

- K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, 12: 487-496, 2013
- 7) Nose M, Kodama C, Ikejima C, Mizukami K, Matsuzaki A, Tanaka S, Yoshimura A, Yasuno F, Asada T. ApoE4 is not associated with depression when mild cognitive impairment is considered. *Int. J Geriatr. Psychiatry*, 28: 155-163, 2013.
- 8) Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Mizukami K, Asada T. Combination of antioxidant supplements improved cognitive function in the elderly. *J. Alzheimers Dis.*, 32: 895-903, 2012.
- 9) Ikejima C, Hisanaga A, Meguro K, Yamada T, Ouma S, Kawamuro Y, Hyouki K, Nakashima K, Wada K, Yamada S, Watanabe I, Kakuma T, Aoyama Y, Mizukami K, Asada T. Multicentre population-based dementia prevalence survey in Japan: a preliminary report. *Psychogeriatrics*. 12: 120-123, 2012.

(水上勝義)

- 10) 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*, 33, 2633-40, 2012.
- 11) 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.

2. 学会発表

- 1) Uchida K, Suzuki H, Meno K, Korenaga T, Sugimoto K, Shiraki K. Discovery of cell-derived circulating peptide biomarker in blood and LC-MS/MS assay development for liver disease. AACCC2012, Los Angeles, USA, 2012.7.15.
- 2) 内田和彦, 目野浩二, 鈴木秀昭, 赤津弘康, 水上勝義, 朝田隆. 認知症ペプチドミクス. 第31回日本認知症学会学術集会 (シンポジウム), 2012.10.7.
- 3) 内田和彦. Peptidomeによるバイオマーカー探索. 生命医薬情報学連合大会2012 (招待講演), 東京, 2012.10.14.

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. MCIならびにアルツハイマー病のバイオマーカー（遺伝子・タンパク質）候補の多施設解析（朝田・水上・内田）

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。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」（利根コホート）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。2012年の参加者におけるデータについては、診断を含めて現在データをまとめており、次年度の解析に用いる予定である。

本研究項目では、筑波大学などで供与をうけたサンプルと、利根コホートのサンプルを横断面での解析に用いた。これらを低分子量タンパク質（ペプチド）を2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MS (Ultraflex, Bruker Daltonics) による非標識比較定量解析ならびに2D-nanoLC-ESI TOF MS/MS (Q-STAR, ABSciex)を用いたiTRAQラベル法による比較定量解析に供した。

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。2次検査では、MMSEを実施している。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。またフォローアップが継続するにつれて年齢も高齢化しており、解析においては年齢による除外を行う。

C. 研究結果

本研究において昨年度までに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に示すが、今年度の解析に供した症例数は変わらない。

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に進行したものがについては2012年度の参加者の結果をまとめて分析に供するため、今年度の解析では用いなかった。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。NDCについては、3年ごとの検査において継続してNDCと診断されたものを用いた。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。これらは昨年度から継続して解析を行ってきた。

D. 考察

本研究の最終年度には、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を実施したい。これまでに蓄積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のためには、収集した情報の評価（Validation）と、データベースへの登録を行う。2009年の血液サンプルが、東日本大震災によって消失したことはきわめて残念であるが、2012年度にあらたに検査と血液収集を行ったことで、時系列による個々の参加者の分析が一定の精度で行うことができるようになったと考えられる。

2. 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）の動態ならびに前処理条件、LC-MS条件の検討（内田）

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。脳組織・髄液・血清におけるそれぞれのバイオマーカー候補の動態は、それらの親タンパク質の生理的役割やバイオマーカーペプチドの意義を知る上で重要な情報をなりうると考えられるため、これらのサンプルの収集を行ってきたが、脳組織、髄液、血液のセットでの症例は得られなかった。髄液、血液のペアについては、昨年度に引き続き解析を行っている。脳組織と髄液・血清については、別の患者由来のものである。

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に脳組織由来ペプチドの親タンパク質のアミノ酸配列上のマップを示す。

脳組織におけるこれらバイオマーカー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特定の涼気において複数の症例で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

昨年度から引き続いて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い、さらに親タンパク質へのそれぞれのペプチドのマッピングを行った。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。シナプスの傷害の結果、タンパク質の分解が促進されたものと考えられる。

