

別紙4

厚生労働科学研究費補助金
(政策科学総合研究事業(臨床研究等ICT基盤構築・人工知能実装研究事業))

分担研究報告書

認知症に関与するマイクロバイーム・バイオマーカー解析 (健常人の健康調査による認知症に関わるバイオマーカー、エピゲノム解析 2)

研究分担者 西平 順
学校法人電子開発学園北海道情報大学・医療情報学部・教授

研究要旨

本年度は、健常人(Healthy)に加え、新たに軽度認知障害(MCI)と認知症患者(AD)の被験者データを追加し、認知症の早期診断法や認知症予防に深く関わるバイオマーカーを発見することを目指した。血中アミロイドβ値は、AD群における蓄積が最も高く、認知症研究の重要なマーカーであることが証明された。また、Healthy群とAD群のエピジェネティック解析において、認知症との関連が強いと考えられる候補メチル化サイトを複数サイト見出した。これは、先に報告しているアミロイドβ蓄積リスクの有無を指標とするSNPとともに、新たに認知症予防の指導や認知症の早期診断ツールへの可能性を示した。

A. 研究目的

認知症の国内患者総数は、人口の高齢化とともに著増しつつある。また、近年高齢化が進むに伴い「軽度認知障害」などの、潜在的な認知症予備軍の数も増大していると予想される。そこで本研究は、認知症の重要なバイオマーカーとして知られている血中アミロイドβを用いて、未病者を含む健常人と軽度認知障害、認知症患者の3集団を比較。さらにゲノムデータ、エピジェネティックデータを取得し、認知症発症と深く関わる新たなバイオマ

ーカーの探索と開発を目指した。

また、これらの情報をデータベースへ集約し、食品・食事との関係を明らかにする事、さらには早期診断法、認知症予防のための機能性食品開発に生かし、認知症発症者数の減少に資することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象者

本事業への参加を希望された21歳から80歳までの未病を含む健康な被験者(以下、Healthy群)734名(2019年

度474名、2020年度260名)と60歳以上かつMMSE (Mini-Mental State Examination) 28点以下の軽度認知障害(以下、MCI群)の被験者78名、さらに北海道脳神経外科病院において認知症と診断された被験者(以下、AD群)70名。

2. 測定項目

参加した被験者から採血を行い血中アミロイドβ(以下、Abeta)の測定に使用した。測定は、島津テクニカルリサーチにおいて質量分析により行なった。

被験者の認知機能の検査は、Healthy群とMCI群の2群に対しMini-Cog®とQESD (Questionnaires for Earlier Stage of Dementia)の2種類の認知機能検査を行い、Mini-Cog検査において0点である場合は、解析除外とした。

糞便メタゲノム解析は、MCI群(77名)とAD群(32名)の2群において糞便を採取し、DNA抽出を行った。次世代シーケンスライブラリ調整は、ThruPLEX試薬を使用。シーケンスは、NovaSeq6000 (Illumina社)を用いリードデータを取得したのち、解析に供した。

エピジェネティックデータは、Healthy・MCI・ADの3群全てのデータを取得した。被験者血液から抽出したDNAを用い、約85万個のヒトCpGサイトを搭載しているIllumina EPIC array®を使用し、遺伝子修飾(メチル化)の測定を行なった。上記のHealthy群、MCI群、AD群の3群についての比較を行い、認知症発症と深く関わる新たなCpGサイトの検出、さらにバイオマーカーの探索を行なった。

各統計解析は、Rパッケージツールを使用し解析を行なった。

C. 研究結果

図1に、60歳以上のHealthy群(平均年齢 66.2 ± 4.0 歳)、MCI群(平均年齢 69.9 ± 4.4 歳)、AD群(平均年齢 77.6 ± 7.9 歳)の血中アミロイドβ(Composite Biomarker 値)のグラフを示した。ここでは、AD群>MCI群>Healthy群の順に、Abetaの蓄積が見られた。それぞれのAbetaの平均値±SDは、AD群 0.70 ± 0.88 、MCI群 -0.130 ± 0.62 、Healthy群 -0.30 ± 0.58 であり、統計的に有意な差が見られた($p < 0.001$)。

