

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
(総合)研究報告書

JALPAC 研究における生体試料リソース構築に関する研究

池内 健¹⁾

1) 新潟大学 脳研究所 生命科学リソース研究センター

研究要旨

神経変性疾患における有用なバイオマーカー開発の重要性が増している。病理背景をふまえた神経変性疾患の病型診断に加え，神経症状および認知機能障害が出現する前の段階での早期診断，将来の発症予測，病態修飾薬の効果判定項目など，その応用範囲が拡大している。探索的研究による新規バイオマーカーの成果は多数論文報告がされている一方で，臨床現場で実用化に結びついた神経変性疾患のバイオマーカーは極めて少ない。新規バイオマーカー探索に求められる技術と実用化にむけたフェーズで求められる要素は大きく異なっており，このギャップを埋める努力が必要である。そのためには，神経変性疾患で行われている種々の多施設共同研究における脳脊髄液および血液サンプルの取り扱いについての標準化が求められる。本研究では，JALPAC（Japanese Longitudinal Biomarker Study of PSP and CBD）研究における生体試料構築に関する現状を報告し，神経変性疾患におけるバイオマーカー開発と実用化に向けた取り組みを考察する。

A.研究目的

神経変性疾患におけるバイオマーカー開発と実用化に向けて必要な事項を明らかにすることを目的に，JALPAC（Japanese Longitudinal Biomarker Study of PSP and CBD）研究における生体試料リソースの構築について検討した。

B.研究方法

(倫理面への配慮)

JALPAC 研究は新潟大学および実施関連施設での倫理委員会の承認を得た上で実施している。

JALPAC 研究参加施設は以下の通りである。北海道大学，東北大学，自治医科大学，老年病研究所，群馬大学，順天堂大学越谷病院，千葉東病院，千葉大学，都立神経病院，精神・神経医療研究センター，順天堂大学，東京都健康長寿医療センター，東京大学，東京医科歯科大学，東邦大学大森病院，相模原病院，山梨大学，富士見高原病院，新潟大学，新潟病院，東名古屋大学，愛知医科大学，名古屋大学，三重大学，三重病院，京都府立医科大学，大阪大学，兵庫中央病院，神戸大学，岡山大学，岡山旭東病院，鳥取大学，三朝温泉病院，松江医療センター，ピハール花の里病院，倉敷平成病院，岡山旭病院，徳島大学，高知大学，福岡大学，産業医科大学。

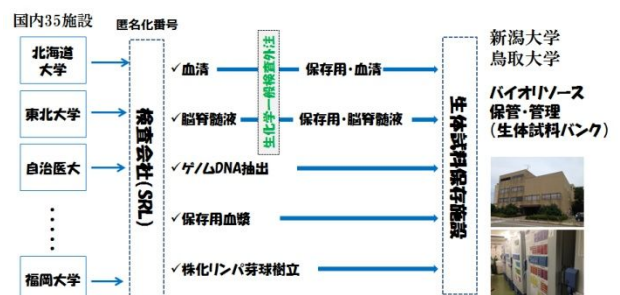
C.研究結果

JALPAC 研究は進行性核上性麻痺，大脳皮質基底核変性症を中心としたパーキンソン症候群を対象にした全国 41 臨床施設が参加する縦断的

コホート研究である。JALPAC 研究は，患者レジストリ，生体試料の収集を介したバイオマーカー開発を 2 本柱として進められている。

ゲノム DNA，血漿，血清，脳脊髄液，リンパ芽球セルラインを生体試料として同意が得られた被験者から採取する。統一したプロトコルで生体試料を収集するために，血液，脳脊髄液を採取する採血管などを組み入れた資材を作成し，予め各施設に配付した。指定された資材を用い検体採取を行い，採取された検体は民間の検査会社（SRL）を介して同じロジスティックを利用して収集される。収集された検体は生体試料リソースとして新潟大学と鳥取大学の生体試料バンクで品質を担保しながら保管を行い，バイオマーカー開発に役立つように活用する（図 1）。

