

J-ADNI2プレクリニカルAD研究：バイオマーカー・遺伝子検査（生化学コア）

分担研究者

池内 健 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野 教授
桑野良三 新潟大学脳研究所フェロー

研究要旨

米国ADNI研究や種々の縦断的臨床研究により、発症に先んじたアルツハイマー病の臨床バイオマーカーの挙動が検討されている。これらの研究により「アルツハイマー病（AD）の病理学的特徴であるアミロイド蓄積は認めるが認知機能は正常な時期」が15年程度存在することが明らかにされ、その病期を“プレクリニカルAD（preclinical AD）”と呼ぶことが提唱された。J-ADNI2ではプロジェクトの一部にJ-ADNI1では対象としなかったプレクリニカルADに相当する被検者の組み入れを立案し、プレクリニカルADに相当するアミロイドPET陽性・認知機能正常高齢者およびアミロイド陰性・認知機能正常高齢者を対象としたプレクリニカルADスタディを推進する。J-ADNI2の生化学コアでは、被検者に対し血液・生化学検査、尿検査、脳脊髄液検査、ゲノムDNA解析、末梢血由来RNA解析、リンパ芽球セルライン作製を実施する。脳脊髄液検査はJ-ADNI1では必須検査ではなかったが、J-ADNI2では全例に腰椎穿刺を行い脳脊髄液の採取および新規の解析項目として末梢血由来のRNAの採取を行い、プレクリニカルADにおける網羅的な遺伝子発現解析を追加実施する。生体試料のロジスティックはJ-ADNIから継続した体制を維持し、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センターにおいて生体試料の管理・維持を適切に行う体制を整えた。

A.研究目的

J-ADNI2プレクリニカルAD研究は認知機能正常者を対象とし、スクリーニング検査によりアミロイドPET陽性の「プレクリニカルAD」150人と、陰性の「アミロイド陰性対照者」150人を選定しエントリーする。本研究では、これらの被検者から血液生化学検査、尿検査、脳脊髄液検査、ゲノムDNA検査、末梢血RNA検査およびリンパ芽球セルライン化を行い、プレクリニカルADにおけるバイオマーカーの変化および遺伝学的要因を明らかにする仕組みを構築することを目的とする。

B.研究方法

プロトコルの策定

J-ADNI2プレクリニカルAD研究では、PET検査による判定の後、エントリー基準に従い組み入れを行い3年間のフォローを実施する。血液検査、尿検査、脳脊髄液検査、ゲノムDNA検査、末梢血RNA検査およびリンパ芽球セルライン化の採取およびロジスティックに必要なプロトコルを設定

した。

手順書および生体試料採取資材の準備

プロトコルに従い各臨床施設で生体試料の採取が適切に実施できるように生化学コア内で検討し、適宜臨床コアおよびデータセンターとも連携しながら手順書を作成した。生体試料の資材作製について、検査委託先であるSRLと打ち合わせを行った。さらに、試料の採取、輸送、測定および生体試料保管施設への移送が適切に行えるようにSRLと調整を行った。

生体試料の保管・管理体制の整備

被検者数およびビジット数を算定し、採取する生体試料ののべ検体数を推定した。さらに、血清、血漿、ゲノムDNA、RNA、不死化細胞株などの分注に必要なチューブ数を概算し、生体試料の保存に必要な設備を整備した。

(倫理面への配慮)

J-ADNI2プロジェクトの倫理審査については、主任研究者の機関(東京大学)において臨床倫理および遺伝子倫理について承認を得た。また、生化学検査および遺伝子解析の実施機関である新潟大学においても臨床倫理および遺伝子倫理の承認を受けた。各臨床サイトにおいては準備が整った施設から順次、倫理委員会の承認を受けている。研究参加者からは研究についての説明を行った後に、インフォームドコンセントを書面で得る。J-ADNI2で得られた生体試料の管理・解析では匿名化された番号を用いる。

C. 研究結果

プロトコルの策定

J-ADNI2プレクリニカルAD研究では、PET検査による判定の後、エントリー基準に従い組み入れを行い3年間のフォローを実施する。血液検査は、スクリーニング、ベースライン、12ヶ月、24ヶ月、36ヶ月に実施する。脳脊髄液検査はベースライン、12ヶ月、36ヶ月で実施する。ゲノムDNA採取および不死化細胞株作製のための採血はベースラインに実施する。末梢血RNAの採取はベースライン、12ヶ月、24ヶ月、36ヶ月に実施する。サンプルの回収およびロジスティックはSRL・メディサーチ社に委託する。

血液生化学および脳脊髄液の検査項目については、J-ADNI1と同様に実施する。血液生化学および尿検査はSRLに測定を委託する。脳脊髄液を用いたバイオマーカー解析はLuminex technologyによるA β 42、総タウ、リン酸化タウの測定を新潟大学において実施する。US-ADNI生化学コア(ペンシルバニア大学Shaw教授)、Innogenetics社(Vandijck博士)と共同して髄液マーカーの測定に関する比較検討を実施し、標準化した統一プロトコルを作成した。ゲノムDNA解析については、APOE多型および公開データベース(ALZGene)に登録されている遺伝子のタイピングを実施する。必要に応じて新規一塩基置換(SNP)による網羅的解析(GWAS)または次世代シーケンサーを用いた全ゲノム網羅的遺伝子配列解析を行う体制を整えた。

J-ADNI2研究では末梢血RNAの採取項目を新たに設定した。末梢血RNA採取に用いる採血管はPAXgene RNA用採血管を用いることとした。

PAXgene RNA用採血管を用い末梢血からRNAを抽出し、RNA品質の検証およびリアルタイムPCRを予備実験として実施した。その結果、RNAの良好な品質(RIN平均9.6, n=43)およびRNA発現解析結果を得ることができた。

手順書および生体試料採取資材の準備

プロトコルの従い各臨床施設で適切に生体試料の採取が行えるように手順書を作成した。生体試料採取がスムーズに実施されるように被検者毎に1ピジット - 1パッケージとなるように資材を作製した。

生体試料の保管・管理体制の整備

J-ADNI2プレクリニカル研究で採取された生体試料を保管・管理する体制を整えた。不死化細胞株の一部は、バックアップとして東京大学神経内科学教室にも保管する。

考察・結論

プレクリニカルADを対象とした縦断的観察研究における生化学検査および遺伝子解析のプロトコルを策定し手順書を作成し、実施準備を整えた。今後被験者のスクリーニング・組み入れを進め、プロトコルに従い生化学コアの活動を実施していく。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Wen Y, Miyashita A, Kitamura N, Tsukie T, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamaguchi H, Akazawa K, Ihara Y, Kuwano R; and Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. SORL1 is genetically associated with neuropathologically characterized late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 35:387-394. (2013)

2. 学会発表

1) Vandijck M, Kuwano R, Waligorska T, Smet

SD, Tsukie T, Verdoodt L, Deleersnijder W, Trojanowski J, Iwatsubo T, Shaw L
Interlaboratory Variation When Using a Unified Test Procedure for INNO-BIA AlzBio3. AAIC, Boston 2013

2) 月江珠緒, 菊地正隆, 中谷明弘, 宮下哲典, 池内健, 桑野良三, 岩坪威, J-ADNI .アルツハイマー病における体液中バイオマーカーの解析; J-ADNI研究 .第32回日本認知症学会学術集会 2013年11月8日 松本

3) J-ADNIにおける生化学・遺伝学マーカーの評

価. 桑野良三 . 第32回日本認知症学会学術集会
2013年11月8日 松本

F.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし