

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）

認知症の超早期診断システムの構築と発症予防のための介入プログラムの作成

総括研究報告書

研究代表者 内田 和彦 国立大学法人筑波大学医学医療系 准教授

研究要旨

本研究では「元気な高齢化社会実現のための生涯の健康脳の維持」を目的に、「早期介入のための認知症早期診断法の確立」を目指す。申請者らの利根プロジェクトと称する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」で蓄積し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により、認知症発症と発症リスク・リスク抵抗要因に関わる生体分子（バイオマーカー）を明らかにする。プロテオミクスならびに比較定量タンパク質メタボロミクス（ペプチドミクス）技術を用いてアルツハイマー病・軽度認知障害（MCI）の血液中に特徴的に検出されるタンパク質・ペプチドに注目して、地域介入縦断研究の時系列におけるこれらバイオマーカーの変動を解析した。

地域縦断である利根プロジェクト（利根町コホート）の時系列の臨床データと血清を活用し、データベースの構築と候補バイオマーカーの時間軸における変化についての検討、タンパク質メタボロミクス（ペプチドーム）分析の導入のための血清試料前処理条件の検討ならびに臨床データ分析における要件項目の検討、多施設サンプルを用いたこれまでに見出した血中ペプチドバイオマーカーの親タンパク質の横断面における臨床有効性の解析、同タンパク質の知的健常からMCIへと至った者における血清中のタンパク質の経時的推移について同時多項目免疫アッセイ法を用いた解析、タンデム四重極質量分析装置を用いた高速MRM（同時多項

目分析) LC-MS定量法の確立を行った。縦断研究においては、知的健常からMCIへと至った者の対照として、知的健常まま認知機能を維持している各サンプルならびMCIからMCIすなわちこの病態を保持している各サンプルについて比較した。確立したタンデム四重極質量分析装置を用いた高速MRM(同時多項目分析) LC-MS定量法によって縦断研究の血清の解析結果を得た。同じサンプルを用いて複数の血清タンパク質について同時多項目免疫アッセイ法による縦断研究サンプルの解析し、3つのタンパク質が、知的健常からMCIへと至った者ないしはMCIを維持しているもので低下していることが明らかになった。これら3つの組み合わせで多重ロジスティクス解析による判別分析によって、AD vs. 知的健常において感度92%、特異度70%を、MCI vs. 知的健常において感度90%、特異度50%を得た。これらのタンパク質は健常老化においてもその量が低下するものもあるが、知的健常からMCI、ADへと至った者で顕著に低下した。

研究分担者

朝田 隆	筑波大学	医学医療系	精神医学	教授
水上 勝義	筑波大学	医学医療系	精神医学	准教授

I . 研究報告 概要

A . 研究目的

本研究では「元気な高齢化社会実現のための生涯の健康脳の維持」を目的に、3年間で「早期介入のための認知症早期診断法の確立」を目指す。これらの効果は、その後の研究で検証し、認知症予防の実現が期待できる（図1）。申請者らの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」¹⁻⁴⁾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により、認知症発症と発症リスク要因・リスク抵抗要因に関わる生体分子（バイオマーカー）を明らかにする（図2）。今年度、2014年は、縦断研究におけるプロテオミクスならびにタンパク質メタボロミクス解析のための血清・血漿の収集とプロテオミクス解析を行う。

本研究では、これらの10年間以上にわたる地域縦断研究において蓄積してきた時系列の臨床データと血清を用いて、軽度認知障害と認知症を発症した者としなかった者の分子基盤についての情報を獲得、リスク要因とリスク抵抗要因に関わる生体分子を探索する。また介入効果との関連や早期診断の効果を今後継続する地域縦断研究（研究期間終了後研究を含む）で追跡し評価する。バイオマーカーについては、

申請者らが見いだしたMCIの血液中に特徴的に検出される神経細胞由来のタンパク質・ペプチド⁵⁾、ならびにフォーカスドプロテオミクスによって注目した5つのタンパク質について、複数のコホートからの臨床サンプルを用いた横断研究、利根町コホートの時系列臨床サンプルを用いて、タンパク質はイムノアッセイと組織免疫化学により、ペプチドについては高速液体クロマトグラフと質量分析を用いたLC-MS法によって解析する。

本研究の背景について述べる。認知症発症のプロセスは以下のように考えられる。

【酸化ストレス・Aβオリゴマーなど+環境因子】→【Synaptotoxic speciesの誘導・炎症】→【シナプスの破壊】→【病的な脳老化】→【臨床上の認知症の発症（日常生活の障害）】

健常老人の脳でもAβの蓄積があることや、Aβの蓄積のない高齢者の認知障害があることから酸化ストレス因子や環境因子がキーになると考えられているが、脳内のダメージを引き起こす詳しいメカニズムはわかっていない。アミロイドオリゴペプチド（Aβオリゴマー）をヒト脳（海馬）切片に加えるとシナプスの障害が観察される⁶⁾ことから、認知症発症の分子基盤に<酸化ストレス+Aβオリゴマー+環境因子>によるシナプス毒性があると考えられる。「シナプス破壊の状態が非侵襲的に観察・検査」できれば認知症などの早期診断に役立つと考えられるが、国内・国外の研究で報告はない。本研究の特色は、筑波大学などで精度の高い診断を受けた症例を用いた横断研究ならびに認知症予防の地域介入の縦断研究とプロテオミクス・タンパク質メタボロミクス（ペプチドミクス）によるバイオマーカー研究を融合させ、アルツハイマー病とMCIの血液診断の臨床的有用性について縦断面における評価を

行う点にある。得られた知見から、最終的には、これらのバイオマーカータンパク質とアミロイドオリゴペプチド（Aβオリゴマー）との生物学的相互作用を分析し、これらシナプス障害分子（Synaptotoxic species）シナプス毒性因子のターゲット分子（レセプター）とシナプス破壊のプロセスならびにその防御要因についてその一部を明らかにする。

- 1) Fukumoto N, Asada T, *et al*. Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **24** : 1119 (2010)
- 2) Sasaki, M., Asada T, *et al*. Prevalence of four subtypes of mild cognitive impairment and APOE in a Japanese Community. *Int J Geriatr Psychiatry* **24**: 1119 (2009)
- 3) Takei, N., Asada T, *et al*. Genetic association study on in and around the *APOE* in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics* **93**: 441 (2009)
- 4) Miyamoto M, Mizukami K, Asada T. *et al*. Dementia and mild cognitive impairment among non-responders to a community survey. *J Clin Neurosci* **16**: 270 (2009)
- 5) Uchida, K, Mizukami K, Asada T. *et al*. Identification of serum biomarker fro Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. in prep.
- 6) Lambert, MP, *et al*. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6448 (1998).

