

C. 研究結果

表6に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解析結果のまとめを示す。

表6 利根町縦断研究における ApoE, ApoAI, TTR, Complement C, MIP4 タンパク質の血清濃度

	NDC → NDC (n = 20)	NDC → MCI (n = 15)	MCI → MCI (n = 9)	p value
ApoE level (mg/ml)				
2005	108.5 ± 35.6	102.8 ± 32.5	123.5 ± 21.9	0.212
2008	83.3 ± 19.1**	87.5 ± 31.7	64.7 ± 13.8***	0.07
ApoA1 level (mg/ml)				
2005	1687.4 ± 593.0	1869.2 ± 428.5	2016.9 ± 257.7	0.226
2008	1315.3 ± 444.6**	1311 ± 454.1**	1322.2 ± 187 ***	0.996
C3 level (mg/ml)				
2005	100.4 ± 52.2	104.3 ± 40.4	62.1 ± 63.1	0.056
2008	71.6 ± 32.6*	75.7 ± 37.6	56.5 ± 22.7	0.112
C4 level (mg/ml)				
2005	34.7 ± 20.6	38.7 ± 32.4	29.5 ± 35.7	0.945
2008	69.1 ± 24.0***	66.6 ± 22.0*	75.8 ± 42.2	0.753
TTR level (mg/ml)				
2005	299.3 ± 58.7	307.6 ± 95.5	298.8 ± 57.4	0.953
2008	288.7 ± 69.2	278.2 ± 108.1	210.9 ± 30.0*	0.001
MIP4 level (mg/ml)				
2005	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.06	0.11 ± 0.08	0.957
2008	0.11 ± 0.06	0.12 ± 0.06	0.08 ± 0.05	0.609

D. 考察

同時多項目免疫アッセイ (Liminex) 法による、地域介入縦断研究の時系列血清サンプルにの解析では、補体などの炎症関連タンパク質 (C3、C4)、トランスサイレチン、アポリポプロテインA-I、アポリポプロテインE、Macrophage inflammatory protein-4 (MIP-4) の変動を明らかにした。その中には、認知機能の低下だけでなく加齢によって血清中の量に変動するものもあった。

4. LC-MS/MS SRM (MRM)法における血清前処理条件の検討、前処理方法の検討

A. 研究目的

2D-LC-MALDI TOF MS/MSと半定量比較解析を用いた認知症バイオマーカー探索研究(スクリーニング研究)において、健常人と認知症(MCI, AD)を識別するバイオマーカー候補ペプチドを見だし、バイオマーカー候補ペプチドのアミノ酸配列の決定および、バイオマーカー候補ペプチドの帰属タンパク質を同定した。この認知症バイオマーカー候補の臨床有効性の検証・評価を行うためには、スクリーニングで用いた方法とは異なる計測手法で行うことが重要である。また本研究では、横断研究と縦断研究においてバイオマーカーペプチドの解析(計測)に高速LC-MS/MS SRM (MRM)法を用いる。これによってハイスループットに多少となる複数のバイオマーカーペプチドの同時計測が可能になる。そこで本年度は、その準備として、21種類のバイオマーカーについて高速LC-MS/MS SRM (MRM)法の条件検討を行った。

B. 研究方法

LC-MS/MS SRM (MRM)法は、イオントラップ型三連四重極を用いたMRM法による定量分析であり、超高速液体クロマトグラフィーUFLCと組み合わせたMRMアッセイは生体サンプル中の複数のマーカーを高い分離性と選択性で定量分析が可能である。また、MRMアッセイは2D-LC-MALDI TOF MS/MSと比べて定量のスループットが格段に高く、大規模サンプルの定量分析に高い能力を持つ。

LC-MS/MS SRM (MRM)法について以下の研究開発項目について研究を実施する。

MRMアッセイの開発①～③を行い、④の臨床有効性研究によって、認知症バイオマーカーのMCI、早期ADの診断における臨床有効性を明らかにする。

① MRMトランジション作成。

②認知症バイオマーカー候補ペプチドの（高感度）検出のための、血清サンプルの前処理方法の検討。

③検出限界と定量下限と再現性の検討。

④ 認知症バイオマーカー候補の臨床有効性の評価。図12にLC-MS/MS SRM (MRM)法の原理を示す。ペプチド（タンパク質）の定量は、プリーサイオンではなく、フラグメントイオンで行う。

