

### C. 研究結果

利根町縦断研究の血清サンプルを同時多項目免疫アッセイで解析した。4種類のタンパク質について以下結果を示す。タンパク質Aの血清中の量の変化について、2005年から2008年にかけていずれも正常と診断された群、2005年で正常で2008年でMCIと診断された群、2005年でMCIと診断され2008年もMCIと診断された群、いずれも時間軸にそって、有意に減少した。特に、このタンパク質Aについては、興味深いことに2005年でMCIと診断され2008年もMCIと診断された群で、顕著に低下しており、病態の進行とともに変化することが明らかになった。

次にタンパク質Bの血清中の量の変化を調べた。2005年から2008年にかけていずれも正常と診断された群、2005年で正常で2008年でMCIと診断された群、2005年でMCIと診断され2008年もMCIと診断された群について調べた。

図10はタンパク質Cの血清中の量の変化を示している。図10上段左は2005年から2008年にかけていずれも正常と診断された群のタンパク質Cの量の変化を、図10上段右は2005年で正常で2008年でMCIと診断された群のタンパク質Cの量の変化を、図10下段は2005年でMCIと診断され2008年もMCIと診断された群のタンパク質Cの変化を示す。図10上段左右いずれにおいても、2005年から2008年へと経年した時のタンパク質Cの量は減少しており(平均100  $\mu\text{g/ml}$ から60~70  $\mu\text{g/ml}$ へと減少)、図10下段のMCIが進行するとさらにタンパク質Cの量は減少していた(50  $\mu\text{g/ml}$ 前後)。

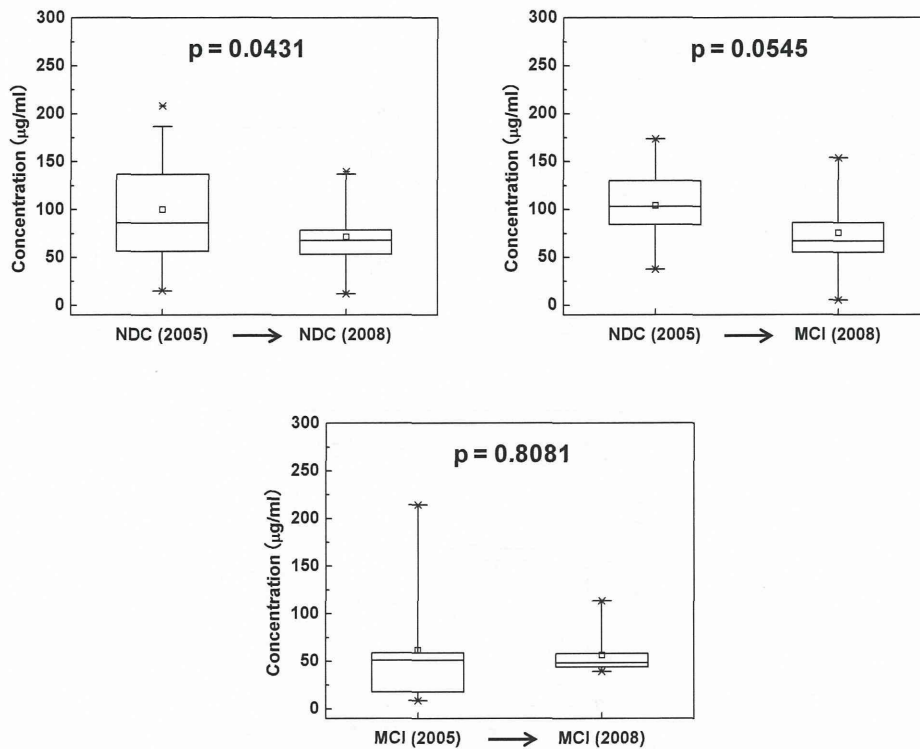


図 1 0 タンパク質Cの変化

図 1 1 はタンパク質Dの血清中の量の変化を示している。図 1 1 上段左は2005年から2008年にかけていずれも正常と診断された群のタンパク質Dの量の変化を、図 1 1 上段右は2005年で正常で2008年でMCIと診断された群のタンパク質Dの量の変化を、図 1 1 下段は2005年でMCIと診断され2008年もMCIと診断された群のタンパク質Dの変化を示す。図 1 1 上段右において、MCIでタンパク質Dの量が減少傾向を示し、図 1 1 下段において、MCIが進行すると有意にその量が減少していた。