認知症の超早期診断システムの構築と発症予防のための介入プログラムの作成

外的要因(環境因子)

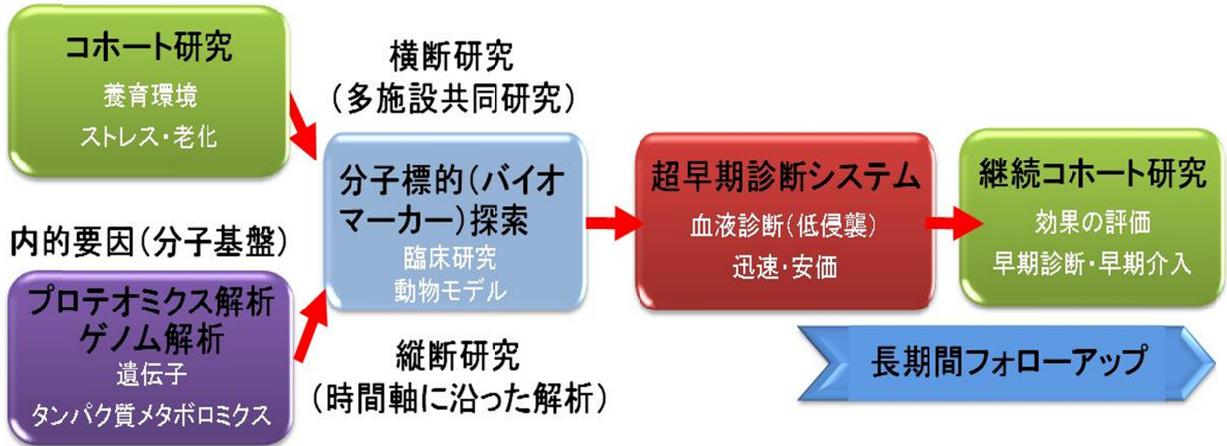


図 1

認知症予防の地域介入の縦断研究とプロテオミクス・タンパク質メタボロミクス(ペプチドミクス)によるバイオマーカー研究を融合させ、これらバイオマーカーのアルツハイマー病と MCI の血液診断の臨床的有用性について横断面、縦断面における総合的な評価を行う。さらに介入効果との関係を明らかにし、これらのバイオマーカーなしはその関連タンパク質・代謝物について、認知症の発症における役割を検討し、継続コホート研究によって危険因子・抑制因子の推定を行い、*in vitro* の実験を通してそれらの因子の同定が期待できる。

茨城県利根町コホート(2001年開始 継続中) 参加人数1916人

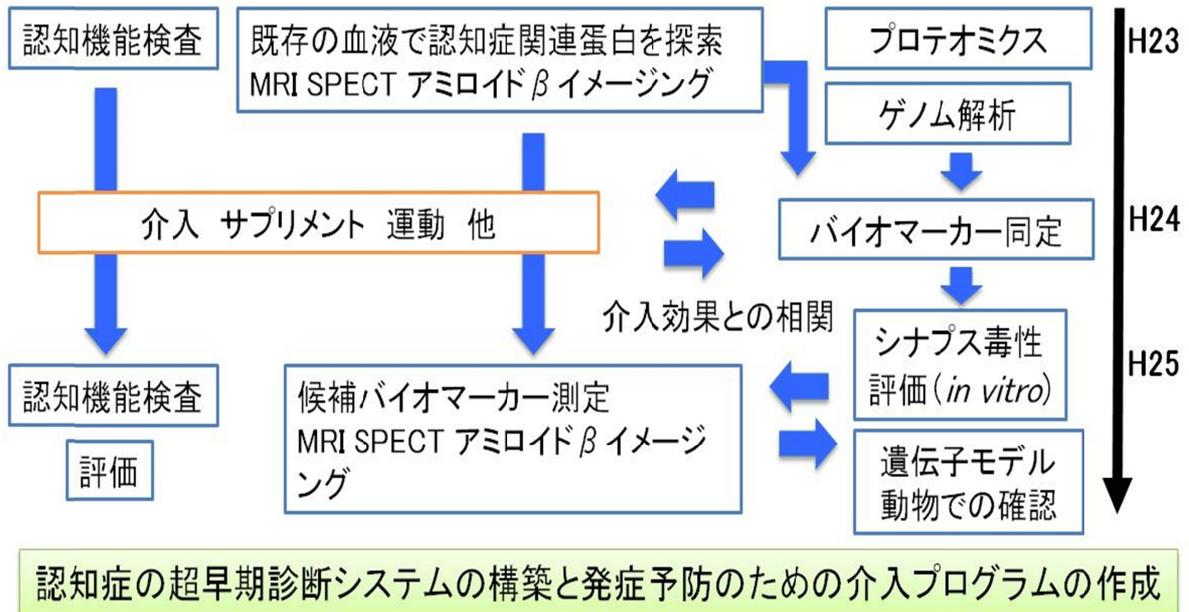


図2

本研究の研究期間における各研究項目の関係を示す。髄液の分析が遅れているものの、全体としては予定通りに研究が進んでいる。申請者らの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」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により、認知症発症と発症リスク要因・リスク抵抗要因に関わる生体分子(バイオマーカー)を明らかにすることで認知症の発症予防のための介入プログラムを作成につなげたい。

B．研究方法

本研究で用いた臨床サンプルと解析方法については各論にその詳細を示す。

本研究期間における主な研究項目を以下に示す。

- 1) これまでの予備的な解析で得られたMCI・アルツハイマー病診断バイオマーカーの多施設解析
- 2) 脳脊髄液と血清におけるバイオマーカータンパク質・ペプチドの動態
- 3) 他の認知症疾患を鑑別する方法の研究
- 4) 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・ペプチドの推移ならびに介入効果との関連分析
- 5) 機能性うつと器質性うつの鑑別
- 6) 環境因子の探索
- 7) 予防プログラムの作成

の項目を年度計画に沿って実施した。

なお研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）への対応状況は以下の通りである。

【倫理指針】

本調査の実施にあたっては、ヘルシンキ宣言の精神を尊重し、本調査実施計画書および疫学研究に関する倫理指針（平成17年6月29日一部改正）を遵守した。

【個人情報の保護】

個人情報保護法に基づき、本調査に係る個人情報の安全管理を十分に図った。また、本調査に係る個人情報を第三者に提供する場合はあらかじめ参加者の同意を得た上でを行い、調査の結果を学会等で公表する場合には参加者を特定できないよう行った。

【個人情報の保護に係わる具体的方法】

調査実施者は本調査にあたり、参加者の個人情報を保護するために、「参加者識別コードリスト」を作成し、参加者識別コード、カルテ番号、被検者名を記入した。なお、調査実施者等が調査関連データを報告する際の参加者の特定は、被検者識別コードにより行った。これらのデータは、申請者が管理する施錠できる部屋において、スタンドアロンのコンピューターに保存した。

C . 研究結果

以下の6項目について研究を行った。

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）

分担者の朝田、水上によりアルツハイマー病の精緻な診断・除外診断を行った症例について血清サンプルを収集し、内田によりプロテオミクス・タンパク質メタボロミクス（ペプチドミクス）解析手法を用いて、バイオマーカー候補を含むタンパク質とペプチドの計測と比較定量解析を行った。国内の5つのコホート：筑波大学付属病院、福岡大学医学部付属病院、鳥取大学医学部付属病院、医療法人さわらび会福祉村病院においてそれぞれの研究で参加した患者・健常老人と収集された臨床サンプル、ならびに利根プロジェクト「認知症予防の地域介入縦断研究」で参加した患者・健常老人と収集された臨床サンプルを用いた。利根町の3年ごとのフォローアップとして、認知機能検査と採血を実施し、プロテオミクスならびにタンパク質メタボロミクス解析のための血清・血漿の収集とプロテオミクスのための世界標準のプロトコールで前処理を行い、それぞれマイナス80度で30 µlに分注して保管した。アルツハイマー病、MCI、各種認知症疾患ならびに他の精神神経疾患の患者の

血清（一部は血清と血漿ならびに髄液）を用いて、これまでの研究で得られた診断マーカー候補の解析を行った。臨床診断基準など臨床評価を朝田・水上で行い、バイオマーカーの定量解析を行った。医学統計解析に供するためデータはすべてエクセルの登録後、データベース化が進んでいる。本年度は、ADPEP1250ならびにAD1089について縦断研究と横断研究において認知症、MCIの発症にともなって有意な上昇が認められた

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）

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が、今年度は、ADPEP1315ペプチドならびにADPEP1250ペプチドマーカーならびにADPEP1008の親タンパク質について、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行う予定でサンプルの調整を行った。まだ結果が得られていないが、来年度には、同一患者の脳組織、脳脊髄液ならびに血清ではペプチドとタンパク質の相関関係を明らかにし、代謝動態とくに脳内、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。