昨年度の結果と同様、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）ペプチド領域については、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を行う必要があると考える。当初の計画では、動物モデル（マウス）を用いて解析を行う予定であったが、朝田らが共同研究でiPS細胞を用いてアルツハイマー病患者由来の神経細胞の樹立に成功しており（Kondo T, Asada T, et al., Cell Stem Cell, 2: 487, 2013）、アルツハイマー病患者由来の神経細胞におけるタンパク質代謝については、本細胞のプロテオミクス・ペプチドミクス解析を行う予定である。

②前処理条件、LC-MS条件の検討

A. 研究目的

今年度は、nanoLC MALDI TOF MSによる各バイオマーカーの臨床有効性の検討のための分析条件の検討を行った。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。

B. 研究方法

血清25 μ lを前処理をおこなった後に、nanoLC MALDI TOF MS/MS (Ultraflex, Bruker Daltonics)で血清由来ペプチドを分析した。

バイオマーカー検出のための適切な分析量を決定するために、4段階の量（血清量換算で、1 μ l、5 μ l、10 μ l、20 μ l）について検討を行った。バイオマーカーペプチドを含む血清ペプチド40種を選択し、各分析量における検出の有無より、適切な分

析量を検討した。

また、バイオマーカーの定量のために作成した安定同位体標識ペプチドを用いた分析の再現性、定量性の検討および、血清サンプルの繰り返し分析によるバイオマーカーの検出再現性を検討した。

C. 研究結果

図AAAに血清由来ペプチドのnanoLC MALDI TOF MS/MSにおけるクロマトグラムを示す。縦軸はUV 210nmにおけるピーク強度 (V)、横軸は時間 (min) である。ピーク強度 (V) について、血清1 μ l、血清5 μ l、血清10 μ lについてはnanoLCに供与する分析量の増加に伴ない上昇しているが、血清20 μ lを分析に用いた場合、40 min付近までのピーク強度 (V) について血清10 μ lを分析に用いた場合とほぼ同等である結果が得られた。このことは、分析量を血清20 μ lとした場合に分析カラム許容量を超えており、分析量が過剰であることが推察される結果が得られた。

バイオマーカーペプチドを含む血清ペプチドを40種選択し、各分析量における検出の有無を検証した結果より、血清1 μ lの分析量では19種のペプチドのみが検出され、その多くが検出できなかった。このことから分析量を1 μ lとした場合において、nanoLCに供与する分析量が不足していることが推察される結果が得られた。

血清5 μ l、血清10 μ l、血清20 μ lを用いた分析ではほとんどのペプチドが検出され、分析量に応じた変化は見られなかった。検出感度については、血清5 μ l、血清10 μ lにおいて分析量に合わせた上昇が認められるものの、血清20 μ lにおいては血清10 μ lを分析した場合と同等の感度であることから、分析量を血清20 μ lとした場合に分析カラム許容量を超えていることが推察された。

バイオマーカーのうちADPEP1315、ADPEP1250は分析量を血清1 μ lとした場合で

も十分検出可能であったが、ADPEP1039については分析量を血清5 μl 以上とした場合に検出されたため、検出しようとするバイオマーカーペプチドもしくは血清ペプチドの検出感度において、その適正量を変化させる必要があることが推察された。

