

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）

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。

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」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）。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、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 Abeta1-42 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

外的要因(環境因子)

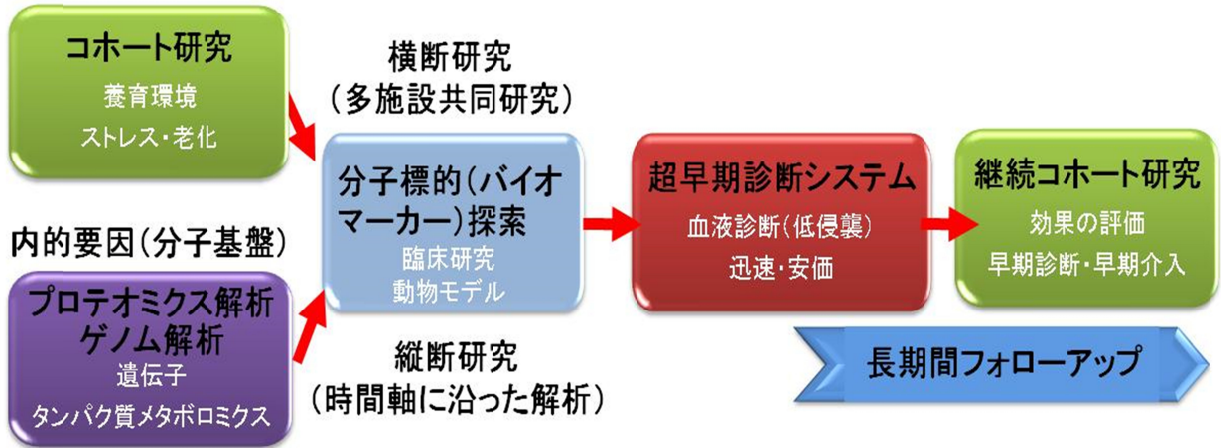


図 1

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

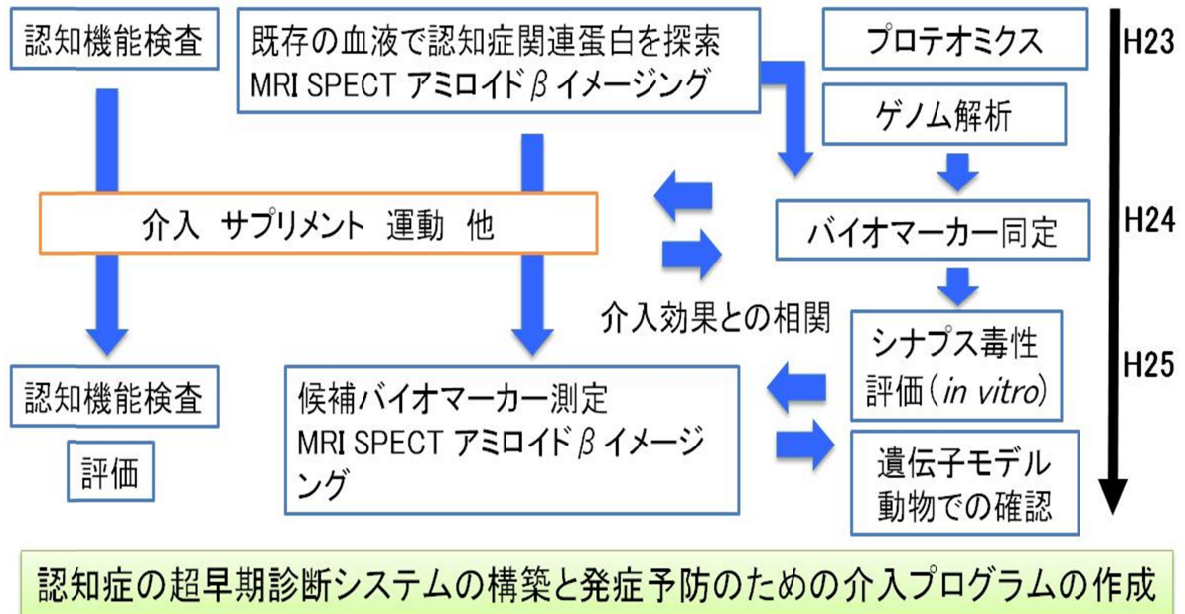


図2

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（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、脳血管閉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。

