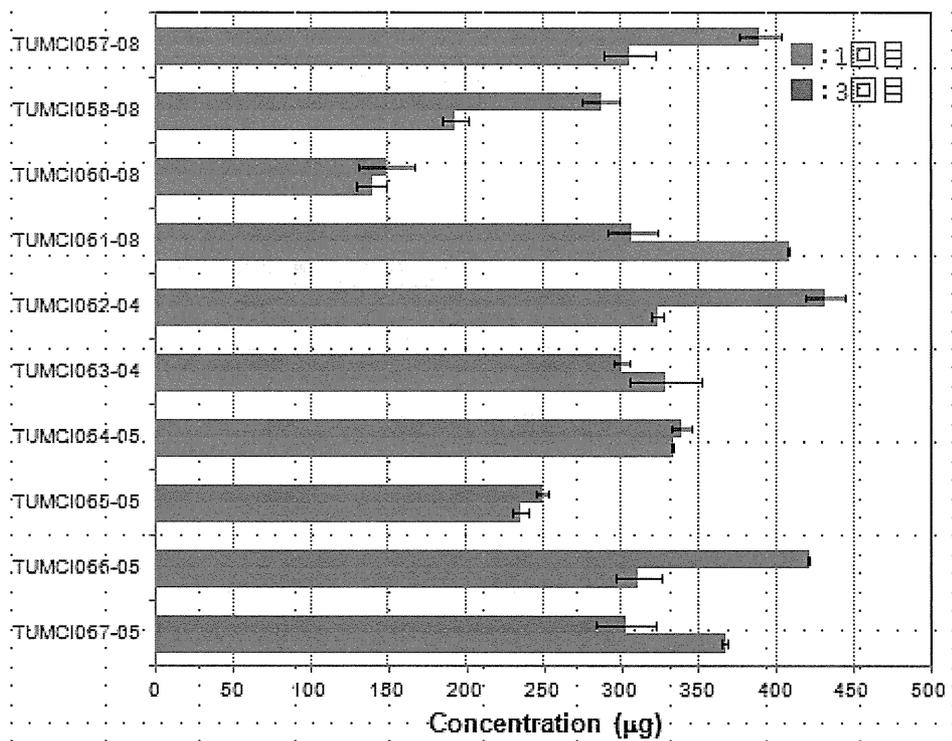


図10 TTR 定量値の比較

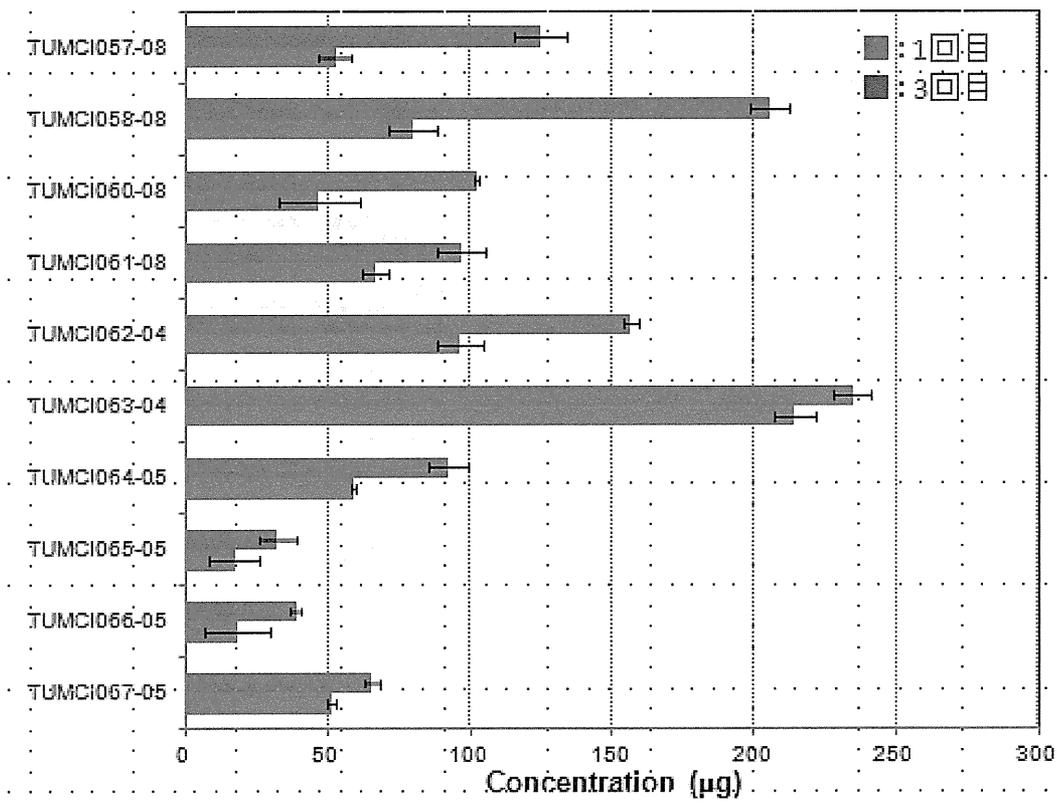


図 1 1 C3 定量値の比較

D. 考察

定量値の変動の要因として、well内での抗原抗体反応性のばらつき、蛍光測定の際の測定値のばらつきが考えられる。ピペット操作による変動については、

- ・同一サンプルを複数wellに滴下する場合も交換。
 - ・使用するマイクロピペットは限定し、実験開始前に純粋の滴下量（重量）を測定し、比重0.999と仮定して滴下量（容積）を求め、簡易検定を行う。
- を実施することで高い再現性が得られると考えられる。

2) 横断研究ならびに利根町縦断研究における同時多項目免疫アッセイによる血清 ApoE, ApoAI, TTR, Complement C, MIP4タンパク質濃度の解析

A. 研究目的

利根町プロジェクトで採血した同一人物の時系列血清（MCI発症前後に採取）を用いて、発症前（健常）と発症後（MCI）における血清中のタンパク質・ペプチドのイムノアッセイによる定性及び定量を行い、発症前後におけるその変化を調べる。これにより、認知機能障害に関与するタンパク質・ペプチドを明らかにする。これらの疾患関連タンパク質のMCI発症における役割を明らかにしたい。

各アナライトのアルツハイマー病における研究背景をいかに記載する。

ApoE