Mini-Cog®とQESDの2種類を用い認知機能の検査を行った結果、Mini-Cogの回答には2群間で有意な差は見られなかった。しかしながら、QESDの16設問の中で『記憶に関する設問』に関して、Healthy群とMCI群の間に大きな差が見られた(図2)。

次にMCI群77名、AD群32名から糞便を採取しDNA抽出を行い、糞便メタゲノム解析を行った。図3[A]に示した個人毎の腸内菌叢の系統分類結果では、MCI群と比較してAD群で、被験者の個人間差が大きく見られた。また2群間比較の系統分類結果、特にclass Actinobacteria、class Bacilli や class Clostridia の頻度に有意な違いが見られた(図3[B])。さらに、KEGG Orthologyデータベースを用いて遺伝子機能解析を行なった。図3[C]に示した階層的クラスタリング解析では、クラスター-Aは、MCI>AD、クラスター-Bは、AD>MCIの傾向があり、MCI群とAD群の腸内細菌叢の遺伝子機能に差が示された。

最後に軽度認知障害と関連のあるメチル化探索のため、Healthy(60歳以上)群、MCI群とAD群の3群を用いてエピゲノム解析を行った。EPICアレイ約85万サイトの内、サンプル全体の出現率が低いサイトや性染色体上のサイ

トを除き、約64万メチル化サイトを解析に使用した。Healthy群とMCI群の比較では、有意差($p < 0.05$)が見られた271252サイトのうちlogFC値 ± 0.1 以上は、92サイト(図4[A])。Healthy(60歳以上)群とAD群の比較では、有意差($p < 0.05$)が見られた290375サイトのうち、logFC値 ± 0.1 以上は、320サイト(図4[B])であった。さらに、Healthy(60歳以上)群 $>$ AD群を示す305サイトについて、遺伝子上の分布頻度を図5にまとめた。Bodyに存在するCpGサイトが最も多く、その他転写領域(TSS200, TSS1500)についても15%程度存在した。次に、CpGに関連する遺伝子の機能や局在を知るため Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行いGene ontology別に結果をまとめた(表1)。今回のメチル化サイトにはBP(biological process)に関わる遺伝子群が多く含まれていることが示された。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。本学生命倫理委員会にて倫理的及び科学的妥当性について審査、承認を得た。試験参加は被験者候補本人の自由意思による同意を文書にて取得。同意撤回した場合でも不利な扱いを受けることはないことを十分説明し行った。

D. 考察

認知症は、アミロイド β が線維化し老人斑となり蓄積することが特徴の一つとされ、アミロイド β は、認知症発症に強く関わるタンパク質の一つである。今回、健康な被験者(Healthy群)・軽度認知障害(MCI群)・認知症患者(AD群)の3群間比較の結果、AD群の血中アミロイド β の蓄積が最も高

く、認知症研究の重要なマーカーであることが証明された。また、Mini-Cog[®]とQESDを使用した認知機能検査の結果は、Mini-Cog[®]ではMCI群とAD群に統計的な有意差は認められなかったが、QESD検査の『記憶に関する設問』において、MCI群とHealthy群に有意な差が見られ、プレクリニカル期にも有用であることが示された。これは、急速な高齢化に伴い認知症の早期発見・早期予防が重要である今日、MMSEやMini-Cog[®]の検査のみでは検出が難しい特に「超早期認知症患者」の症状において、従来の認知検査と合わせて複合的にQESDの設問を用いることにより、早期発見が可能であることが示唆された。