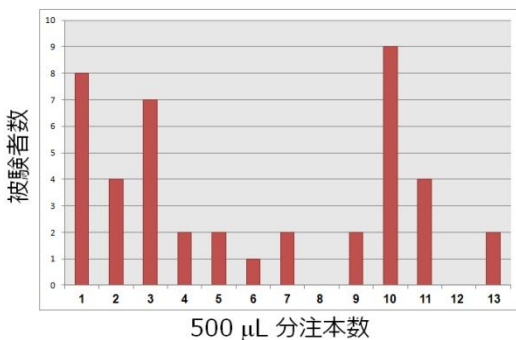
図 1. JALPAC 研究における生体試料収集



現在までに JALPAC 研究では 149 例の組み入れが進んでいる。生体試料は、ゲノム DNA 136 例 (91%)、血漿 138 例 (93%)、血清 146 例 (98%)、リンパ芽球セルライン 136 例 (91%)、脳脊髄液 111 例 (79%) と高い収集率が得られている。進行性核上性麻痺を対象に davnetide を用いた国際臨床治験 (NCT01110720) における脳脊髄液・採取率が 16% (48/304) であることを考えると、JALPAC 研究の脳脊髄液の採取率は高い値と思われる。一方で、採取された脳脊髄液量が十分ではないケースが少なくないという問題点があり、今後の課題と考えられた (図 2)。

脳脊髄液バイオマーカーとして Luminex xMAP テクノロジーによりアミロイドβ42、総タウ、リン酸化タウ、MesoScale Discovery 技術によりアミロイドβ38、β40、β42 測定を実施し、順次解析を進めている。

図 2. JALPAC 研究における脳脊髄液の採取量



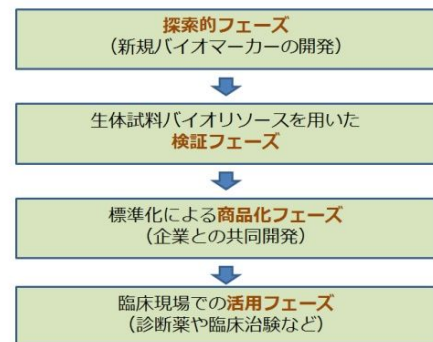
D. 考察

神経変性疾患におけるバイオマーカー開発の意義は幾つか挙げられる。まず背景病理を考慮した臨床診断の補助診断としての役割が考えられる。アルツハイマー病においては脳脊髄液中のアミロイドβ42、総タウ、リン酸化タウ測定によりアルツハイマー病・病理の存在がバイオマーカーから推測可能である。進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症では有用な診断バイオマーカーは確立していない。二つ目の意義としては、早期診断マーカーとしての役割があげられる。神経変性疾患では症状が出現する以前から脳内病理が進行しており、そのような早期の病理変化を反映するバイオマーカーが求められる。三つ目の意義は、病態修飾薬の効果判定に有用なコンパニオンマーカーとしての役割である。Davnetide を用いた進行性核上性麻痺の臨床治験では脳脊髄液・タウとニューロフィラメントが 2 次エンドポイント項目として評価さ

れている (Boxer et al. 2014)。

探索的研究による新規バイオマーカーの同定に関する論文成果は毎年多数発表されているものの、複数のコホートで結果が再現され、臨床現場での実用化にまで結びついたバイオマーカーは極めて少ない。新規バイオマーカー探索に求められる技術と実用化に向けたフェーズで求められる要素は大きく異なっており、このギャ

図 3. バイオマーカーの開発のステップ



ップを埋める努力が求められている (図 3)。

そのために必要な論点は幾つかあるが、ここでは生体試料の取り扱いにおける標準化と生体試料リソース構築について考えてみたい。マーカー測定の再現性に影響を与える因子として採血の時間、食事の影響、採血針の種類、採血の順番、遠心の条件などが挙げられる。各施設ではそれぞれのプロトコルに従ってサンプル採取が行われているのが現状であろう。神経変性疾患を対象とした欧米での主要な多施設共同臨床研究でも検体の取り扱いについては種々の異なるプロトコルが用いられており、国際的にも問題になっている。欧米では最近、認知症の臨床研究における血液サンプルの取り扱いについてのガイドラインが発表された (表 1)。本研究班においても幾つかのコホート研究において生体試料の収集が進行中、あるいは予定されており、可能な範囲で標準化を進めていくことが望まれる。

表1. バイオマーカー標準化に向けた血液サンプル取り扱いガイドライン

(O'Bryant SE et al. *Alzheimers Dement* 2016 から一部改変)