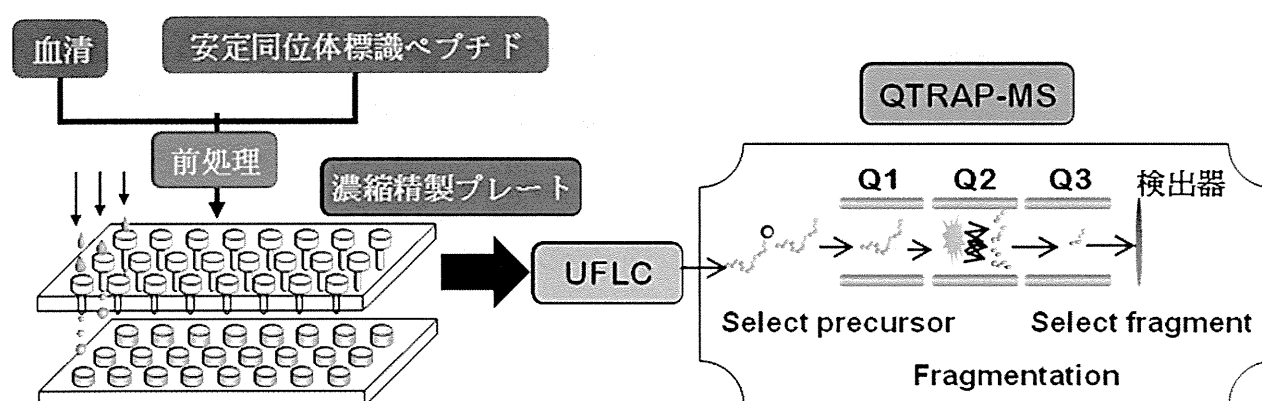


図12 LC-MS/MS SRM (MRM)法の原理

C. 研究結果

本研究では、バイオマーカーペプチドの解析（計測）にはLC-MS/MS SRM (MRM)

法を用いることから、そのための血清前処理条件の検討、前処理方法について研究開発を行った。特にLCで分析するまでの簡便な前処理方法の確立は、次年度以降実施する臨床研究では必要であり、そのための条件検討を行い、最適化が終了した。

① MRMトランジション作成

図13にMRMトランジションのパラメータを示す。これらの最適化の設定を21種類のバイオマーカーペプチドについて行なった。

Q1	<i>m/z</i> of precursor ion	Precursor ion (ペプチド)の <i>m/z</i>
Q3	<i>m/z</i> of fragment ion	Fragment ion (ペプチドをMS/MSしたときに検出される特徴的なフラグメント)の <i>m/z</i>
CE	Collision Energy	ペプチドを開裂するときのエネルギー(V)
DP	Declustering Potential	ESIプローブからオリフィスプレートへの引き込み電圧(V)
EP	Entrance Potential	オリフィスからQ0ロッドへの引き込み電圧(V)
CEP	Collision Cell Entrance Potential	Q1ロッドからコリジョンセル(Q2)への引き込み電圧(V)。この電圧状態で安定なイオン(Precursor ion)がコリジョンセルに導入される。
CXP	Collision Cell Exit Potential	コリジョンセル(Q2)の出口にかかる電圧(V)。この電圧状態で安定なイオン(Fragment ion)が検出器へと通過する。

図13 MRMトランジションのパラメータ

②認知症バイオマーカー候補ペプチドの(高感度)検出のための、血清サンプルの前処理方法の検討。

MRMアッセイ開発において、血清サンプルの前処理はOasis MAX μ Elution plateを使用していた。MAXで前処理した後、MRM分析を行ったところ、検出されなかった認知症マーカーが6種類あった。そこでOasis HLB plateを用いたところすべてのペプチドの検出ができた。これは疎水性残基が担体に結合した固相プレートであり、単純にペプチドやその他の生体マトリックスの疎水性度の違

いで分画する。

③検出限界と定量下限と再現性の検討

各バイオマーカーペプチドを標準血清にスパイクし、MRMアッセイを行った。本年度は、一部のバイオマーカーペプチドについて終了した。

④ 認知症バイオマーカー候補の臨床有効性の評価ー利根町縦断研究サンプルを用いて

知的健常 (NDC: Before onset) からMCI (After onset) 、アルツハイマー病 へと至った縦断研究症例におけるマーカーの推移を示す。補体タンパク質由来のペプチド (図1 4左) ならびにタンパク質レベルの変化 (図1 4右) 。横軸はサンプルの種類 (MCI発症前後) 、縦軸は血清中の濃度を示す。発症前が2005年、発症後が2008年である。