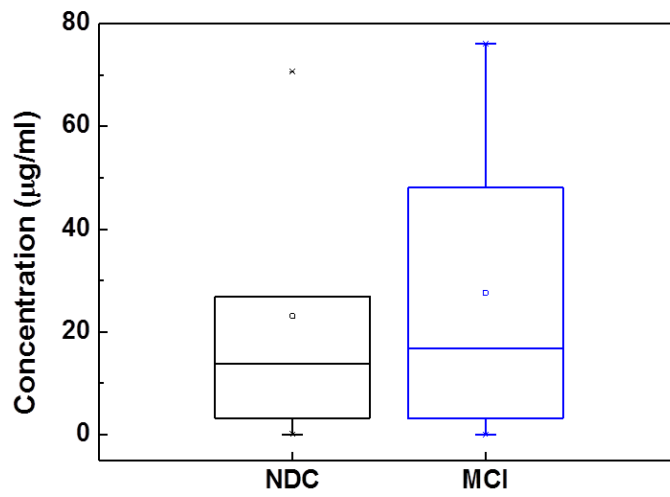
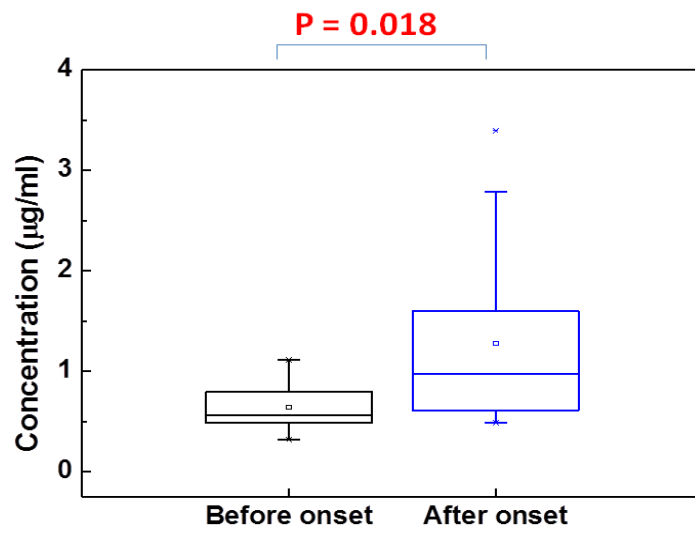


図3 利根町サンプルの横断面でのペプチドマーカー解析結果

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、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

- 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遺伝子型を保持しながら、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) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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)

- 6) 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].

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

- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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)

- 16) 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.)
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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っ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）

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 µl相当

血漿・血清

25 µl

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することを試みた。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、脳血管関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。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ことで明らかになると考えられる。

前処理条件、LC-MS条件の検討

A．研究目的

本研究では、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について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4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 μ l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。

