

- 7) 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].
- 8) Yasuno F and Asada T. Effect of plasma lipids and APOE genotype on cognitive decline. *Dialogues Clin Neurosci*. 15: 120-6, 2013.
- 9) 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
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.

- 13) 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.
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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

(水上勝義)

- 17) 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.)
- 18) 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.
- 19) 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.

- 20) 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. *Neuropathology*.31: 503, 2011

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
S 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
 - 7) 内田和彦. 認知症の早期診断のための血液バイオマーカー探索. オミックス医療研究会シンポジウム・定期講演会 (招待講演) . 2011年7月7日, 東京
 - 8) Meno K, Suzuki H, Korenaga T, Mizukami K, Asada T, and Uchida K. Peptidomic analysis reveals novel circulating biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. 第34回日本分子生物学会. 2011年12月14日, 横浜
 - 9) Shan L, Yen-Phi HN, Korenaga T, Meno K, Suzuki H, Mizukami K, Asada T, and Uchida K. Longitudinal analysis of inflammatory component levels in sera from mild cognitive impairment and Alzheimer disease. 第34回日本分子生物学会. 2011年12月13日, 横浜
 - 10) Korenaga T, Meno K, Suzuki H, Sugimoto K, Shiraki K, and Uchida K. Peptidomic and immunological analyses reveal novel circulating biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease. 第34回日本分子生物学会. 2011年12月13日, 横浜
 - 11) 杉本和史、山本憲彦、白木克哉、竹井謙之、熊田卓、内田和彦. Pooled Sampleを用いた血清中のNASHバイオマーカーペプチドのiTRAQによる同定. 第47回日本肝臓学会総会 (ワークショップ) . 2011年6月2日, 東京
 - 12) 為田雅彦、杉本和史、白木克哉、山本憲彦、竹井謙之、内田和彦. 二次元電気泳動と多段階質量分析を利用した新規HCV関連肝疾患進展マーカーの検出. 第47回日本肝臓学会総会. 2011年6月2日, 東京

- 13) 白木克哉、杉本和史、熊田卓、内田和彦、網羅的プロテオミクスによる膵癌のバイオマーカーの探索. 第97回日本消化器病学会総会 (ワークショップ) . 2011年5月15日, 東京

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. 総合研究報告書 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た。

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った。

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%)

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、本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。

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

脳組織由来ペプチドの親タンパク質のアミノ酸配列上もマッピングについてその再現性を確認した。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病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

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昨年度と同様に行った。これらの新規マーカーについて、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を用いて解析した結果から、シナプスの傷害の結果、タンパク質の分解が促進されたという仮説は正当性があるように思われる。

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から、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たと考えられる。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との関連があると考ええる。今後アルツハイマー病患者由来のiPS細胞を用いて、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と健常人の神経細胞との違いについて、本細胞のプロテオミクス・ペプチドミクス解析を行うことで明らかになると考えられる。

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

本研究では、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®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 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%)

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に結果を示す。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)。

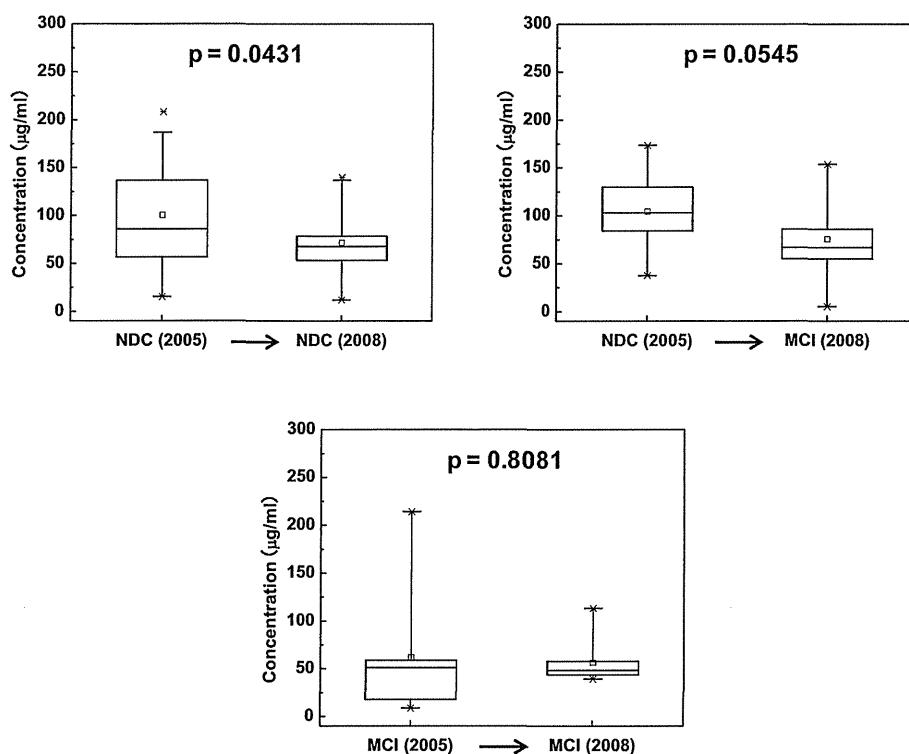


図10 タンパク質Cの変化

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。

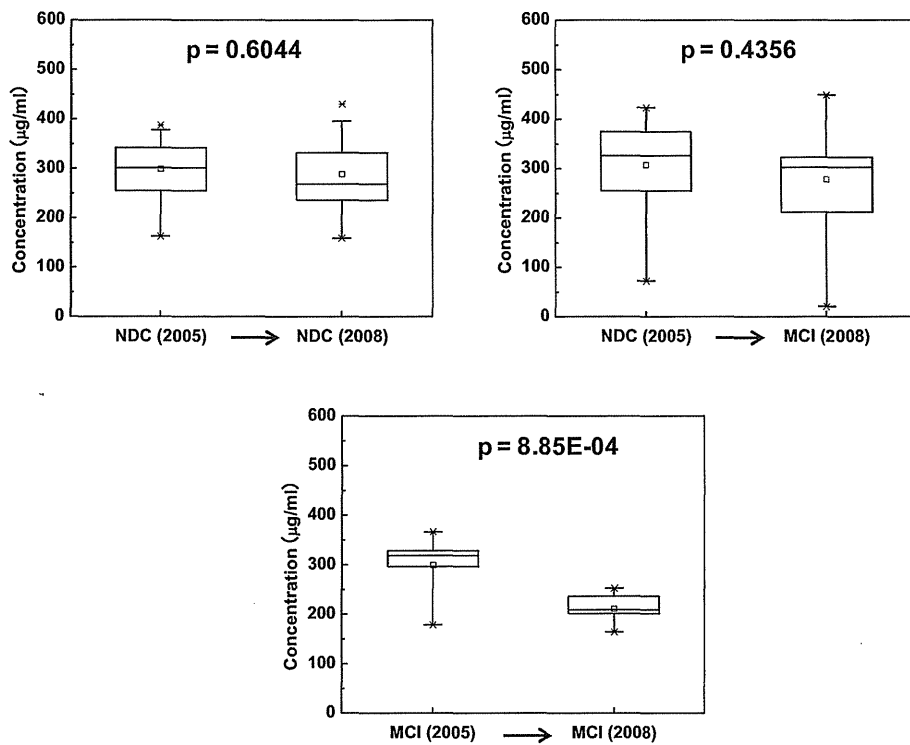


図1 1 タンパク質Dの変化

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 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。

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