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、計測可能なすべてのペプチドに於いて最適化が終了したが、十分な感度でないと判断されたペプチドについては、標準ペプチドの再合成、MRMトランジションの再構成を継続して行っている。

3) 他の認知症疾患を鑑別する方法の確立 (水上・内田)

バイオマーカー (タンパク質・ペプチド) の一部はアルツハイマー病 に固有の異常パターンを示し、その他のものは変性々認知症であれば疾患特異性なく健常者とは異なるパターンを示すものであったが、解析の結果、脳脊髄液中のAβの変動のようにアルツハイマー病 に固有のパターンをしめすものは少なく、多くは他の認知症でも異常値が観察された。また一部は、たの精神神経疾患 (統合失調症やうつ病など) でも血清中の量の変化がみられた。今年度は、この点に注目して、アルツハイマー病のみならずレビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症のごく初期、あるいは精神疾患を診断できるかどうかについて検討した。

4) 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およびペプチドの推移と介入効果との関連 (朝田・内田)

昨年度に引き続き、知的健常からMCI、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測定し評価、臨床症状初発の何年も前の時点でアルツハイマー病 発症を感知できるかどうかについて検討した。昨年度の結果の再現性を慎重に確認するため、同一のサンプルで実験を行った。ペプチドマーカー候補については、利根コホートのサンプルを横断研究解析と縦断研究解析として分析した。LC-MS/MS アッセイによる横断解析の結果の一部を図3に示す。縦断研究については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、変動の明らかになったタンパク質について3つの組み合わせによる臨床有効性を解析したところ、MCI vs. NDC、アルツハイマー病 vs. NDCにおいてそれぞれ、約70%、約80%の精度 (特異性ならびに感度) であった。

バイオマーカーは、認知機能の低下だけでなく加齢によって血清中の量が変動するものがあるが、加齢に伴う認知機能の低下という点で共通の分子基盤が考えられる。

Verification of biomarker ADPEP1250 by Tone longitudinal analysis using non-labeling method

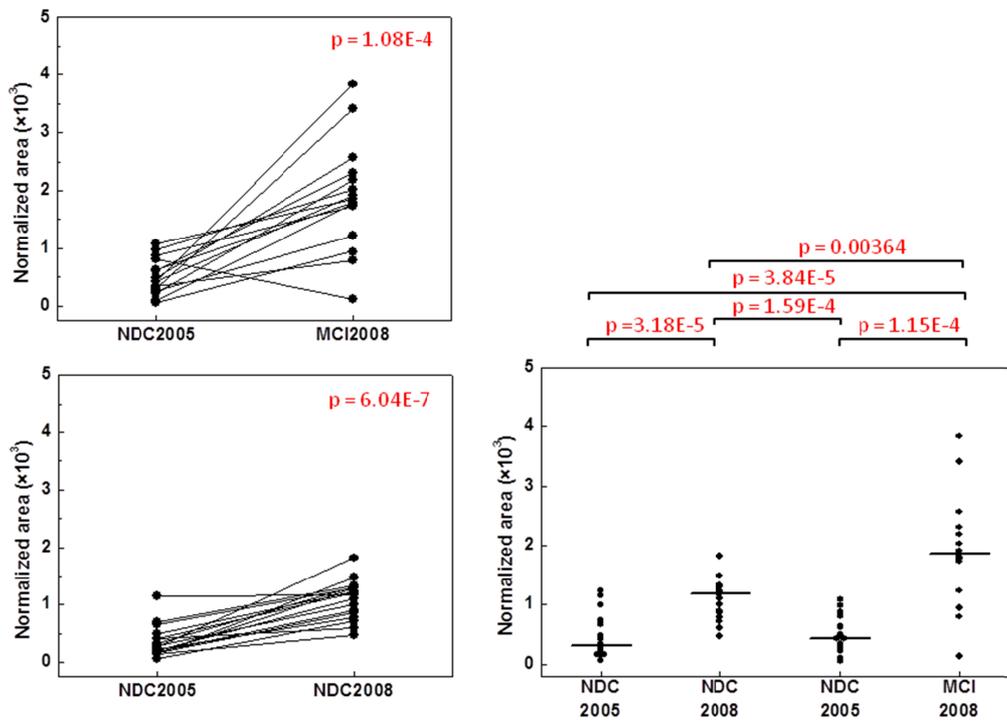


図 3

さらに確立したLC-MS/MS MRMアッセイで一部のバイオマーカーペプチドについて測定を行った。またペプチドミクスによる解析については、21種類のペプチドについて、nanoLC-MALDI TOF MSによる解析ならびにnanoLC ESI-TOF MS/MS (Qq-TOF MS) による解析を行った (継続解析中)。今後、運動などの介入によって症状が改善した症例を含めて、研究期間の3年で合計120セットの症例の解析を行った (表1)。

表1 これまでに解析した縦断研究における時系列血清サンプルとその診断

Group	2001年	2005年	2008年	2011年	血清 サンプル数
1	NDC	NDC	MCI	MCI	17
2	NDC	NDC	NDC	NDC	85
3	NDC	MCI	MCI	MCI	18
合計					120

5) 機能性うつと器質性うつの鑑別 (内田・水上)

昨年度に引き続き、うつを主徴とする大うつ病患者の収集を行った。大うつ病の診断がつかないが、うつ状態と診断される症例ならびに同一地域の健常者についても合計で200例以上収集を行った。高齢者ではうつ症状、うつ状態はしばしばみられる。こうした状態が各種の認知症性疾患の前駆状態であることは稀でない。今年度は解析までにいたらなかったが、次年度で20症例の大うつ病と30例のうつ状態と診断される症例について解析を現在行っている。今後、機能性うつと器質性うつの鑑別についての情報が得られる予定である。

6) 環境因子探索について(朝田・水上・内田)

時系列症例の中からアルツハイマー病を発症した者としなかった者を類別し、リスク因子とリスク抵抗要因の分析を行うためのデータベースを構築について継続して実施した。これらの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しなければならない。とくにアポリポ蛋白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、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重要である。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の整備について継続して行った。

D. 考察

申請者らが比較定量タンパク質メタボロミクス技術を用いて発見したアルツハイマー病・軽度認知機能障害(MCI)の血液中に特徴的に検出される神経細胞由来ならびに炎症関連のタンパク質・ペプチドに注目し、多施設サンプルにより、これまでに申請者らが見出した血液バイオマーカーの「横断面」における診断精度の解析について、複数の医療機関から得られたサンプルを用いてその再現性を検討するとともに、利根プロジェクト(利根町コホート)由来のサンプルを用いて、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3年ごとのバイオマーカーの推移について、比較定量タンパク質メタボロミクス技術を用いた「縦断研究解析」を重点的に行った。縦断研究解析において3年ごとのバイオマーカーの推移

の分析を重点的に行った。知的健常からMCI、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測定し、評価することで、臨床症状初発の何年も前の時点でアルツハイマー病発症を感知できるかどうかについての検討を行うものである。これにより「認知症の超早期診断」が可能になり、高齢化社会において急増する認知症患者の数を減らすことができると期待できる。本研究終了後の研究計画を以下に示す（継続中のものも含む）。

1．高速MRM-LC-MS定量法を用いて大規模多施設サンプルによる横断研究でバイオマーカーの臨床有効性の確認、さらに同一人物時間軸解析による縦断研究を重点的に実施により認知症早期診断血液マーカーの臨床有効性を確定する。

2．MCIやアルツハイマー病に移行するタイミングで変動する新規タンパク質・ペプチドに注目し、その発症過程における役割についての知見についてiPS細胞を用いた解析で得る。