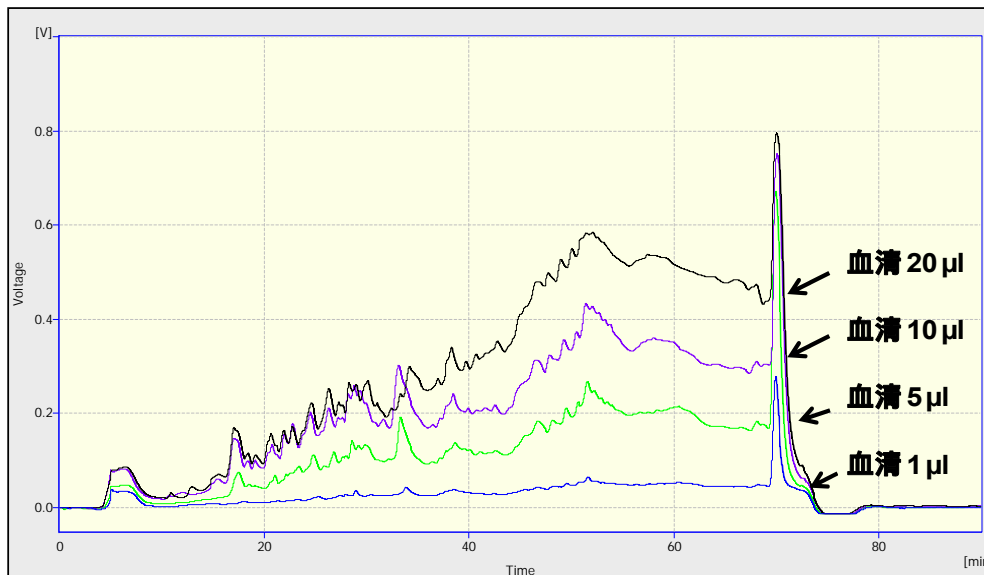


図4 血清由来ペプチドの nanoLC MALDI TOF MS/MS におけるクロマトグラム

図5 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 μ l、1 μ l、2 μ l、4 μ l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。