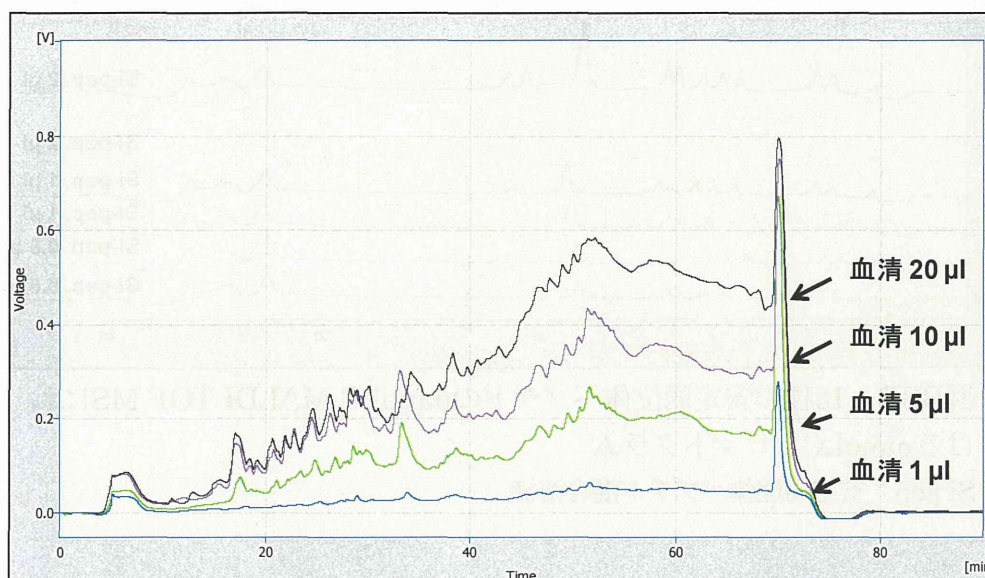
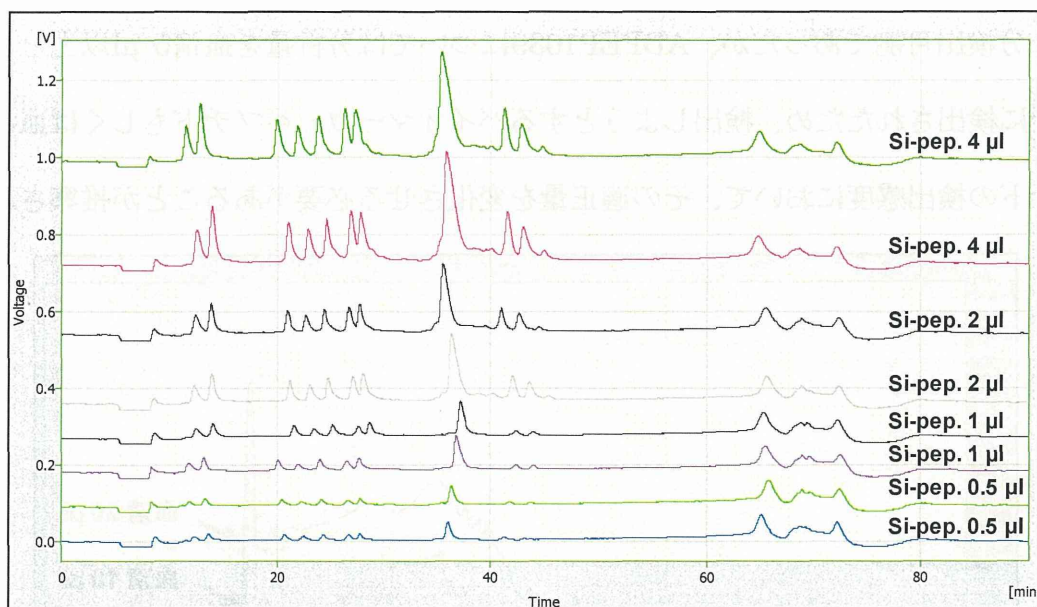


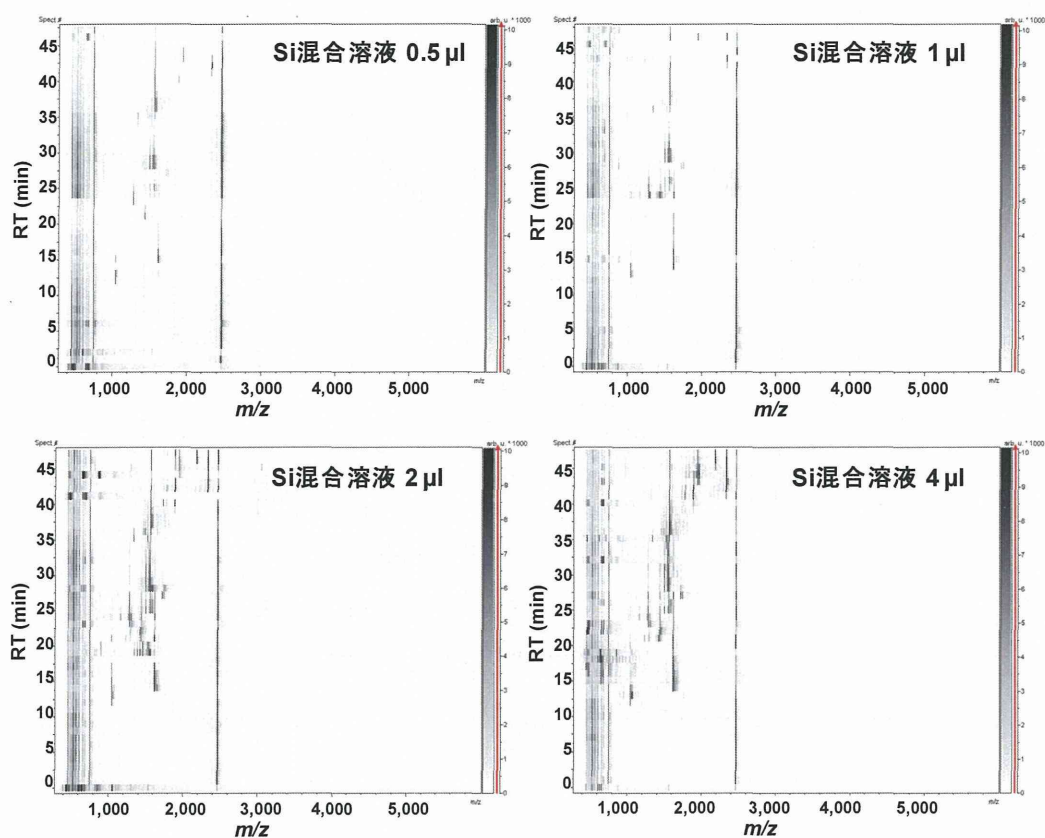
図 AAA 血清由来ペプチドの nanoLC MALDI TOF MS/MS におけるクロマトグラム