3．認知症発症リスク要因とリスク抵抗要因に関わる生体分子の探索を開始する。
具体的には、

- これまで行ってきた診断バイオマーカーの横断面における診断精度の証明 - MCI・アルツハイマー病の診断精度を多施設サンプル解析により検証する。特に健常人対照群を重点的に解析することで、病的でない加齢による変動を明らかにしたい。

- 脳脊髄液と血清における疾患関連バイオマーカーの測定とこれらバイオマーカー（タンパク質代謝物としての血中ペプチド）の動態解析 ならびにAβペプチドの動態との比較

- 診断マーカーの縦断面（時間軸）における臨床的有用性の解析

- 2012年のフォローアップ調査をいれて、知的健常からMCI、アルツハイマー病へ

と至ったもの、MCIの病態を維持しているものにおけるバイオマーカーの推移のLC-MS/MS MRMアッセイとnanoLC MALDI-TOF MSによる解析

- APOE4遺伝子型を持っていながら、もしくは脳内Aβの蓄積があるにもかかわらず【知的健常→知的健常を維持している】ケースにおける内因要因（分子基盤）ならびに外因要因の分析のための情報のデータベース化

E . 結論

高齢者が元気に活動している社会を実現するため日本発の革新的な医薬品の研究開発、ならびに質の高い医療・介護サービスが求められている（新成長戦略）。認知症の横断研究と認知症予防の地域介入の縦断研究による検証を実施し、知的健常からMCI、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明らかにした。今後、認知症の血中バイオマーカーの臨床における実用化の研究へと進め、認知症の超早期診断を実現し、予防・治療の研究へと進めることが期待できる。2019年までに、これまで血液などを用いた簡単な検査手段がなく早期発見と効果的な治療の実施ができなかった認知症において、有用で簡便な検査の臨床における実用化を世界ではじめて可能にできることが期待される。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

(内田和彦)

- 1) 内田和彦, 目野浩二, 鈴木秀昭, 赤津博康, 水上勝義, 朝田隆. 認知機能障害とアルツハイマー病の血液バイオマーカー . Dementia Japan 27: 277-288, 2013
- 2) Sugimoto K, Shiraki K, Takei Y, Ito M, Nobori T, Suzuki H, Dissanayaka SK, Meno K, Asashima M, Uchida K. Serum protein isoform profiles indicate the progression of hepatitis C virus-induced liver diseases. Int. J. Mol Med., 31: 943-950, 2013
- 3) Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K, 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

(朝田 隆)

- 4) Endo G, Tachikawa H, Fukuoka Y, Aiba M, Nemoto K, Shiratori Y, Matsui Y, Doi M, Asada T. How perceived social support relates to suicidal ideation: A Japanese social resident survey. Int. J. Soc. Psychiatry, 2013 [Epub ahead of print].
- 5) Yasuno F and Asada T. Effect of plasma lipids and APOE genotype on cognitive decline. Dialogues Clin Neurosci. 15: 120-6, 2013.
- 6) 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, 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.

(水上勝義)

- 8) Mizukami K, Abrahamson EE, Mi Z, Ishikawa M, Watanabe K, Kinoshita S, Asada T, Ikonovic MD. Immunohistochemical analysis of ubiquitin-1 in the human hippocampus: association with neurofibrillary tangle pathology. *Neuropathology*.34: 503, 11-8 (Epub 2013 Jul 21.)

2. 学会発表

- 1) 佐藤晋爾, 村木悦子, 石田一希, 太田深秀, 服部功太郎, 内田和彦, 功刀浩, 朝田隆 東日本大震災後の北茨城市におけるうつ状態に関連する因子の検討。
第109回日本精神神経学会学術総会 (福岡) 2013.5.23.
- 2) Uchida K, Suzuki H, Meno K, Korenaga T, Sugimoto K, Shiraki K.
Identification of circulating cell-derived peptides as novel biomarkers for chronic liver disease and hepatocellular carcinoma by non-labeling LC-MS APASL 2013 HCC conference , Cebu, Philippines, 2013.11.22.
- 3) 内田和彦, 劉珊, 鈴木秀昭, 西村吉典, 目野浩二, 軽度認知障害とアルツハイマー

病の血液バイオ - マーカーについて. 第9回認知症サプリメント研究会 (品川) 2013.9.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

PCT/JP/2013/67785

認知機能障害疾患のバイオマーカー及び当該バイオマーカーを用いる認知機能障害疾患の検出方法. 内田和彦、目野浩二、鈴木秀昭、西村吉典

2013.6.29.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

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。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。

今年度は、A β オリゴマーの脳からの排出機構やその神経毒（synaptotoxin）を防御する仕組みに関係するタンパク質を対象に解析を進めた。

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

1) 対象

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った。

2) タンパク質の調査

AD の発症機序には A β が深く関与している (アミロイドカスケード仮説)。AD の発症する 20 年近く前から原因物質である A β が凝集体を形成し、脳の中に少しずつ蓄積する。可溶性の A β オリゴマーはシナプス毒性があり、神経細胞にダメージを与え、記憶や認知機能を担うシナプスを障害する。A β によって障害を受けたシナプスの状態が病態の進行に関係すると考えられる。最近では、認知機能健常から AD に至るまで、プレクリニカル AD、MCI due to AD、AD という臨床病理上のプロセスを経ると考えられている (図 2)。プレクリニカル期や MCI 期に介入することの重要性が示唆されている。

MCI や AD に至る認知機能の低下は、A β の産生と排出 (クリアランス) のバランスの異常が一つの要因にあると考えてもよい。アミロイドプレカーサ - プロテイン (APP) から産生された A β は、脳内から脊髄液 (CSF) に排出される。私たちの体には A β が脳内に蓄積しないよう排除する仕組みやその毒性を弱める仕組みが備わっている。脂質代謝に関連するアポリポタンパク質や免疫機能としての補体タンパク質や A β と結合してその作用を抑制するトランスサイレチンなどが関係している (図 4)。

アポリポタンパク質の apoE、apoA1 および apoJ は、アミロドベータペプチドと結合してその凝集や毒性を防ぐといわれている。apoE タンパク質は 299 アミノ酸残基の糖タンパク質で、その遺伝子型がアルツハイマー病の発症と関係している。 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ の 3 つのアイソフォームがあり (APOE2, APOE3, APOE4) $\epsilon 4$ アレルを持たないものと比較して $\epsilon 4$ アレルを 1 つもつものは、AD の発症のリスクが 2~3 倍、 $\epsilon 4$ アレルを 2 つもつものは発症のリスクが 12 倍といわれている。AD のリスクに対する apoE アイソフォームの主な効果は、

A β 凝集および排除における違いと考えられている。ApoE は肝臓と脳で高い発現が高く、脳ではアストロサイトとミクログリアに認められる。ApoE はリポタンパク質のエンドサイトーシスのリガンドとして機能している。脳においては高密度リポタンパク質 (HDL) の構成成分は主に apoE である。アストロサイトとミクログリアで産生された apoE は、アイソフォームに依存してすなわち E2>E3>E4 のように A β と結合し、受容体を介してエンドサイトーシスされる。さらに脳血流関門 (BBB) を介した血流への移行に関与する。われわれも検討でも血液中の apoE は ϵ 4 アレルに依存して低下することがわかっている。CSF におけるアイソフォームに依存した量の違いは認められない。CSF や血液における apoE のレベルは、AD と健常人の間で有意な違いはない。