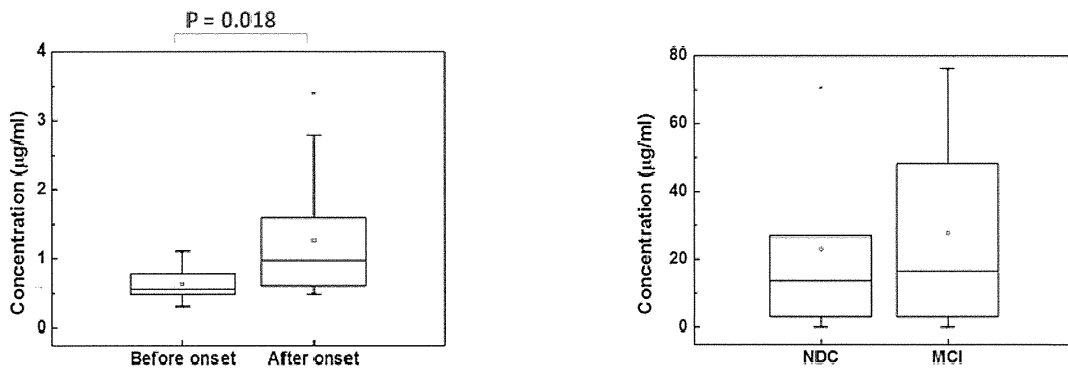


図1 4 利根町縦断研究サンプルを用いた補体タンパク質と由来ペプチドの定量

D. 考察

前処理については、2つの方法でバイオマーカーペプチドが定量出来ることがわかった。MAX μ Elution plateで検出出来なかった理由として、陰イオン交換基が担体に結合した固相プレートであり、認知症マーカーのペプチドとしての性質(酸性ペプチド、塩基性ペプチド、疎水性ペプチド)によってMAX μ Elution plateに吸着しなかったり、吸着後の洗浄で失われたと考えられた。

利根町縦断研究サンプルを用いた補体タンパク質と由来ペプチドの定量においては、バイオマーカーペプチドで有意差がでており、タンパク質よりもその分解産物を解析することが必要である。次年度以降、バイオマーカーペプチドを用いたMRM法による臨床サンプルの解析を進める。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takase H, Matsumoto K, Yamadera R, Kubota Y, Otsu A, Suzuki R, Ishitobi H, Mochizuki H, Kojima T, Takano S, Uchida K, Takahashi S, Ema M.	Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo.	Blood			in press
Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi T, Suzuki H, Tran MT, Kudo T, Uchida K, Ninomiya H, Chiba S, Takahashi S.	c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver.	Blood	118	1374-85	2011
Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, Kaneko T, Maruyama K, Saido TC, Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N, Inoue H.	Anti-A β Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease.	PLoS One	6	e25788	2011

Hidaka S, Ikejima C, Kodama C, Nose M, Yamashita F, Sasaki M, Kinoshita T, Tanimukai S, Mizukami K, Takahashi H, Kakuma T, Tanaka S, Asada T.	Prevalence of depression and depressive symptoms among older Japanese people: comorbidity of mild cognitive impairment and depression.	Int J Geriatr Psychiatry.	27	271-279	2011
Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Hidaka S, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Mizukami K, Michikawa M, Asada T.	Association between Cognitive Function and Plasma Lipids of the Elderly After Controlling for Apolipoprotein E Genotype.	Am J Geriatr Psychiatry.	40	2709-14	2011
Ota M, Nemoto K, Sato N, Mizukami K, Yamashita F, Asada T.	Relationship between white matter T2 hyperintensity and cortical volume changes on magnetic resonance imaging in healthy elders.	Int J Geriatr Psychiatry.	26	886	2011
Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Hidaka S, Mizukami K, Asada T.	Effect of plasma lipids, hypertension and APOE genotype on cognitive decline.	Neurobiol Aging.		26	2012
Hidaka S, Ikejima C, Kodama C, Nose M, Yamashita F, Sasaki M, Kinoshita T, Tanimukai S, Mizukami K, Takahashi H, Kakuma T, Tanaka S, Asada T.	Prevalence of depression and depressive symptoms among older Japanese people: comorbidity of mild cognitive impairment and depression.	Int J Geriatr Psychiatry.	27	271-9	2012

Mizukami K, Ishikawa M, Akatsu H, Abrahamson EE, Ikonovic MD, Asada T.	An immunohistochemical study of the serotonin 1A receptor in the hippocampus of subjects with Alzheimer's disease.	Neuropat hology.	31	503	2011
--	--	---------------------	----	-----	------