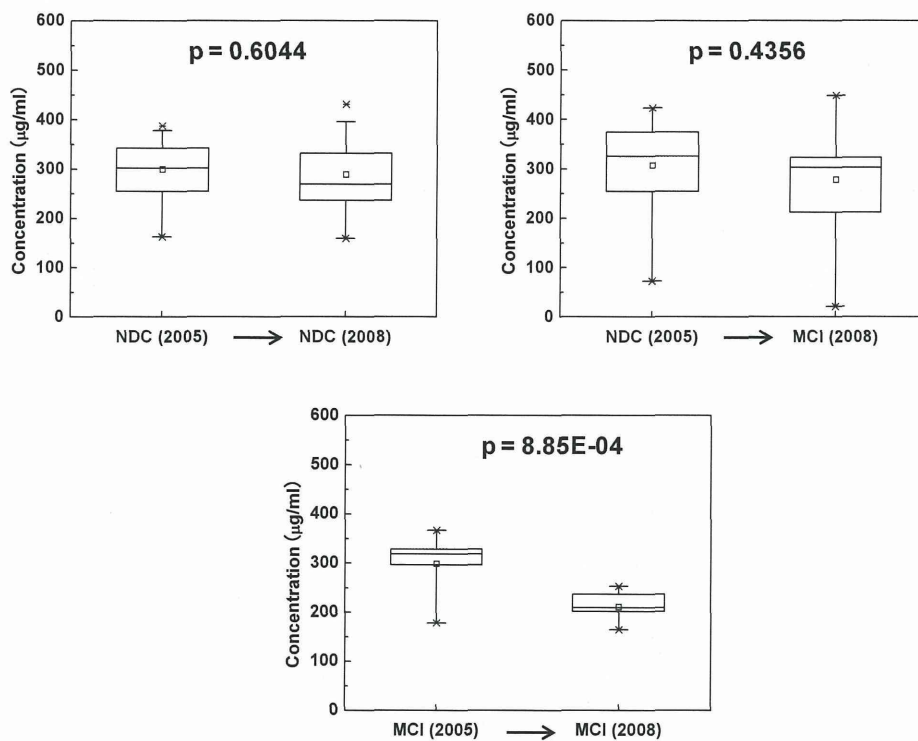


図1 1 タンパク質Dの変化

Candidates	Results
Protein A	Decrease trend in MCI and AD
Protein B	Decrease trend in MCI and AD
Protein C	Increase trend in MCI and AD
Protein D	No changes
Protein E	No changes
Protein F	No changes

#### D. 考察

本研究によってペプチドバイオマーカーの親タンパク質であるそれぞれについてイムノアッセイを行い、その一部について、時系列の変動が明らかになった。それぞれのタンパク質の機能については、文献調査によってA $\beta$ ペプチドの排出や毒性軽減なしは、A $\beta$ ペプチドによる神経障害の過程で関わるタンパク質であることがわかっており、今後の研究によって、疾患発症との因果関係についても検討していきたい。

### 4. LC-MS/MS SRM (MRM)法における定量性の検討

#### A. 研究目的

これまで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の同時多項目のバイオマーカーペプチドの同時計測が可能になる。