糞便メタゲノム解析は、MCI群とAD群の2群間で、特にclass Actinobacteria、class Bacilli やclass Clostridiaの頻度に違いが見られた。また、菌叢の遺伝子機能解析においても、この2群間で異なるクラスターが存在することが示された。排便障害が大きな問題となる認知症患者において腸内細菌叢の遺伝子機能解析をさらに進めることは、認知症予防や生活習慣・食事習慣の個別化指導への発展に繋がる可能性があると考えられ、これらのクラスタグループに対し詳細な解析を進めている。

さらに認知症に関わるバイオマーカー(メチル化サイト)の検出を目的として、健康な被験者(Healthy群)・軽度認知障害(MCI群)・認知症患者(AD群)の3群を用いて、エピゲノム解析を行った。特にHealthy群とAD群では、305サイトについて統計的に有意な差が認められた。この約60%のサイトが転写領域と遺伝子本体に含まれている事を考えると、認知症に関連のある

重要なメチル化サイトであることが示唆された。現在、軽度認知障害検出アレイの開発を視野に、抽出した305メチル化サイトの中から認知症・軽度認知障害と関連の強いメチル化サイトの選択を進めている。さらには、先に特許申請(特願2021-053424)にて報告した個々人の遺伝子背景(SNPs)結果とエピゲノム(本メチル化サイトの)検出を複合的に用いる事で、より精度の高い新たな認知症予防や生活習慣の個別化指導などへの展開を行うことが可能であると考えている。

E. 結論

これらの遺伝子型を考慮した個別化健康指導や栄養指導などの実現を示唆するとともに、ヘルスケア分野の市場拡大による経済効果が期待できると考えられる。

G. 研究発表

西平順, 佐藤浩二, プレシジョン栄養学におけるゲノム情報の活用—食・生活習慣と健康情報及び遺伝的背景の関係性解明, 臨床栄養 2020; 137(3): 311-319.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願2020-153255「アミロイドβと関連する疾患又は状態の指標とする方法、並びに該方法に用いるための組成物及びキット」