ApoA1 は、血液中では HDL の構成成分として細胞から肝臓へのコレステロールの輸送に働いている。apoA1 は HDL とは独立して心血管疾患のリスクを下げるといわれている。また抗炎症作用と抗酸化作用によって血管障害を防ぐといわれている(Barter, *et al.*, 2004)。AD では apoA1 は脳組織と CSF で A β ならびに APP と結合しており、A β の凝集と A β による毒性を抑制することが示されている。ラットの海馬の培養系を用いて apoA1 が A β の凝集を抑制し、A β による酸化ストレスと神経変性を防ぐことが示されている。さらに APP/presenilin 1 (PS1) トランスジェニックマウス (Tg) と APP/PS1/APOA1 Tg マウスの比較によって、apoA1 が A β によって誘導される炎症を抑制し、APP/PS1 マウスにおける学習記憶機能レベルの低下を防ぐことが報告されている(Lewis, *et al.*, 2010)。臨床サンプルを用いた研究で AD では apoA1 の血漿レベルが低下していること、疫学研究により apoA1 は AD 発症のリスクを下げるということが明らかになっている。APOA1 のポリモルフィズムと AD の発症リスクの関連についての報告

もある。

ApoJ タンパク質は clusterin とよばれ、最近 genome-wide association study (GWAS) によってその遺伝子 *CLU* は *APOE* について AD の発症リスクと関連していることが明らかになった。ApoJ は 75-80 Kda の糖タンパク質で α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーとして存在する。427 アミノ酸残基の前駆体タンパク質がプロテアーゼで切断され、それぞれ 40 kDa の α 鎖と β 鎖が5つのジスルフィド結合でヘテロダイマーを形成する(Yu and Tan, 2012)。ApoJ は脳組織で産生され、AD をはじめとする脳神経疾患で発現が上昇する。ApoJ は、 $A\beta$ の凝集を阻害し、BBB を介した $A\beta$ の脳からの排出に働いている。APP tg の AD マウスモデルで *APOE* と *APOJ* をダブルノックアウトすると、 $A\beta$ とアミロイドプラークが増加し AD の発症が早まった。ApoJ は ApoE と強調して $A\beta$ の脳からの排出や毒性の軽減にはたらいている可能性がある。

AD など神経変性疾患は脳における炎症がその発症に関与しているといわれている。補体は20以上のタンパク質からなり、主に肝臓で産生され、自然免疫においてマクロファージによる異物の排除に必要なタンパク質である。補体タンパク質は通常は非活性化された血漿タンパク質である。補体の活性化に3つの経路があるが、いずれの経路でも最も量の多い補体タンパク質である $C3$ の分解が起こり、 $C3a$ と $C3b$ に分解される。 $C3b$ は貪食細胞のレセプターCR1 と結合することによりオプソニンとして作用する。CR1 は AD の発症に関わる遺伝子ポリモルフィズムとして GWAS で同定されている。血漿 $C3$ については AD でのあまりはっきりした量の変化は認められないが、CSF 中の $C3$ と補体因子 H が AD で上昇するという報告がある。しかしアッセイに使用している ELISA などで、全長の $C3$ を特異的に検出しているものは少なく、多くは $C3b$ など活性化断片もあわ

せて全体を検出していることが多い。

中枢神経系でも補体が産生され、補体系の活性化に必要なコンポーネントも備わっている。補体は脳組織においもマイクログリアやアストロサイトによるエンドサイトーシスに重要であり、 $A\beta$ オリゴマーは補体の働きによって貪食作用によって排除される。この過程には補体 C3、C4 の活性化が必要といわれている。AD マウスモデルである APP トランスジェニックマウスにおいて C3 をさらにノックアウトすると、 $A\beta$ やアミロイドプラークが増強するという報告がある (Wyss-Coray, *et al.*, 2002)。最近、シナプスの再構築におけるマイクログリアを介した synaptic pruning (シナプスの枝打ち) に C3 と補体レセプター CR3 が関与しており、正常の中枢神経系において不必要なシナプスを選択的にプルニングし、シナプスの可塑性に寄与していることが報告された。認知機能の低下との関連が興味深い。

トランスサイレチン (transthyretin; TTR) はプレアルブミンとも呼ばれ、ホモ 4 量体の 64 kDa のタンパク質で主に肝臓と脈絡叢で産生されている。血液中の TTR は低栄養や肝硬変など低下することから、臨床検査では栄養状態の評価に使われている。TTR は以前から AD のバイオマーカーとしても注目されてきた。1994 年に TTR は $A\beta$ オリゴマーと結合してその凝集を阻害することが報告され、さらに AD のマウスモデルで TTR が $A\beta$ のシナプス毒性を抑制することが示されている。免疫組織染色で TTR は海馬のアミロイドプラークと共存していること、AD の脳組織に多いことが報告されている。TTR は AD 患者の CSF で低下することが報告されている。また AD では血清 TTR レベルが低下するといわれている。

このように、アポリポタンパク質や TTR は $A\beta$ と結合してその毒性を抑制す

る、ないしは脳内から排出する働きをもついわゆる「sequester (シークエスタ) タンパク質」であり、その量や機能が低下することが AD の発症の背景にあると考えられる (図4)。

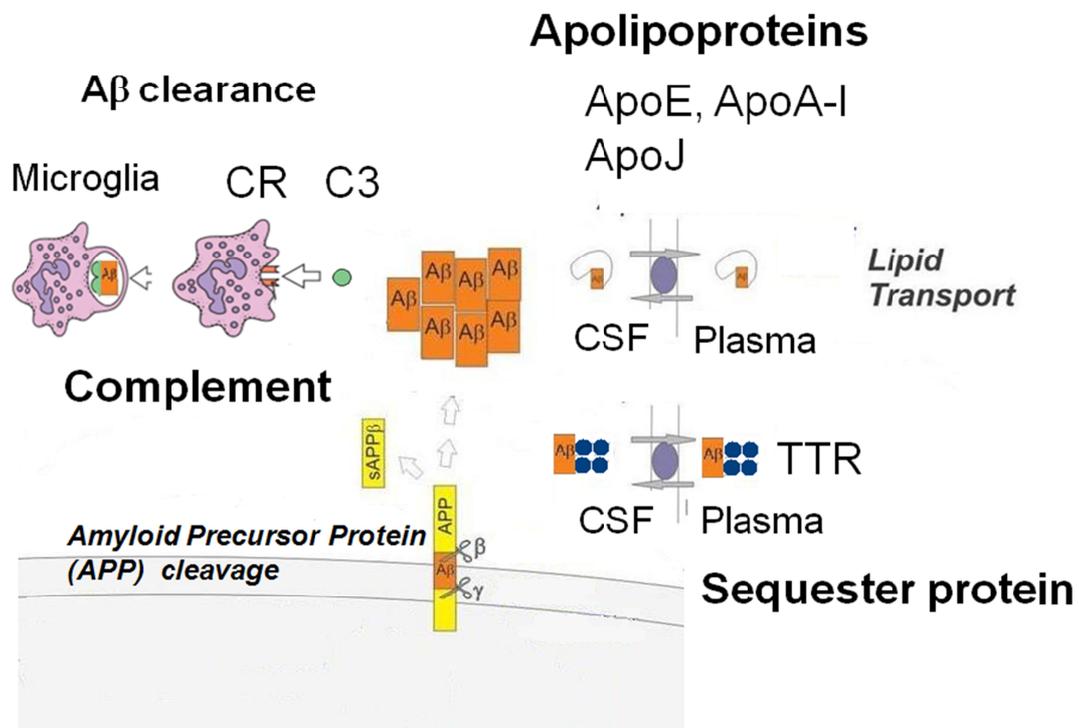


図4 「sequester (シークエスタ) タンパク質」の働き

3) バイオマーカーペプチドについて

昨年度の結果の再現性を慎重に確認するため、同一のサンプルで実験を行った。ペプチドマーカー候補については、利根コホートのサンプルを横断研究解析と縦断研究解析として分析した。