#### 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、プリーサーイオンではなく、フラグメントイオンで行う。

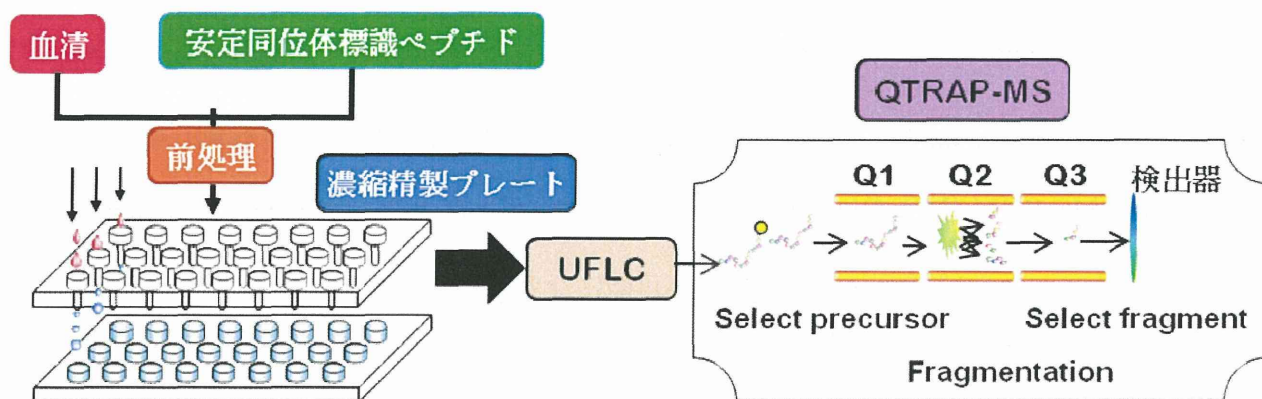


図12 LC-MS/MS SRM (MRM)法の原理

### 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13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

MRMトランジションはバイオマーカーペプチドをinfusion法でMS/MSを行い、Precursor ion (Q1)の*m/z*よりも大きくかつ強度が高いfragment ionをMRM測定用のion (Q3)として選択する。図14に13種のバイオマーカーペプチドのMRMトランジションを示す。マーカー名に「Si」を付しているものはマーカーペプチドの安

定同位体ペプチドを示している。

	Marker Name	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	AD1008	646.03	763.93	41	8	26	25	32
	AD1008Si	648.04	766.93	56	6.5	24	25	32
2	AD1025	538.93	968.45	46	5	28	23	38
	AD1025Si	540.93	968.45	41	9	50	23	58
3	AD1042	520.87	449.80	26	7	24	23	6
	AD1042Si	523.88	452.50	26	7.5	26	23	6
4	AD1046	856.92	720.27	51	9.5	40	37	30
	AD1046Si	859.93	726.28	51	10.5	36	39	32
5	AD1048	1163.52	1036.47	71	8.5	42	45	44
	AD1048Si	1166.52	1042.48	76	10.5	44	45	44
6	AD1049	512.28	629.37	31	8	18	23	8
	AD1049Si	514.62	636.39	41	6	18	21	28
7	ADPEP109315	776.88	796.38	51	8	36	33	36
	ADPEP109315Si	780.39	803.40	56	8.5	32	33	36
8	ADPEP421488	725.38	1046.53	36	8.5	30	29	42
	ADPEP421488Si	727.38	1052.54	36	7	26	27	44
9	ADPEP1315	744.37	1187.57	41	7	30	27	52
	ADPEP1315Si	747.37	1192.59	36	8	32	27	48
10	ADPEP12neu	942.02	1435.83	51	9	46	35	56
	ADPEP12neu-Si	945.02	1435.83	51	10	40	33	58
11	ADPEP1396	781.37	909.46	51	9.5	30	33	38
	ADPEP1396Si	784.38	915.47	51	9.5	32	33	40
12	ADPEP1039	638.80	1072.49	31	9	28	27	50
	ADPEP1039Si	642.30	1079.51	36	9	38	23	48
13	ADPEP1250	716.80	452.24	76	10	28	37	6
	ADPEP1250Si	720.30	452.24	86	6.5	28	37	6

図14 バイオマーカーペプチドのMRMトランジション

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  $\mu$ 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  $\mu$ Elution plate を前処理に用いた。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。

標準血清 25  $\mu$ l にペプチド合成した認知症マーカーをスパイクし、Oasis HLB  $\mu$ Elution plate を用いて前処理を行い、MRM アッセイを行ったところ、すべてのペプチドの検出ができた (図 15)。AD1025、ADPEP109315、ADPEP1315 は他のマーカーと比べてエリア値が小さい。これは、ペプチドのアミノ酸残基の組成の違いにより、Oasis HLB  $\mu$ Elution plate への相互作用が弱い/強いいため、ペプチドが素通り/吸着したと考えられる。これらのペプチドについては、Oasis HLB  $\mu$ Elution plate の前処理に用いる洗浄溶媒、溶出溶媒について個別に検討する必要がある。