1. 空腹時採血を推奨（空腹状態の時間を記載）
2. 採血針 21 ゲージ針が望ましい（19～23 ゲージ針を使用）
3. 採血管の順序（不要な採血管は削除）
 - a. 血液培養, b. 凝固検査, c. 血清, d. ヘパリン添加, e. EDTA 添加
 - f. 解糖阻害剤添加, g. PAXgene RNA 採血管
4. 処理
 - a. 採血後2時間以内に凍結などの処理を完了
 - b. 血清・血漿分離は採血後できるだけ早く実施（2時間以内を推奨）
 - c. 血清用採血管は採血後、室温で30～60分垂直方向に立て静置後に遠心
 - d. 血漿用採血管は採血後5～10回ゆっくりと転倒混和
 - e. 遠心条件（RCF）は回転数（rpm）でなく重力（g）で手順書や論文に記載
 - f. 最初の遠心は2,000g 10分で行う
 - g. 分注はポリプロピレン製のチップを用いポリプロピレン製のチューブ（スクリーナー蓋が望ましい）に分注
5. 保存
 - a. 長期保存は-80℃もしくは液体窒素で行う。ドライアイスを用いた輸送の場合、測定前にチューブの気層を換気するか融解の前に-80℃（もしくは-70℃）フリーザーに一次的に保存する
 - b. 小分け分注（通常 0.5mL 以下）で保存することを推奨。不必要な融解・凍結は避ける

神経変性疾患の病態修飾薬の開発が視野に入るに従い、患者由来の生体試料リソースを研究基盤として構築する重要性が認識されている。脳脊髄液、血漿、血清、ゲノムDNA、リンパ芽球セルライン、RNAなどが生体試料に含まれる。特にタンパク、二次代謝物、RNAは生体内から取り出されると、その保存状態によりプロファイルを大きく変える可能性がある。それ故、神経変性疾患のバイオマーカー開発には、多施設において同じ手順で採取され品質が担保された生体試料リソースの構築が重要になる。

JALPAC 研究では生体試料の採取、輸送、保存についてのワークフローを取り決め、品質を担保した生体試料の収集に努めている。被験者の善意に基づいて提供いただいた生体試料であり、その成果を実用化に結びつけ臨床の現場に還元することを一義的に考えるべきであろう。そのためには有限な生体試料リソースを研究者の間で効率的に活用できるシステム作りが求められる。

E. 結論

神経変性疾患のバイオマーカーの実用化は診療の向上、病態解明・治療法の開発研究に大きく寄与する。生体試料の採取、輸送、保存、分注に関する取り扱いの標準化と品質を担保した生体試料リソースの構築を JALPAC 研究を通して今後も推進していく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1. 論文発表

Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Tanaka H, Shimizu H, Miura T, Aoki K, Aikawa A, Ishizawa S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. *Brain Pathology* 26:82-94, 2016

Yokoyama Y, Toyoshima Y, Shiga A, Tada M, Hasegawa K, Kitamura H, Ikeuchi T, Someya T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Pathological and clinical spectrum of a four-repeat tauopathy, progressive supranuclear palsy with special reference to astrocytic tau pathology. *Brain Pathology* 26: 155-166, 2016

2. 学会発表

三浦 健, 青木賢樹, 高嶋修太郎, 真野篤, 堅田慎一, 目崎直実, 石黒敬信, 石黒舞乃, 畠野雄也, 相川あかね, 石澤伸, 竹内亮子, 田中英智, 豊島靖子, 春日健作, 三瓶一弘, 柿田明美, 高橋 均, 池内 健, 西澤正豊. Globular glial tauopathy の臨床的特徴. 自験例 2 例と既報例の比較. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016.5.21. 神戸市

村山繁雄, 中野雄太, 藤ヶ崎 純子, 初田裕幸, 伊藤義彰, 池内 健, 長谷川成人, 齊藤 祐子. Globular glial tauopathy の分子病理. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016.5.21. 神戸市

田中英智, 豊島靖子, 三浦健, 池内健, 高橋均, 柿田明美. Globular glial tauopathy type II: 運動ニューロン徴候と不随意運動を示した一剖検例の臨床病理像 第 57 回日本神経病理学会 2016.6.2. ホテルニューキャッスル(弘前市)

Tokuda T, Ikeuchi T, Takigawa H, Aiba I, Shimohata T, Morita M, Onodera O, Murayama S, Nakashima K. A longitudinal observational study of a cohort of patients with PSP/CBD: the JALPAC project. 20th International Congress of Movement Disorder Society. 2016.6.20. Berlin, Germany

Aiba I, Ikeuchi T, Takigawa H, Shimohata T, Tokuda T, Morita M, Onodera O, Murayama S Kenji Nakashima K. A longitudinal observational study of a cohort of patients with PSP/CBD (the JALPAC project): Progression of milestones by clinical types. CurePSP International Symposium 2016.10.27. New York, USA

H. 知的所有権の取得状況（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