299アミノ酸配列からなる糖タンパク質で、脂質とコレステロール、トリグリセリドなどの運搬を担うリポ蛋白の合成、構造維持に必要なアポリポタンパク質の一つである。肝臓と脳に多く存在する。カイロミクロンレムナント、VLDL, IDLに多分子存在しており、リポ蛋白の代謝とクリアランスに重要な役割を担っている。ApoE遺伝子型は、ApoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ の3種のアイソフォームが知られており、このうちApoE $\epsilon 4$ はアルツハイマー病発症の危険因子と考えられている。これまでに、大脳組織、血清、血漿、脳脊髄液中のApoE濃度や脳組織のApoE mRNA発現量とアルツハイマー病などとの関連が報告されている。アルツハイマー病での増加例と減少例が報告されており、アルツハイマー病とApoEの関係は明確とは言えないが、内側側頭葉におけるA β 沈着との血漿中ApoE濃度について強い相関性が報告されており、グリアの活性化によりApoE量の増加の報告もあることから、ApoEが認知機能障害の診断マーカーとなる可能性が考えられる。本研究では免疫反応を用いた検出法を用いて血清中ApoE濃度を測定し、MCIと血清ApoE濃度の関係を確認する。

ApoAI

アポリポタンパク質A-I (ApoAI)はHDLを構成しているアポリポタンパク質である。このため、ApoA-I量の変動はHDL量の変動を知るための指標になる。ApoA-I, HDLの増加はcardiovascular diseaseのリスクを軽減する。これまでに、マウスモデルを用いてApoA-Iがアルツハイマー病発症に抑制的に働くことが示されている。また血清中ApoA-I濃度はControlに対してアルツハイマー病で有意に低下し、血清中ApoA-I濃度とMMSEスコアとの間には強い相関があるとの報告がある。