	Analyte	Average Area (counts)
1	AD1008	7210
2	AD1025	10.55
3	AD1042	418
4	AD1046	1120
5	AD1048	790.5
6	AD1049	368.5
7	ADPEP109315	40.65
8	ADPEP421488	1063
9	ADPEP1315	16.86
10	ADPEP12neu	1054
11	ADPEP1396	1765



12	ADPEP1039	737.5
13	ADPEP1250	665

図 1 5 Oasis HLB  $\mu$ Elution で前処理

### 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、外部標準法で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。

外部標準法で定量する際のサンプルの調製法の概略は図 1 6 (左図) のとおりである。6種類のバイオマーカーペプチドを終濃度40 fmol/ $\mu$ lになるようにスパイクし、これを標準血清で段階希釈して、終濃度0.02 fmol/ $\mu$ lから40 fmol/ $\mu$ lの標準血清を作成した。これらに終濃度が4 fmol/ $\mu$ lになるように安定同位体バイオマーカーペプチドを内部標準として加えた。これを用いてLC-MS/MSアッセイを行い、検出したアナライトと内部標準の比をとり、検量線を作成する。各希釈系列サンプルは(n=3)とした。

図 1 6 右図に6種のバイオマーカーの一つであるADPEP1039の検量線を示す。縦軸はLC-MS/MS測定で検出したアナライト(バイオマーカーペプチド)と内部標準(IS)の面積値の比であり、横軸は標準血清にスパイクしたアナライトの量を示している。

$R^2=0.98966$ と高い精度で検量線が作成できた。

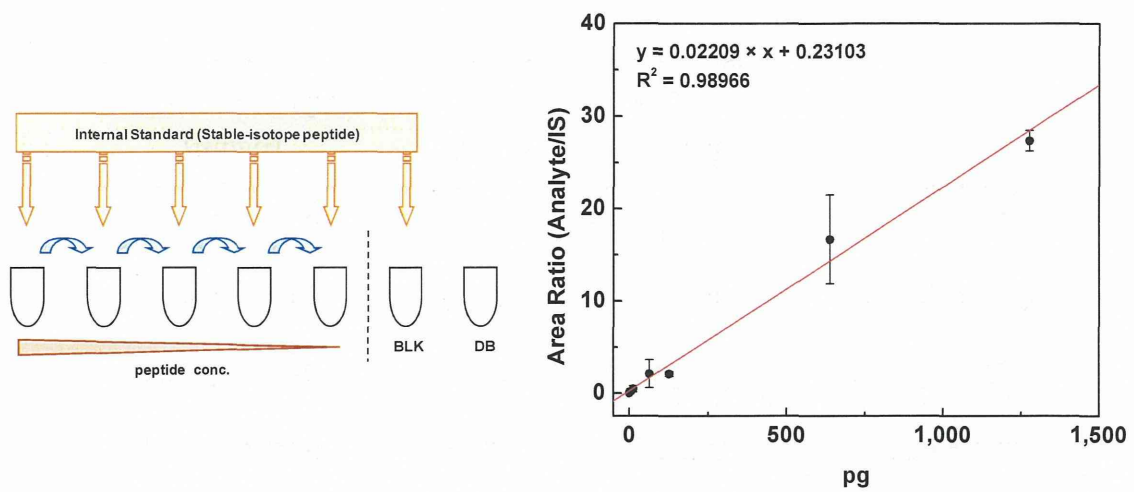


図 1 6 外部標準法で用いる標準サンプルの調製 (左図)、ADPEP1039の検量線 (右図)

(左図) Double Blank (DB)は標準血清のみ、Blank (BLK)は標準血清に内部標準(安定同位体ペプチド)を加えた血清

図 1 7 に各バイオマーカーペプチドの検出限界と定量下限値と検出範囲を示す。いずれのバイオマーカーペプチドについて、検出限界、定量下限値は約30 pg/mlオーダーで検出可能であった。またダイナミックレンジは30 pg/mlから100 ng/mlの範囲で定量可能であることが分かった。