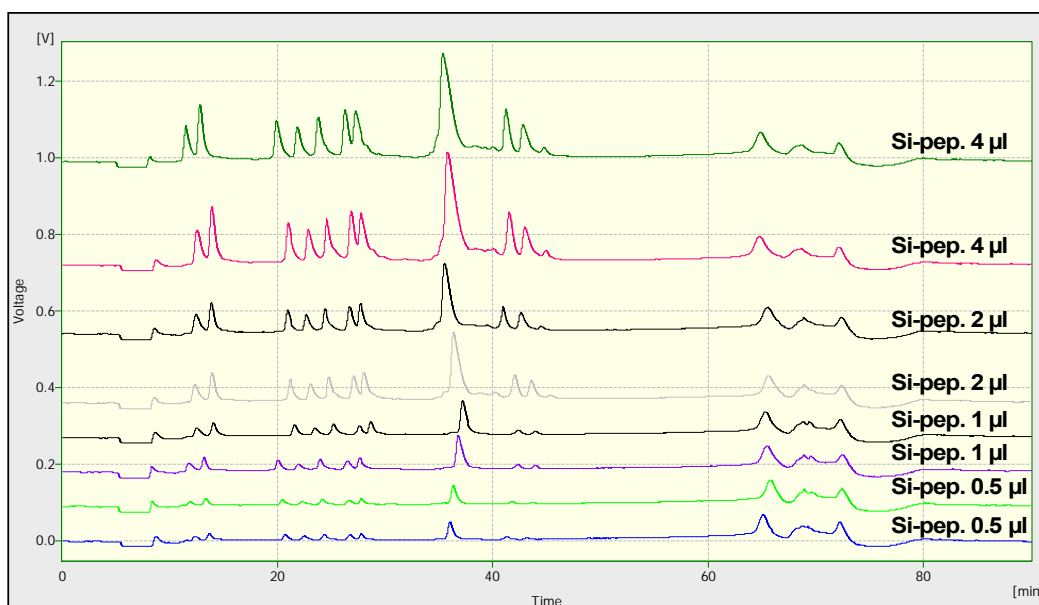


図5 13種の安定同位体ペプチドのnanoLC MALDI TOF MSにおけるnanoLCクロマトグラム
Si-pep.: 安定同位体ペプチド混合溶液

図6 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。

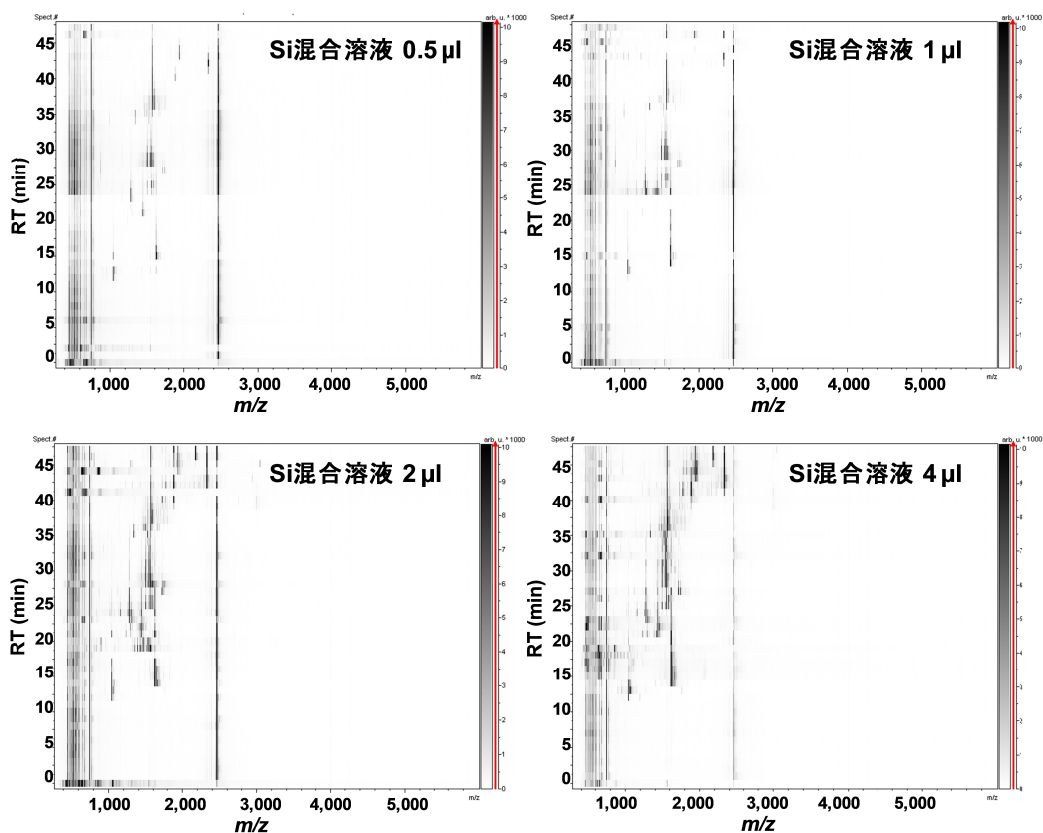


図6 13種の安定同位体ペプチドのMSゲルビュー
 横軸: m/z , 縦軸: 溶出時間 (RT, min), 濃淡: ペプチドピーク強度