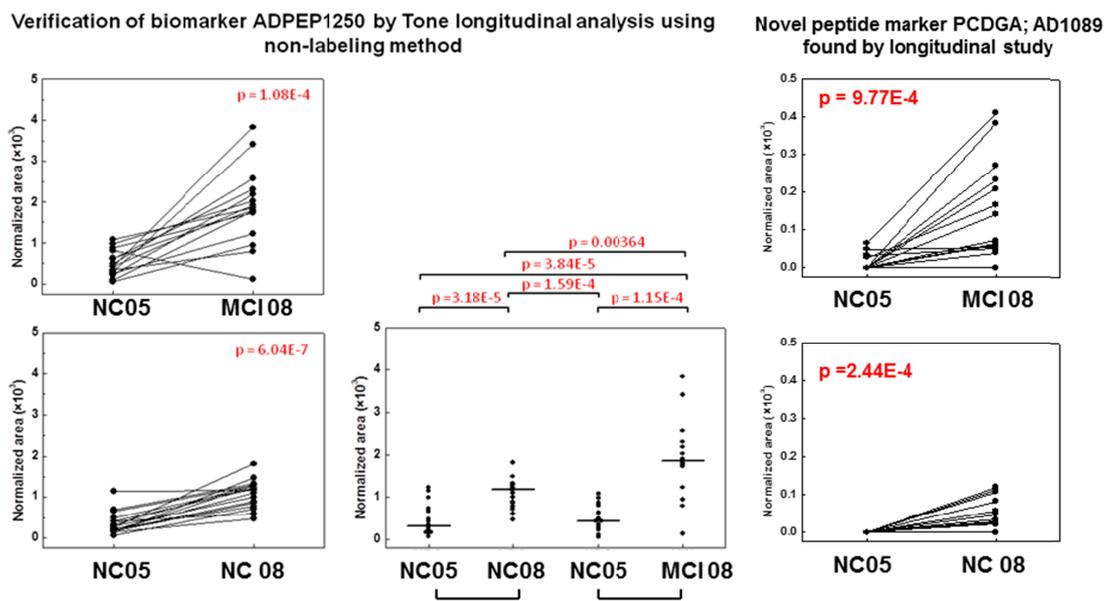
C . 研究結果

本研究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%)

LC-MS/MS アッセイによる横断解析の結果の一部を図5に示す。



1

図5

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。

血清・血漿を用いたタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）は、多量の含

まれるアルブミンなど血漿タンパク質が網羅的解析を妨げるため、SDS-PAGE や LC-MS を用いたプロテオミクス解析によって ng/ml 以下で存在するバイオマーカーの探索はきわめて難しい。われわれは、タンパク質バイオマーカーは'Focused proteomics'によって、低分子量タンパク質を'Peptidomics'によって探索してきた。'Focused proteomics'では、横断研究と横断研究の血清サンプルを用いて前述の"sequester タンパク質"に注目してその量の変化について調べた。正常の中樞神経系においては、"sequester タンパク質"による神経保護 (neuroprotective) 作用がもともと備わっており、A β の神経(シナプス)毒性による AD の発症を抑制していること、加齢によるこれらの神経保護タンパク質の量や機能の低下が、AD の発症のリスクを高めると考えた。縦断研究の血清サンプルは貴重なため、これらのタンパク質の解析には、少量のサンプルで多くのアナライズが解析できる同時多項目イムノアッセイ Luminex 法を用いた。縦断研究に用いた症例を図4に示す。2001年からの調査のうち、2005年と2008年の血清サンプルを用いた。2001年のNDCを追跡調査し、2005年と2008年の診断をもとに症例を選択した。Stable MCI とは、2005年にMCIと診断され、2008年もMCIであった症例を指している。下図に本解析に用いたサンプルについて示す。

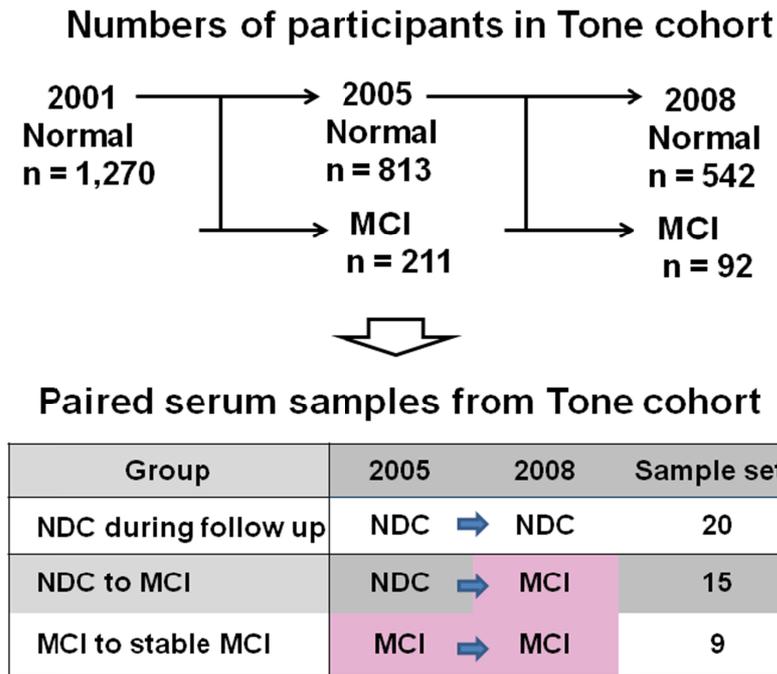


図 6

その結果、アポリポタンパク質をはじめとして、これらの”sequester タンパク質”は MCI の進行とともに減少することがわかった（表 1）。横断研究においても MCI で有意に減少するもの、MCI から AD で有意に減少するものが認められた。TTR、apoA1、C3 の臨床有効性については、NDC vs. AD において receiver operating characteristic (ROC) 曲線における area under curve (AUC) 値がそれぞれ 0.73、0.67、0.83、NDC vs. MCI において、0.68、0.65、0.66 であった。そのほかのタンパク質についても有意差は認められなかったが減少ないしは増加の傾向が認められた。さらにこれら TTR、apoA1、C3 を用いて多重ロジスティック回帰を用いたマルチマーカーによる判別解析を行ったところ、NDC vs.

ADにおいて感度92%、特異度68%、NDC vs. MCIにおいて感度90%、特異度50%の結果が得られた。さらにこれらのマーカーにMMSEの結果を加えると、NDC vs. ADにおいて感度100%、特異度96%、NDC vs. MCIにおいて感度87%、特異度82%となった。以上の結果から、MCIおよびADのスクリーニング検査として、A β と結合してその毒性の抑制や排出にかかわる”sequester タンパク質”を測定することは有用と思われる。これらのタンパク質の減少が結果的に認知機能の低下につながったと考えられるが、血液における変化が、CSFや中枢神経系にどのように影響しているのかは今後明らかにしていく必要がある。

表5 縦断研究と横断研究においてADおよびMCIで変動する血液中のタンパク質

Protein	Changes in MCI and/or AD
ApoE	decrease in MCI and AD
ApoA1	decrease in MCI and AD
ApoJ	increase in MCI and AD
C3	decrease in MCI and AD
C4	no change
Complement factor H	no change
A2-macroglobulin	no change
TTR	decrease in stable MCI and AD

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。

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）

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。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の解析も実施した。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： 健常高齢者 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