TTR

トランスサイレチン(TTR)は主に肝臓で合成され、甲状腺ホルモンやレチノールの運搬に重要な役割を果たしているタンパク質である。また、ヒトの老化アミロイドシスの原因となるタンパク質でもある。APP^{swe}/PS1^{deltaE9} Tgマウスにおいて、脈絡叢でのTTR発現量が増加するとTTRはA β ペプチドに結合し、その線維化を調節しているとの報告がある。また、アルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)において、海馬への抗TTR抗体の長期投与によってA β の沈着量が増加する報告もあり、アルツハイマー病発症に対して抑制効果が期待されるが、TTRを欠損したTg2576マウスでは血管へのA β 沈着量が減少すると報告されており、血管へのA β 沈着についてはTTRによって促進されている。このため、認知機能障害に伴って定量値が変動する可能性も考えられる。

Complement C3

Complement(補体)は血液中の存在するタンパク質群であり、溶菌作用などの機能を持つ。C3はC3転換酵素の作用によりC3aとC3bに分解され、C3bはC4b2a3bとなってC5転換酵素の作用を持つ。これによりC5はC5aとC5bに分解され、C5bはその後の反応を経て膜侵襲複合体を形成し、異種細胞の溶解を引き起こす。

免疫染色によって、大脳でのC3, C4発現量はアルツハイマー病の進行に伴って老人斑の増加に平行して増加した報告例がある。一方、C3欠損APP Tgマウスにおいて、A β 濃度の増加及び老人斑沈着が有意に増加したことも報告されており、認知機能障害とC3濃度の増減との関係は不明である。

B. 研究方法

測定にはLuminex®200xPONETR®3.1システム（日本ミリポア株式会社）を使用した。Luminex 200測定用キット（計測対象タンパク質・ペプチド）を以下に示す。

ApoE, TTR, Complement C3 (selected from HNDG1-36K; 3 plex)

1 : 40,000 dilution (use 5 μ l serum at first dilution step)を以下のように行った。

Step1:血清5 μ lをAssay Buffer 995 μ lの入った1.5 mlポリプロピレンチューブに加える。Step2:上記希釈試料5 μ lをAssay Buffer 995 μ lの入った1.5 mlポリプロピレンチューブに加える。

Complement C4, MIP-4 (selected from HNDG2-36K; 2 plex)

1 : 2,000 dilution (use 5 μ l serum at first dilution step) を以下のように行った。

Step1:血清5 μ lをAssay Buffer 495 μ lの入った1.5 mlポリプロピレンチューブに加える。Step2:上記希釈試料10 μ lをAssay Buffer 190 μ lの入った1.5 mlポリプロピレンチューブに加える。

同時多項目免疫アッセイで解析した利根町縦断研究の血清サンプルについて臨床情報を表5に示す。

表5 同時多項目免疫アッセイで解析した症例

	NDC → NDC (n = 20)	NDC → MCI (n = 15)	MCI → MCI (n = 9)
Age (2005)	75.7 ± 1.9	75.5 ± 2.0	74.0 ± 2.7
Age (2008)	79.4 ± 1.9	79.3 ± 1.9	77.5 ± 1.3
Gender (Male/Female)	7/13	2/13	3/6
Years of education	10.3 ± 0.5	9.9 ± 0.5	11.6 ± 0.4
BMI	22.6 ± 2.4	24.2 ± 4.5	22.4 ± 4.4
GDS	2.1 ± 0.4	3.1 ± 0.8	2.7 ± 0.9
Cigarette smoking (%)	4 (20%)	1 (7%)	3 (33%)
Alcohol (%)	7 (35%)	2 (13%)	3 (33%)
History of disease (%)			
Cardiovascular disease	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
Diabetes mellitus	2 (10%)	0 (0%)	1 (5%)
Hyperlipidemia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Hypertension	3 (15%)	4 (27%)	3 (33%)