図7 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。

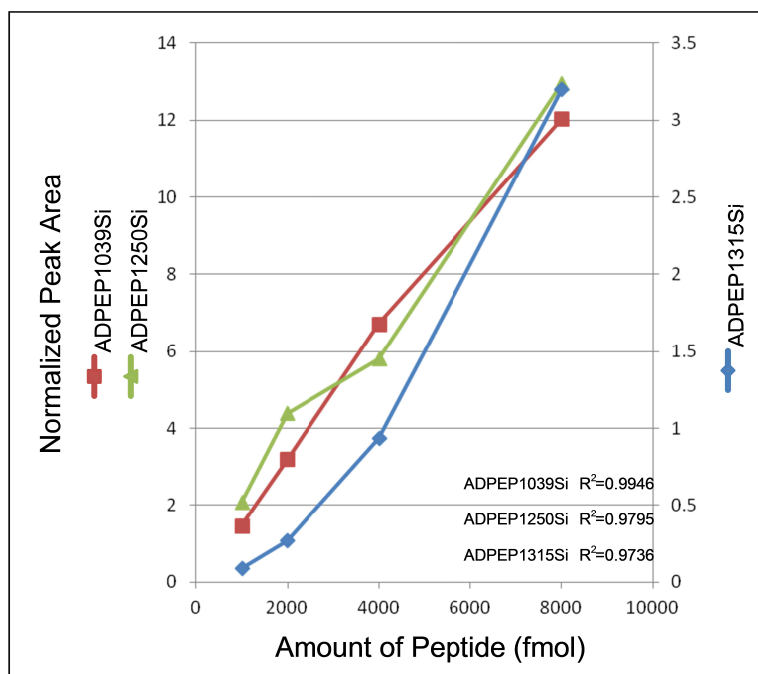


図7 バイオマーカー安定同位体ペプチドの定量性

図8 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。

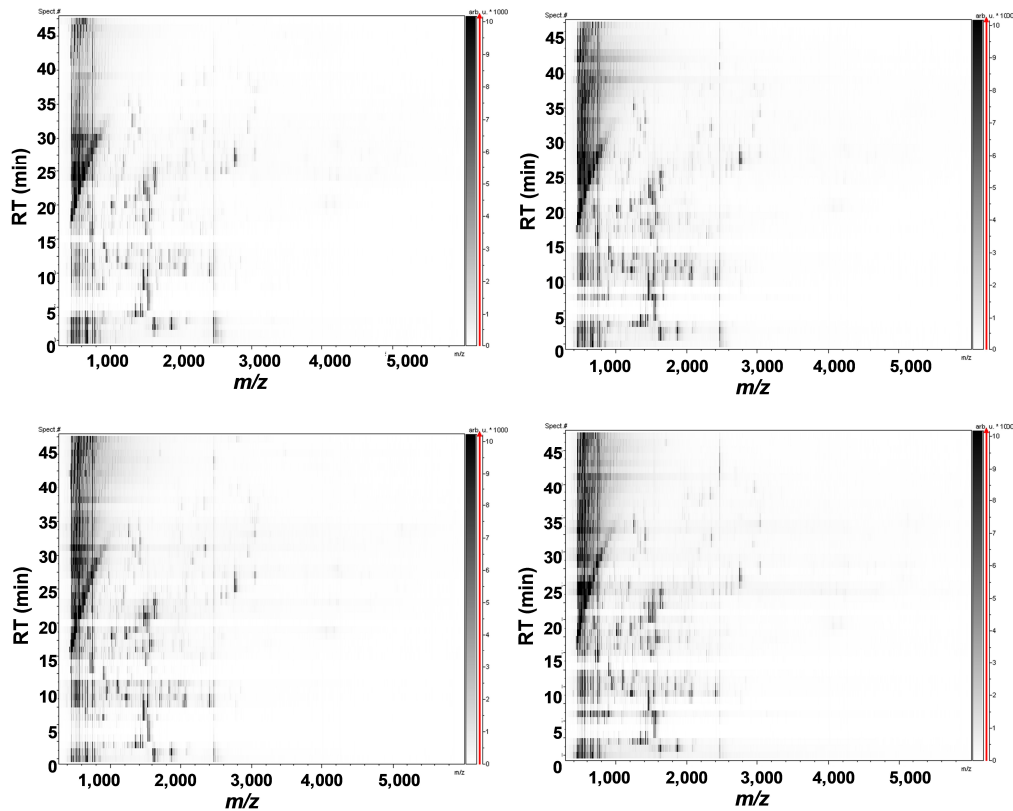


図9 同一血清由来ペプチドのMSゲルビュー
 横軸： m/z , 縦軸：溶出時間 (RT, min), 濃淡：ペプチドピーク強度

図9は図8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。