図 BBB はバイオマーカーを含む13種の安定同位体ペプチド混合溶液の nanoLC MALDI TOF MS/MS クロマトグラムである。縦軸は UV210 nm におけるピーク強度 (V)、横軸は時間 (min) である。ペプチドの溶出時間 (min) については、実験間でよく保存されていた。ピーク強度 (V) については、ペプチド溶液の分析量を 0.5 μl 、1 μl 、2 μl 、4 μl と変化させ 2 回繰り返し分析した。ペプチド量の増加に伴ないピーク強度が上昇しており、分析量の変化を反映していた。



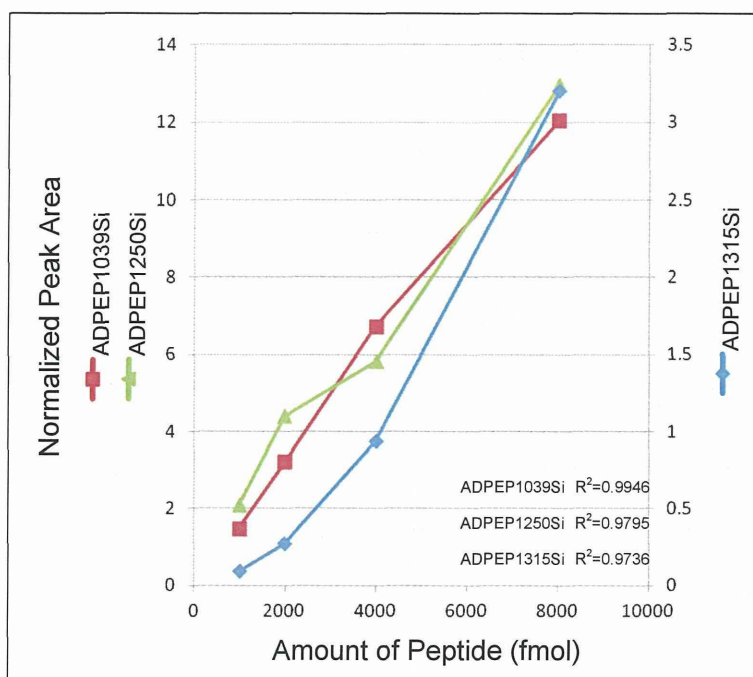
図BBB 13種の安定同位体ペプチドのnanoLC MALDI TOF MSにおけるnanoLCクロマトグラム
 Si-pep.: 安定同位体ペプチド混合溶液

図CCC はバイオマーカーを含む13種の安定同位体ペプチド混合溶液のnanoLC MALDI TOF MS/MSにおけるMSゲルビューである。縦軸は溶出時間 (min)、横軸は質量電荷比 (m/z) としてMSピークをプロットし、ピーク強度を濃淡で示した。ペプチドの溶出時間 (min) については、実験間でよく保存されており分析の再現性が得られていた。ピーク強度 (V) については、ペプチド溶液の分析量を0.5 μ l、1 μ l、2 μ l、4 μ lと変化させた場合、分析したペプチド量の増加に伴ないピーク強度が上昇しており、分析量の変化を反映していた。