	検出限界 (pg/ml)	定量下限値 (pg/ml)	Dynamic range (ng/ml)
AD1046	34.24	34.24	0.035 - 68.52
AD1048	46.52	46.52	0.047 - 93.06
AD1049	30.68	30.68	0.031 - 61.40
ADPEP1396	31.24	31.24	0.032 - 62.47
ADPEP1039	25.52	25.52	0.026 - 51.06
ADPEP1250	28.64	28.64	0.029 - 57.30

図 1 7 6種のバイオマーカーの検出限界と定量下限値

MRMアッセイを用いた認知症マーカーペプチド検出の再現性は合成したバイオマーカーペプチドの溶液を用いて行った。6種の認知症マーカーペプチドの混合溶液(1 pmol each)を40回繰り返し測定を行った。1回辺りのMRMアッセイは20分で測定した。図 1 8 に認知症マーカーペプチドの溶出時間(Retention time)および、面積値(Area)の平均値(Ave.)と標準偏差(SD)、および変動値(CV, %)を示した。溶出時間については、いずれのバイオマーカーペプチドについてもCVが2%以下であり、UFLCの送液の安定性が高いことを示している。面積値については、AD1046, AD1049, ADPEP1396, ADPEP1039がCV15%以下であり高い再現性を示した。残りの2ペプチドについては、CVが20%以上であった。AD1048、ADPEP1250は面積値が再現性の高い4ペプチドと比較すると値の桁が一桁異なっている。すなわち、変動値が高いバイオマーカーペプチドは検出感が悪い。これらのペプチド(AD1048, ADPEP1250)についてはMRMトランジションの再構築を行う予定であ

る。

	Retention time (min)			Area (counts)		
	Ave.	SD	CV (%)	Ave.	SD	CV (%)
AD1046	5.98	0.08	1.39	3481.05	406.41	11.67
AD1048	8.24	0.10	1.23	241.09	83.68	34.71
AD1049	6.08	0.06	0.98	7228.30	821.80	11.37
ADPEP1396	7.16	0.10	1.41	3578.05	398.30	11.13
ADPEP1039	5.19	0.07	1.27	6665.71	588.95	8.84
ADPEP1250	4.96	0.06	1.20	767.42	154.94	20.19

図18 6種のバイオマーカーの再現性（溶出時間、面積値）

④ 認知症バイオマーカー候補の臨床有効性の評価—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19上段）ならびに血液凝固系タンパク質由来ペプチドの変化（図19下段）。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。

補体タンパク質由来ペプチドAD1008はMCIの発症とともに有意に上昇していた。血液凝固系タンパク質由来ペプチドADPEP1039はMCIの発症とともに減少の傾向を示していた。同じく血液凝固系タンパク質由来ペプチドであるADPEP1250はMCIの発症とともに有意に上昇していた。