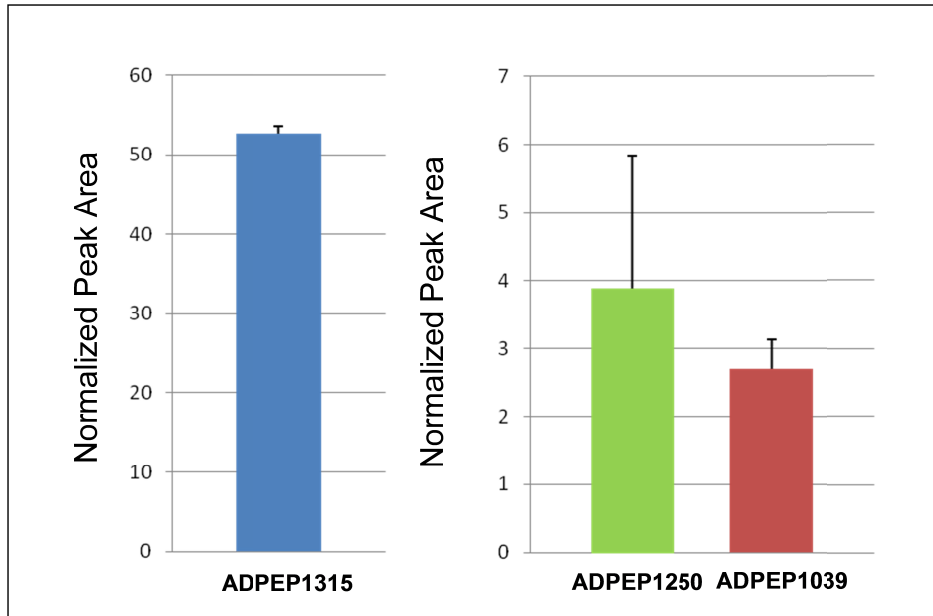


図9 血清由来バイオマーカーペプチドの定量性
 図8で示した同一血清の4回繰り返し測定で得られたバイオマーカーペプチドの定量値の平均値とSDをプロットしている。

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

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 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%)