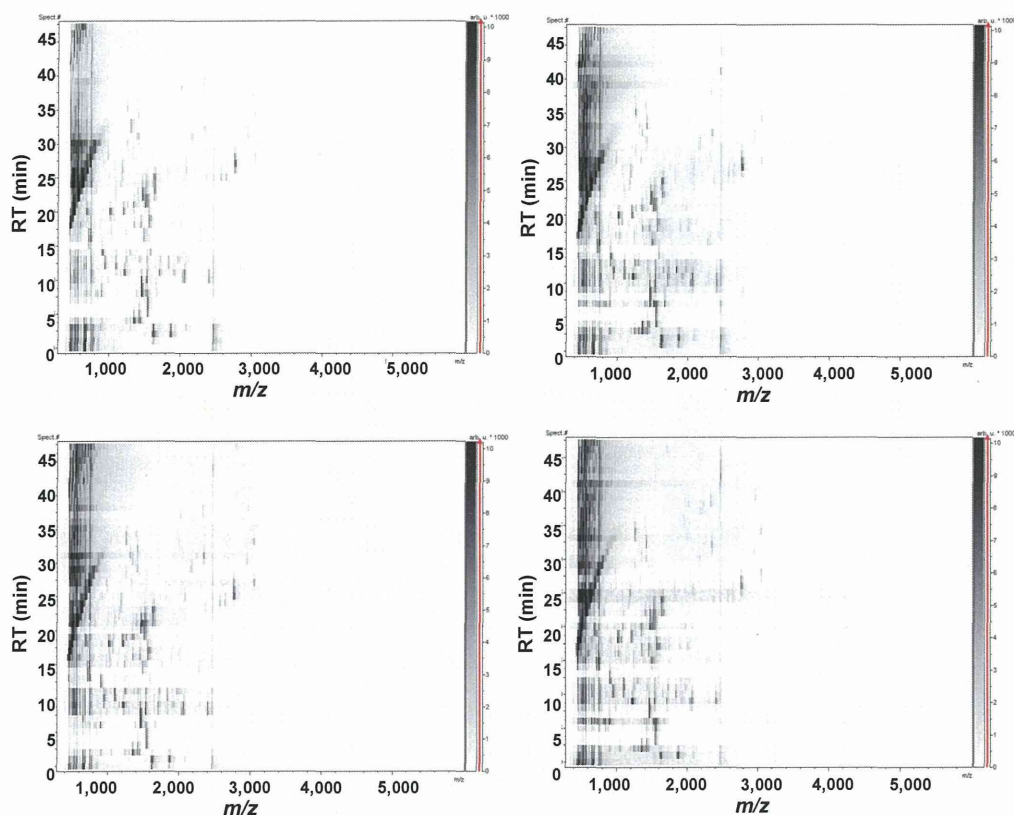
図CCC 13種の安定同位体ペプチドのMSゲルビュー
 横軸： m/z ，縦軸：溶出時間 (RT, min)，濃淡：ペプチドピーク強度

図DDD はバイオマーカー安定同位体ペプチドのnanoLC MALDI TOF MSにおける定量性を示す。縦軸は外部標準として加えたBradykininのMSピークのエリア値を用いて正規化したNormalized Peak Areaであり、横軸は分析に用いた量 (fmol) である。ADPEP1250SiとADPEP1039Siは、ほぼ同等のエリア値を示したが、ADPEP1315Siはこれらに比べ1/4以下のエリア値であった。ペプチドによって検出感度は異なっているものの、濃度変化に対する直線性については3ペプチドにおいて同様に認められた。