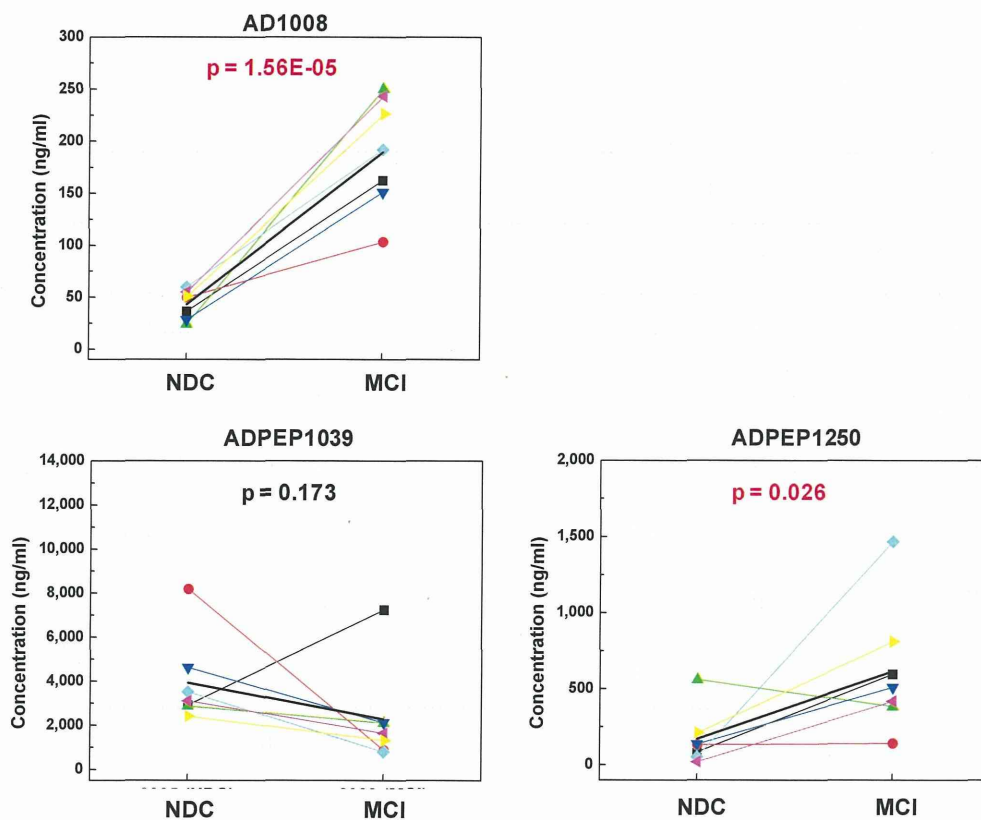


図 19 利根町縦断研究サンプルを用いた定量  
 上段：補体タンパク質由来ペプチド (AD1008), 下段：血液凝固系タンパク質由来ペプチド ADPEP1039 (下段左), ADPEP1250 (下段右)

#### D. 考察

MRMトランジション作成について、13種の認知症マーカーペプチドおよび、その安定同位体ペプチドのMRMトランジションの構築を行った。

前処理については、Oasis HLB  $\mu$ Elution plateを用いることにより、13種すべてのペプチドの検出ができが、AD1025、ADPEP109315、ADPEP1315は前処理後のMRMアッセイで他のペプチドと比較して強度が低かった。これはペプチドのアミノ酸残基の組成の違いにより、Oasis HLB  $\mu$ Elution plateへの相互作用が弱い/強いいため、ペプチドが素通り/吸着したと考えられた。これらのペプチドについては、

今後Oasis HLB  $\mu$ Elution plateの前処理に用いる洗浄溶媒、溶出溶媒について個別に検討する。

利根町縦断研究サンプルを用いた補体タンパク質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あった。さらには血液凝固系タンパク質由来ペプチドについても、有意な変化が見られた。次年度以降は、他の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
Sugimoto K, Shiraki K, Takei Y, Ito M, Nobori T, Suzuki H, Dissanayaka SK, Meno K, Asashima M, <u>Uchida K.</u>	Serum protein isoform profiles indicate the progression of hepatitis C virus-induced liver diseases.	Int. J. Mo.l Med.	31	943-950	2013
Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, <u>Uchida K.</u> Nishiyama H.	Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts.	Int. J. Oncol.	42	543-548	2013
Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Ema M, Kojima T, <u>Uchida K.</u> Kato M, Miyata T, Takahashi S.	Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva- deficient mice.	J. Biochem	152	549-555	2012



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	120	914-923	2012
Endo G, Tachikawa H, Fukuoka Y, Aiba M, Nemoto K, Shiratori Y, Matsui Y, Doi M, <u>Asada T.</u>	How perceived social support relates to suicidal ideation: A Japanese social resident survey..	Int. J. Soc. Psychiatr y		Epub ahead of print	2013

<p>Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, <u>Asada T</u>, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H.</p>	<p>Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A<math>\beta</math> and differential drug responsiveness.</p>	<p>Cell Stem Cell</p>	<p>12</p>	<p>487-496</p>	<p>2013</p>
--	--	-----------------------	-----------	----------------	-------------

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
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
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

Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Hidaka S, <u>Mizukami K</u> , Asada T.	Effect of plasma lipids, hypertension and APOE genotype on cognitive decline.	Neurobiol Aging	33	2633-2640	2012
Hidaka S, Ikejima C, Kodama C, Nose M, Yamashita F, Sasaki M, Kinoshita T, Tanimukai S, <u>Mizukami K</u> , Takahashi H, Kakuma T, Tanaka S, <u>Asada T</u> .	Prevalence of depression and depressive symptoms among older Japanese people: comorbidity of mild cognitive impairment and depression.	Int J Geriatr Psychiatr y	27	271-279	2012