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 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)。

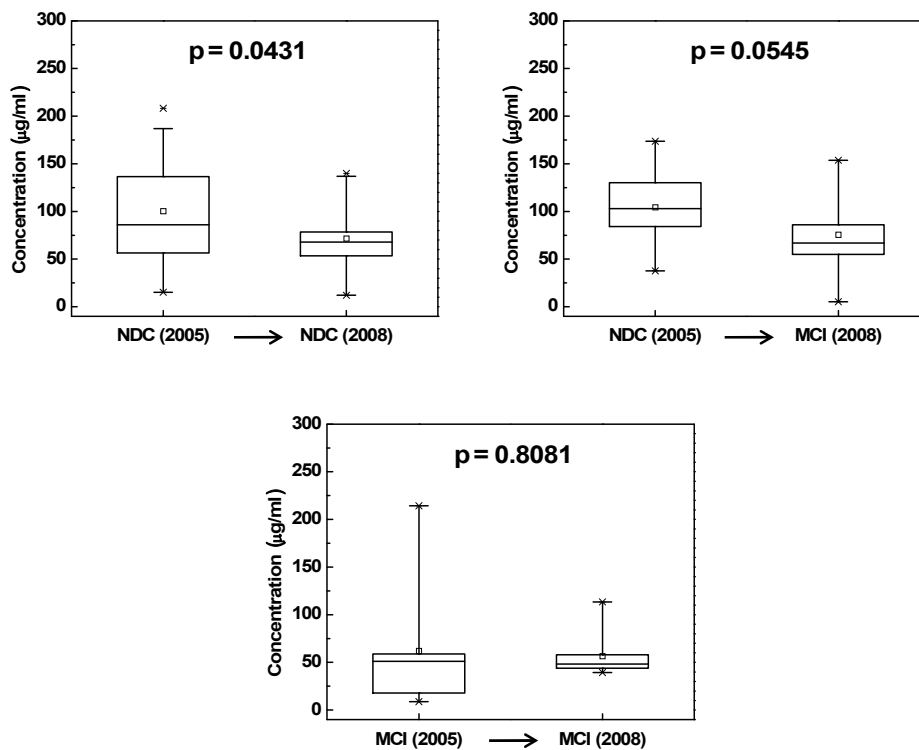


図 1 0 タンパク質Cの変化

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。

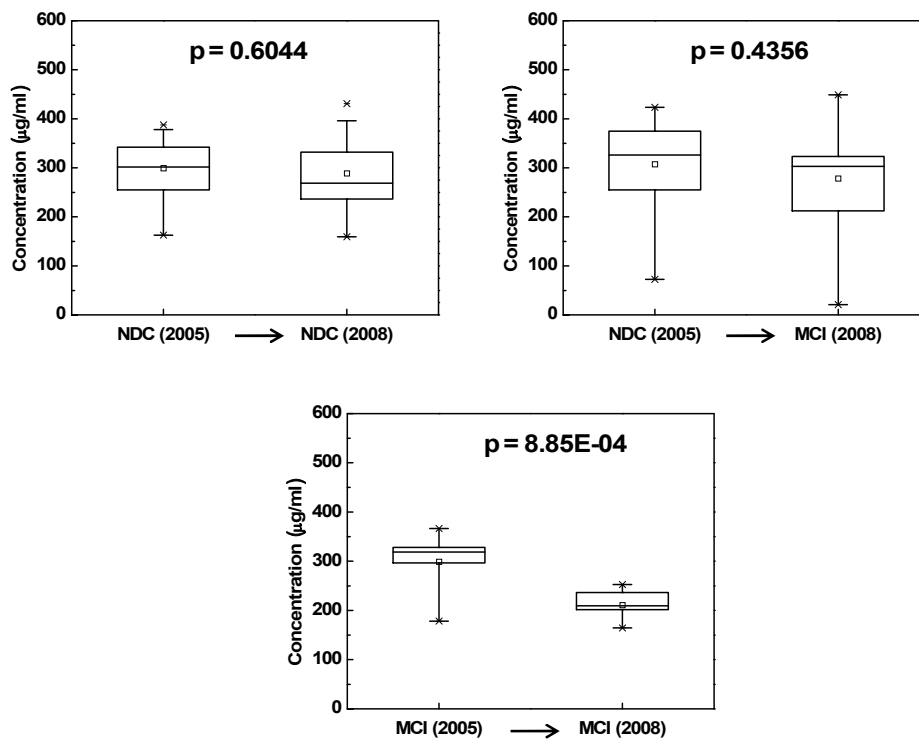


図 1 1 タンパク質Dの変化

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 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 ~ 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、ブリーサーイオンではなく、フラグメントイオンで行う。

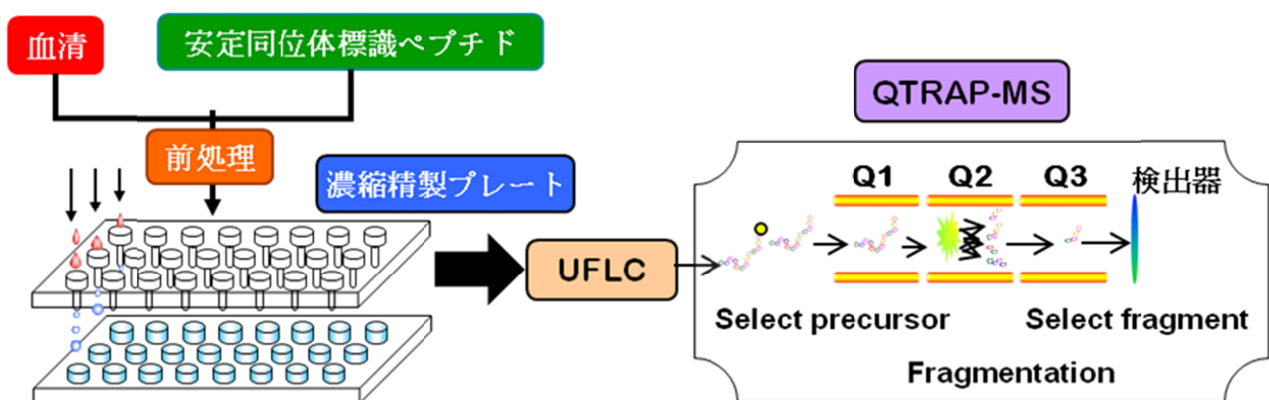


図12 LC-MS/MS SRM (MRM)法の原理

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。

MRMトランジッション作成

図 1 3 にMRMトランジッ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 1 3 MRMトランジッションのパラメータ

MRMトランジッ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。表 6 に13種のバイオマーカーペプチドのMRMトランジッションを示す。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。

表6 バイオマーカーペプチドのMRMトランジション

	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

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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 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する必要がある。

表7 Oasis HLB μ Elution での前処理

	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

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14（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/ μ 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/ μ lから40 fmol/ μ lの標準血清を作成した。これらに終濃度が4 fmol/ μ 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16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。