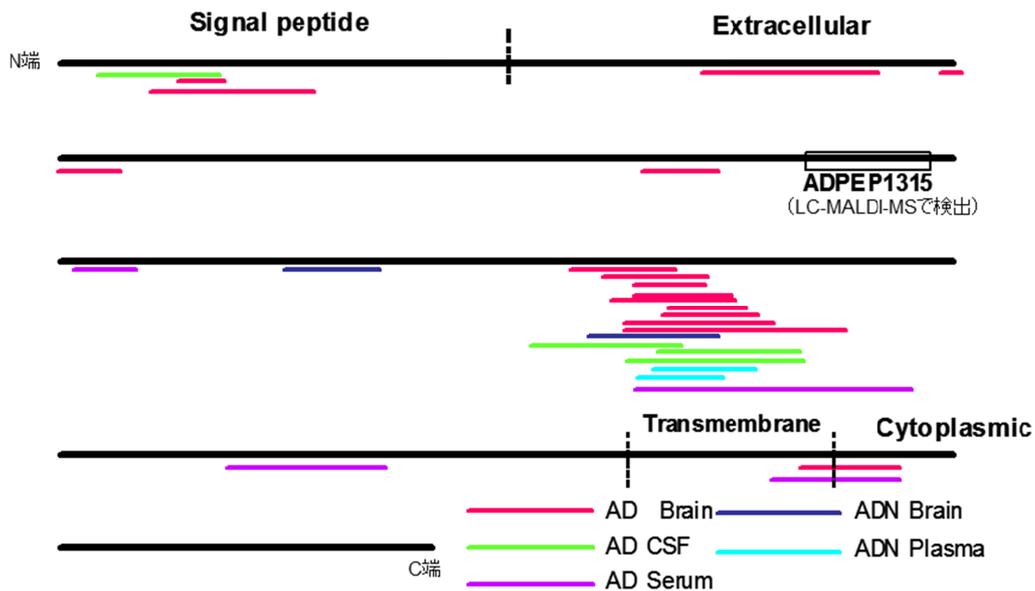
25 μ l

C．研究結果

昨年度から引き続き行った詳細なマッピングによってタンパク質の特定の部位由来のペプチドが血液中にでてくることが明らかになった。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。

LC-MS/MS (ESI)によるAD脳組織、CSFならびに血液におけるADPEP1315関連タンパク質由来ペプチドの検索



12

図7

D. 考察

これまでの研究として、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。

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、脳血管閉門と末梢血管における移動状況について分析を行う必要があると考える。

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。またペプチドについては、本解析におけるバイオマーカーペプチドとはこれまで本研究に用いてきたADPEP1315、ADPEP1250、ADPEP1039、さらに新たにAD1089を加えて解析を行った。

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®200xPONENTR®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 µlをAssay Buffer 995 µl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 µlをAssay Buffer 995 µl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 µl serum at first dilution step) を以下のように行った。

Step1:血清5 µlをAssay Buffer 495 µl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 µlをAssay Buffer 190 µl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%)

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 µg/mlから60~70 µg/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 µg/ml前後)。

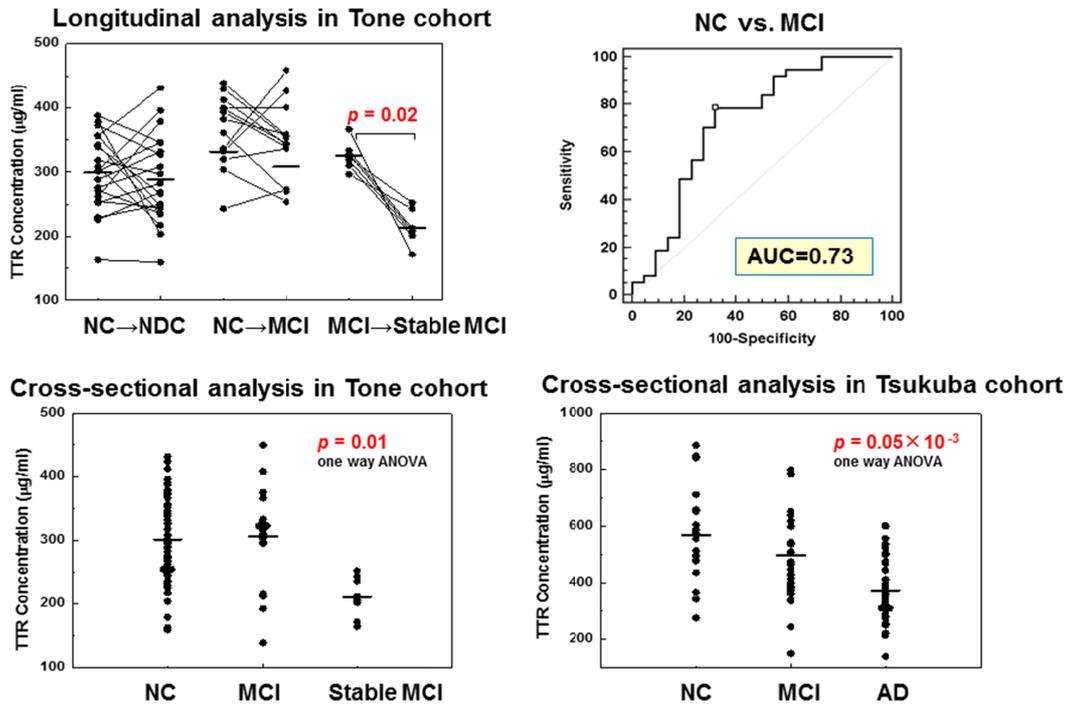


図8 縦断研究におけるシークエスタータンパク質の変化

図11はタンパク質Dの血清中の量の変化を示している。図11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11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11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11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11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。

【AD vs. NC】

Coefficients and Standard Errors

Variable	SE	P
TTR	0.002451	0.02139
Complement	0.01615	0.003979

Percent of cases correctly classified

Actual group	Predicted group		Percent correct
	0 (予想)	1 (予想)	
Y = 0 (NC)	15	7	68%
Y = 1 (AD)	3	34	92%
Percent of cases correctly classified			83%

NCの被験者を正しくNCと判定した確率は68.2%と若干低いが、ADを92%の感度で検出することができる。

【MCI vs. NC】

Coefficients and Standard Errors

Variable	SE	P
ApoA1	0.0007481	0.02713
Complement	0.01077	0.01713

Percent of cases correctly classified

Actual group	Predicted group		Percent correct
	0 (予想)	1 (予想)	
Y = 0 (NC)	11	11	50%
Y = 1 (MCI)	4	35	90%
Percent of cases correctly classified			75%

NCの被験者を正しくNCと判定した確率は50%と低いが、MCIを90%の感度で検出することができる。

8

図9 マルチマーカー解析による判別分析

D. 考察

Focused proteomics解析により、認知症発症リスク要因とリスク抵抗要因に関わる生体分子として、シーケスタータンパク質を同定した。これらのタンパク質は健常老化においてもその量が低下するものもあるが、知的健常者からMCI、ADへと至った者で顕著に低下した。多重ロジスティクス解析によるこれらのタンパク質マルチマーカー判別分析で、AD vs. NCにおいて感度92%、特異度70%を、MCI vs. NCにおいて感度90%、特異度50%を得た。これにMMSEを加えるとそれぞれ特異度が96%、85%となった。

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 β ペプチドの排出や毒性軽減なしは、A β ペプチドによる神経障害の過程に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。これまで使用した臨床サンプルと独立した50例を用いてバイオマーカー評価を行った。

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 ~ を行い、 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。