特願2021-053424「アミロイドβ蓄積リスクの有無の指標とする方法、一塩基多型(SNP)の存在又は非存在を検出する方法、組成物、及びキット」

2. 実用新案登録 なし

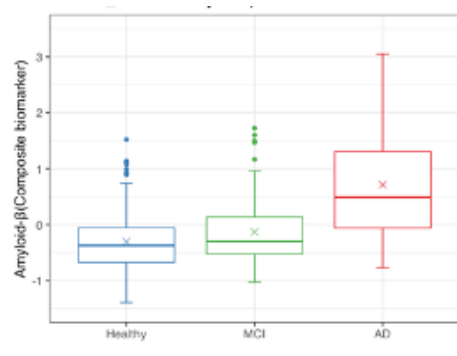


図1 アミロイドβ値3群間の比較

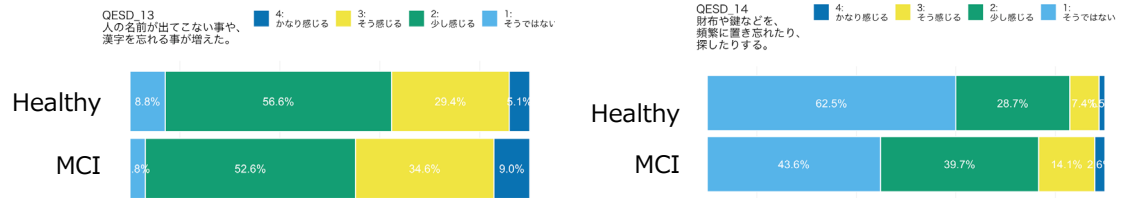
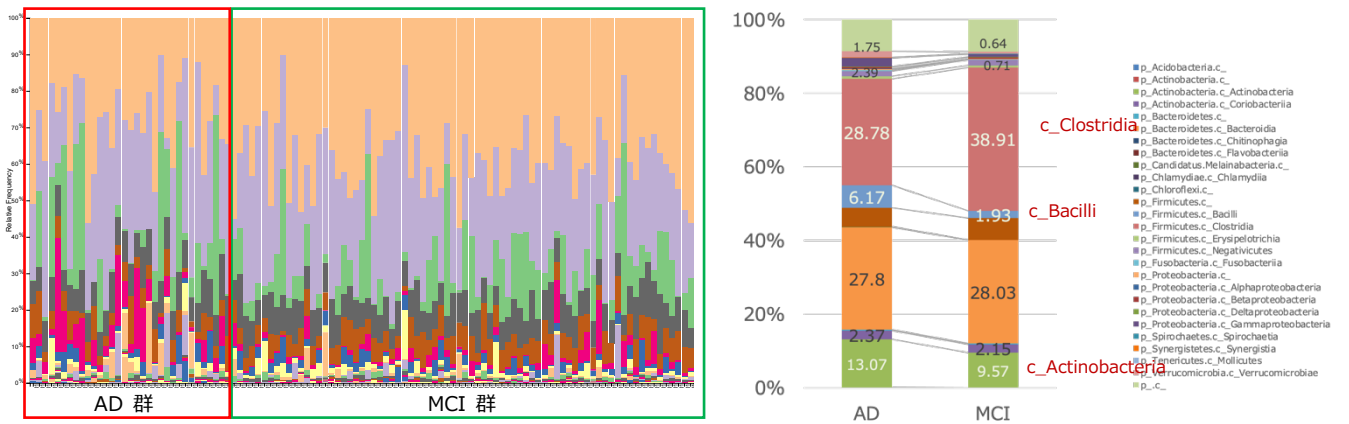


図2 認知機能検査 (QESD、60歳以上)



[A] 腸内菌叢系統分類解析 (個人、各 Class 頻度)

[B] 腸内菌叢系統分類解析 (群間比較、各 Class 頻度平均)

A

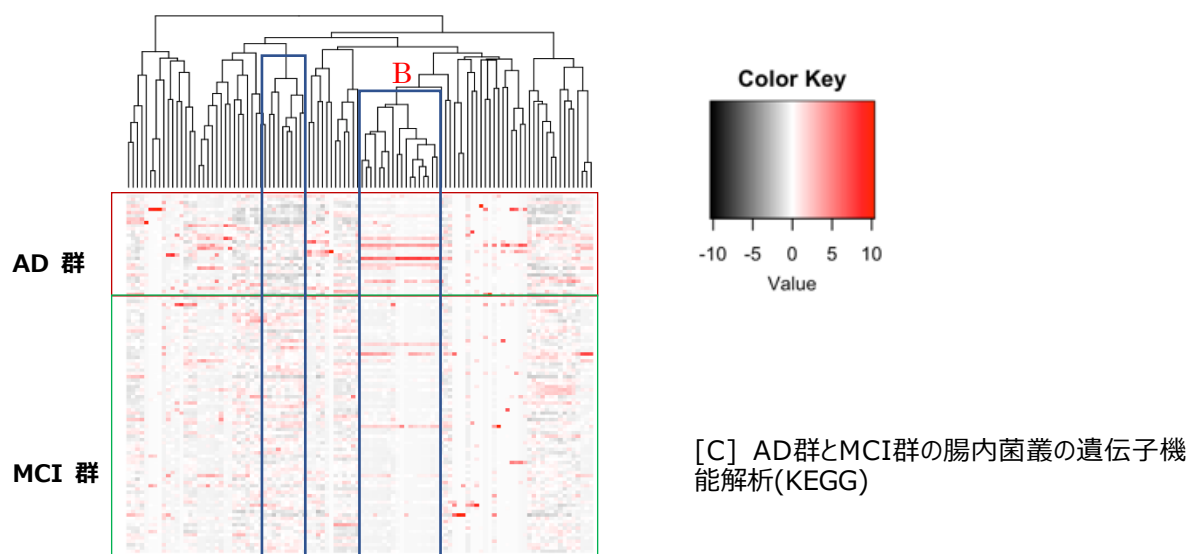


図3 階層的クラスタリング解析