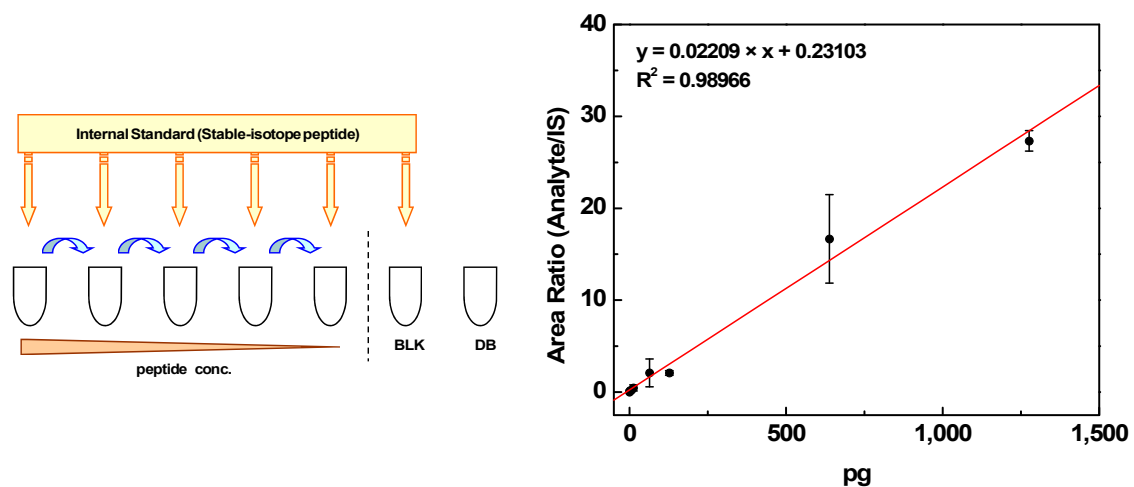


図14 外部標準法で用いる標準サンプルの調製(左図)、ADPEP1039の検量線(右図)

(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

表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。

表 8 6種のバイオマーカーの検出限界と定量下限値

	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

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回繰り返し測定した。1回あたりのMRMアッセイは20分で測定した。表 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度が悪い。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。

表9 6種のバイオマーカーの再現性（溶出時間、面積値）

	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

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15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。

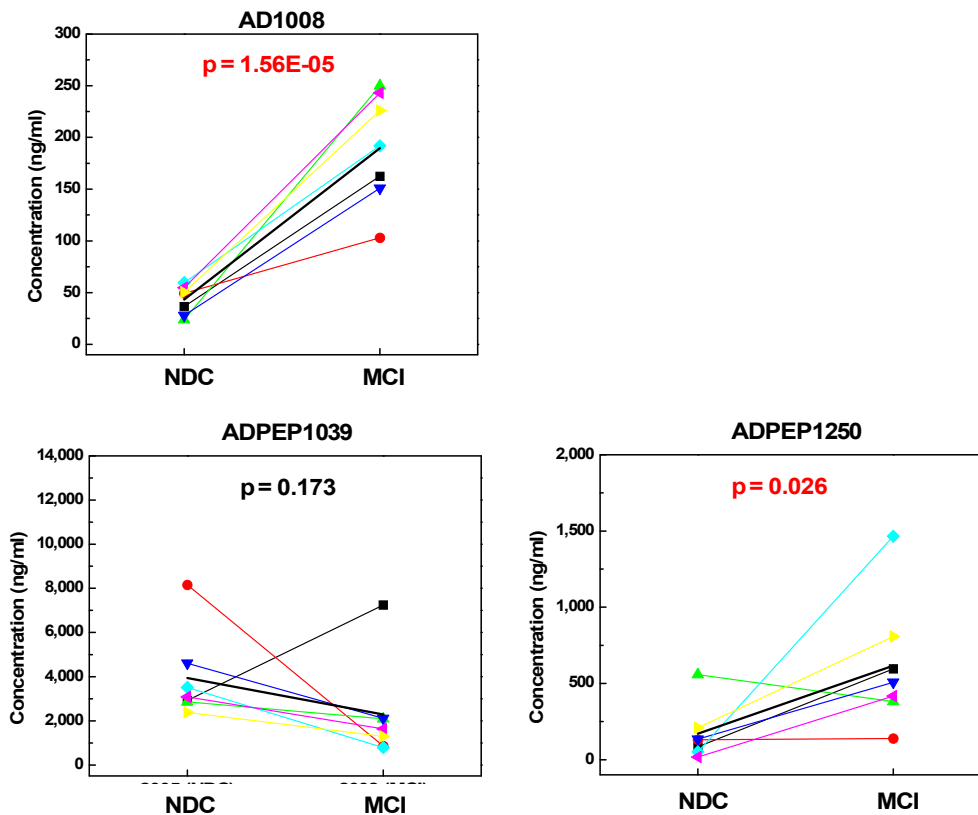


図 1 5 「 利根町縦断研究サンプルを用いた定量
 上段：補体タンパク質由来ペプチド (AD1008), 下段：血液凝固系タン
 パク質由来ペプチド ADPEP1039 (下段左), ADPEP1250 (下段右)

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 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たものの、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、3つのタンパク質を同定した。これらのタンパク質は健常の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回帰解析による判別分析 (以下本検査) 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。