

201311003B

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

(H23-認知症-一般-003)

平成23～25年度 総合研究報告書

研究代表者 内田 和彦

平成26(2014)年 4月

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

(H23-認知症-一般-003)

平成23～25年度 総合研究報告書

研究代表者 内田 和彦

平成26(2014)年 4月

目 次

I. 総合研究報告 概要	1
II. 総合研究報告 各論	
1. MCIならびにアルツハイマー病のバイオマーカー候補の多施設解析	23
2. 脳組織、脳脊髄液と血清における新規バイオマーカーの動態ならびに前処理条件、 LC-MS条件の検討	27
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	30
4. LC-MS/MS SRM (MRM)法における定量性の検討	36
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49

I. 総合研究報告書 概要

総合研究報告書

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

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

【目的】本研究は「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。【方法】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。

①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、②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、③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、④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。⑤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に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。

【結果】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定量法の条件を確立した。縦断研究の血清についてオミックス解析が終了した。またサンプル保存条件の影響についての解析の結果、通常の臨床検査で行っている血液収集ならびに血清分離条件で解析ができることが明らかになった。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准段研究サンプルの解析し、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へと至った者で有意に低下した。

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」¹⁴⁾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）。2012年には利根町の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。

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⁾に注目し、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、タンパク質は免疫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、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 for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. in prep.
- 6) Lambert, MP, *et al*. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ₁₋₄₂ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **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

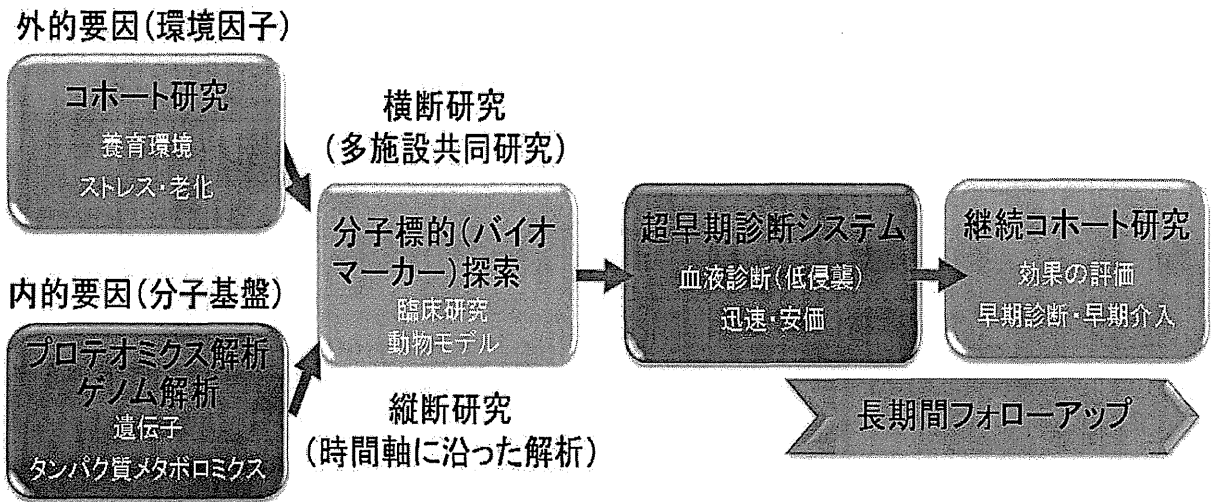


図1

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い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