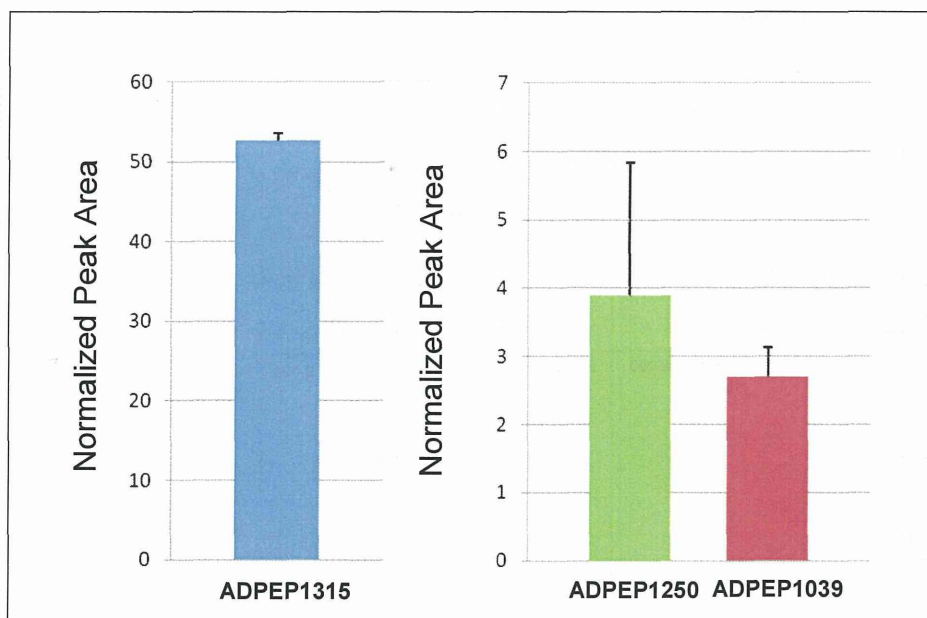
図DDD バイオマーカー安定同位体ペプチドの定量性

図EEE は同一の血清10 μ lを用いて前処理した血清由来ペプチドを繰り返し nanoLC MALDI TOF MSで分析したMSゲルビューである。縦軸は溶出時間 (min) であり、横軸は質量電荷比 (m/z) としてMSピークをプロットし、ピーク強度を濃淡で示した。ペプチドの溶出時間 (min) とピーク強度について、実験間でよく保存されており、分析の再現性が得られていた。



図CCC 同一血清由来ペプチドのMSゲルビュー
 横軸： m/z , 縦軸: 溶出時間 (RT, min), 濃淡: ペプチドピーク強度

図FFF は図EEEで示した同一血清由来ペプチドの4回繰り返し分析における血清中に含まれるバイオマーカーについての定量の再現性を示した。バーグラフは Normalized Peak Area値の平均値及びSDを示した。血中に含まれるバイオマーカーペプチドの存在比は、ADPEP1315がADPEP1250、ADPEP1039と比較して10倍程度であり、血中存在比が高い場合には定量再現性が高いことが示唆された。



図FFF 血清由来バイオマーカーペプチドの定量性
 図EEEで示した同一血清の4回繰り返し測定で得られたバイオマーカーペプチドの定量値の平均値とSDをプロットしている。

D. 考察

nanoLC MALDI TOF MS/MSにおいてバイオマーカーを検出するための適正な血清の分析量は5 μ lもしくは10 μ lと考えられる。ただし、検出しようとするバイオマーカーペプチドの検出感度により、分析量を変化させる必要がある。本分析条件において、安定同位体標識ペプチドを用いた分析によって、nanoLCにおける溶出時間の再現性と分析量の変化における検出量の直線性が認められた。また血清サンプルの繰り返し分析によるバイオマーカーの定量再現性が認められた。以上により各バイオマーカーの臨床有効性検討のための分析条件における基礎データが得られた。

3. 知的健常からMCI、アルツハイマー病へと至った者における疾患関連タンパク質・ペプチドの推移と介入効果との関連（朝田・内田）

A. 研究目的

今年度は、知的健常からMCI、アルツハイマー病へと至った者における疾患関連タンパク質をイムノアッセイで解析した。イムノアッセイは、2つ抗体を用いたサンドイッチ法であるが、サンプル量が限られているため同時多項目免疫アッセイができるビーズを用いたLuminex法による解析を行った。

Luminex法では、3種の蛍光色素を個別の濃度で配合したビーズを用い、赤色レーザー照射により最大で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、アナライトの定量にはラベル化2次抗体に緑色レーザーを当て蛍光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、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ため本研究に適している。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ため、今回も2回にわけて分析を行った。

それぞれのサンプルについては、n=2で行った。

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。
(selected from HNDG1-36K; 3 plex)

1 : 40,000 dilution (use 5 µl 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。

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%)