MRMトランジション作成。

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。

検出限界と定量下限と再現性の検討。

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。

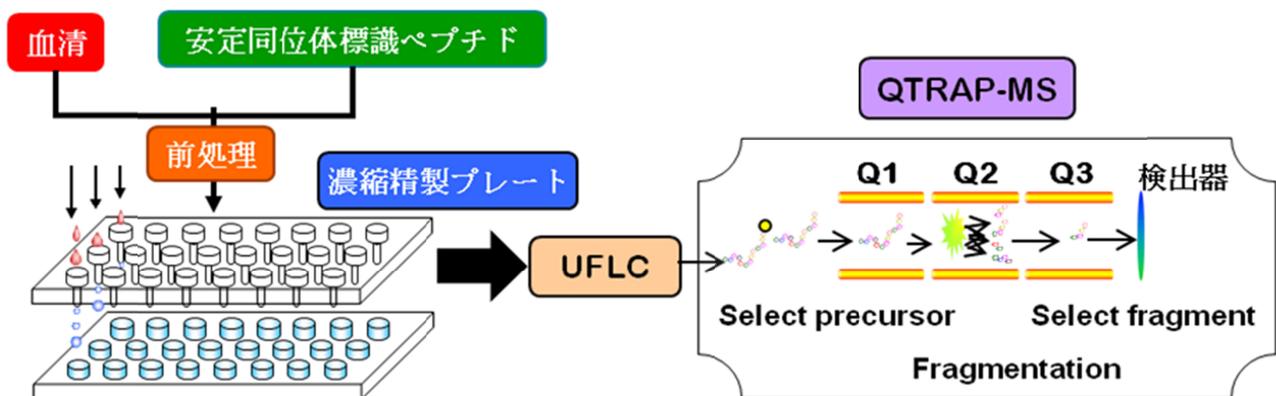


図10 LC-MS/MS SRM (MRM)法の原理

C. 研究結果

昨年度は、本法を用いた定量にける再現性、感度など、計測系としての信頼度があるかについての検討を行った。今年度は、その結果を踏まえて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。

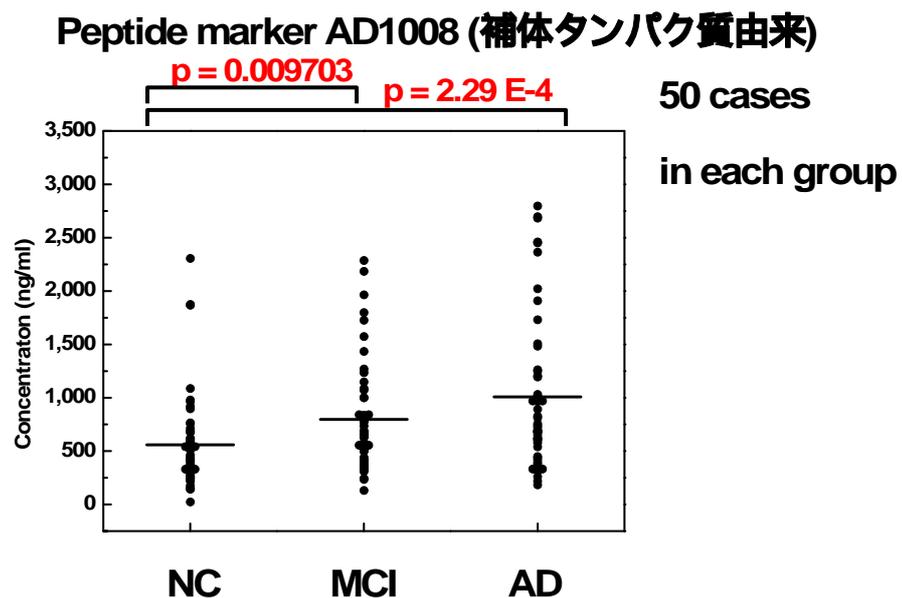


図11 利根町縦断研究サンプルを用いた定量

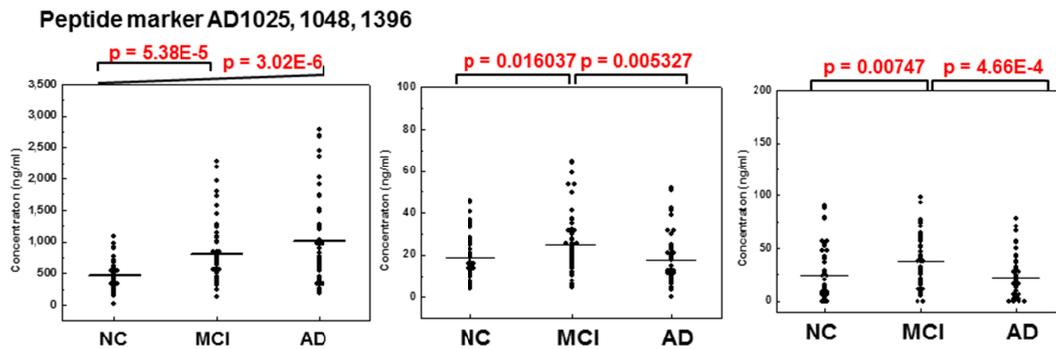
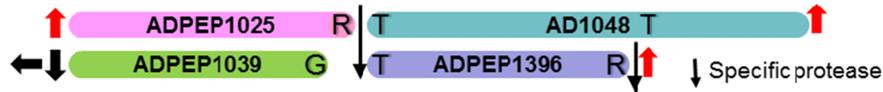


図 1 2 利根町縦断研究サンプルを用いたペプチドバイオマーカーの定量

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 μ 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 μ Elution plateへの相互作用が弱い/強

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、Oasis HLB μ 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し、最適条件を得た。

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。

E . 結論

- 1 . ペプチドミクス解析で見いだされた MCI や AD に移行するタイミングで変動するバイオマーカーペプチドについて、非標識 LC-MS (MALDI) 法ならびに iTRAQ 標識 LC-MS (MALDI, ESI) 法の異なる定量方法でその再現性を確認した。
- 2 . そのうち、prothrombin, neurexin, protocadherin などシナプス障害に関わる因子と complement など炎症 (Ab オリゴマー排除) に関わる因子について、多施設血清サンプルを用いた横断研究の結果と時経列縦断研究の結果が一致した。
- 3 . Focused proteomics 解析により、認知症発症リスク要因とリスク抵抗要因に関わる生体分子として、アポリオタンパク質 A1, トランスサイレチン, 補体タンパク質 C3 を同定した。これらのタンパク質は健常老化においてもその量が低下するものもあるが、知的健常から MCI, AD へと至った者で顕著に低下した。
- 4 . これらの3つのタンパク質の組み合わせで多重ロジスティクス解析による判別分析で、AD vs. 知的健常において感度 92%, 特異度 70%を、MCI vs. 知的健常において感度 90%, 特異度 50%を得た。これに MMSE を加えるとそれぞれ特

異度が 96%, 85%となった。

5 . 無作為に選んだ対象者で本検査を実施、その後確定診断を行った前向き研究で判定した結果、感度と特異度とも約 70%であった。MMSE を加えるとほぼ 95%以上の精度で判定でき、MMSE24-30 点の対象者から MCI を見いだすことができ、MCI のスクリーニング検査としての有効性が示された。

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
内田和彦 目野浩二 鈴木秀昭 赤津博康 水上勝義 朝田隆	認知機能障害とアルツハイ マー病の血液バイオマー カー .	Dementia Japan	27	277-288	2013
Sugimoto K, Shiraki K, Takei Y, Ito M, Nobori T, Suzuki H, Dissanayaka SK, Meno K, Asashima M, Uchida K.	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
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

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,	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
---	---	----------------	----	---------	------

Nose M, Kodama C, Ikejima C, Mizukami K, Matsuzaki A, Tanaka S, Yoshimura A, Yasuno F, <u>Asada T.</u>	ApoE4 is not associated with depression when mild cognitive impairment is considered.	Int J Geriatr Psychiatr y.	28	155-163	2013
--	--	-------------------------------------	----	---------	------