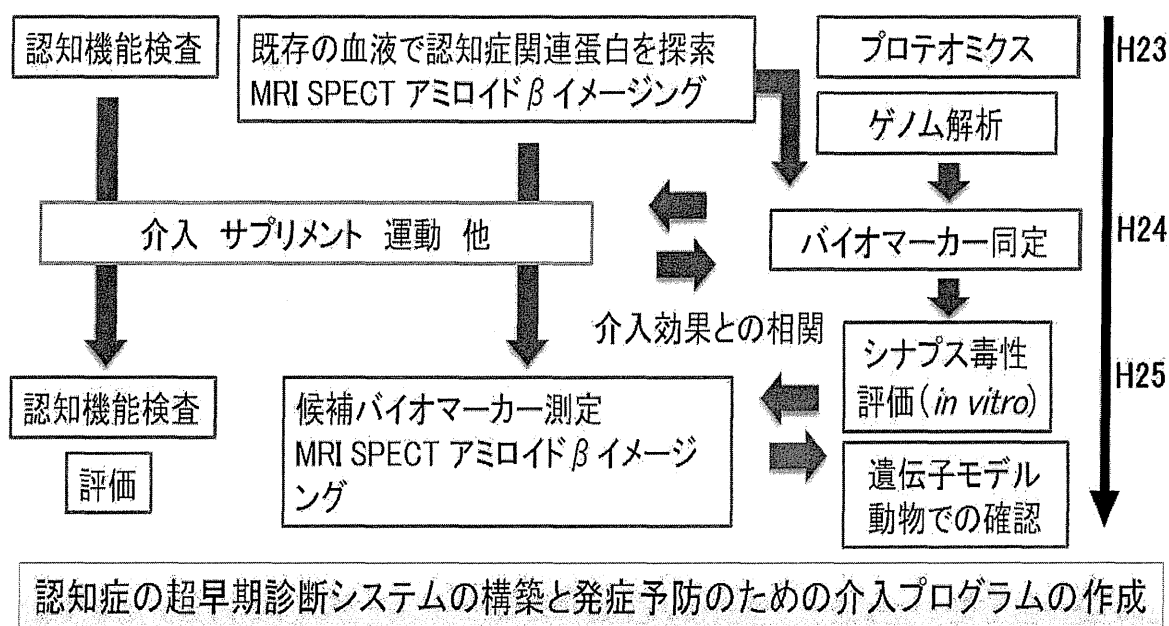


図2

本研究の3年間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。「遺伝子モデル動物での確認」は実施せず、「iPS細胞を用いたバイオマーカーの解析」を行うことに変更した。これは研究分担者の朝田らの研究成果から、アルツハイマー病由来のiPS細胞の樹立が成功し、その解析が可能になったため、よりヒトに近い系での解析を目指す（継続研究中）。

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、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（21種類）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、順次データベース化した。

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、本研究では、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、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行った。

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、他の精神神経疾患 (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。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い。

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・ペプチドの推移と介入効果との関連 (朝田・内田)

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。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 MRM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に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。

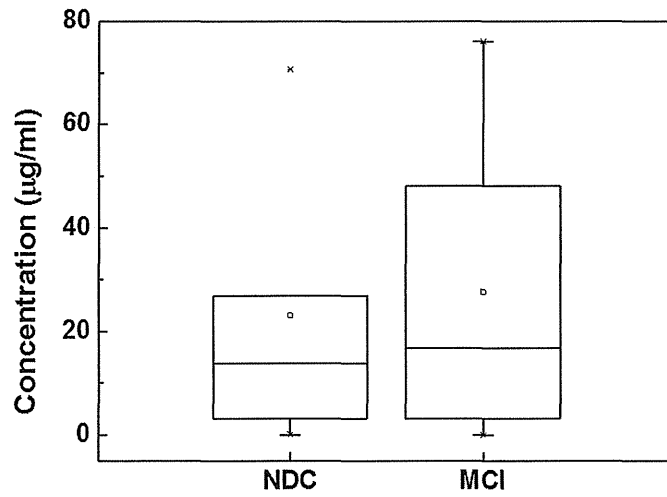
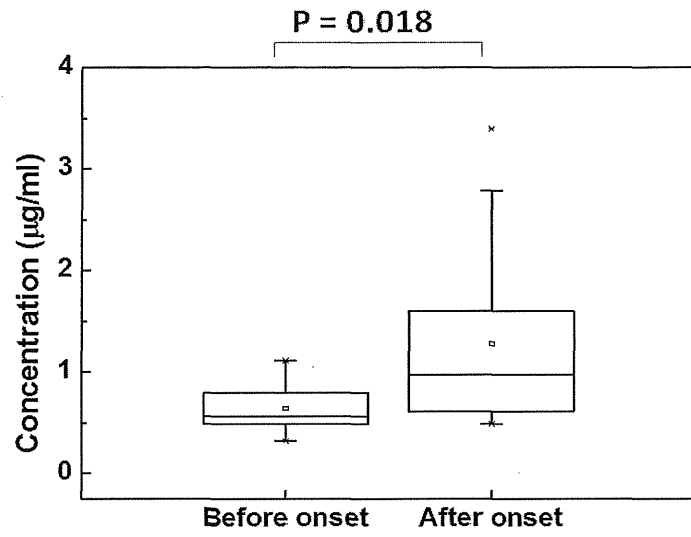


図3 利根町サンプルの横断面でのペプチドマーカ－解析結果

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)

うつを主徴とする大うつ病患者20例のサンプルを得たが、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についても100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。最終年度においてその解析までにいたらなかったが、現在、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ている。

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、①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、②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5施設の多施設サンプルによる横断研究でバイオマーカ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。特に健康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の測定とこれらバイオマーカ（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

- 診断マーカの縦断面（時間軸）における臨床的有用性の解析

ー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AB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
- 4) Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Ema M, Kojima T, Uchida K, Kato M, Miyata T, Takahashi S. Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice. *J. Biochem.*, 152: 549, 2012
- 5) 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, 2012
- 6) 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

(朝田 隆)