

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))

総括研究報告書

研究課題名：認知症に関与するマイクロバイオーム・バイオマーカー解析

研究代表者 山本 万里

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門・ヘルスケア創出研究統括監

研究要旨

本研究は、簡便かつ精度の良い認知症や軽度認知障害(MCI)のリスク評価のための血清バイオマーカー開発を目的としている。本年度は、健常者(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(分担研究)。また、アミロイドβ蓄積リスクの有無を指標とするApoE4非保有者におけるSNPを見いだした。さらに、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(分担研究)。これは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。

また、認知症マイクロバイオームを解析することで、高精度な認知症予測の微生物バイオマーカーの開発、認知症発症に関与する腸内微生物種とその産物等の特定、ならびに認知症発症の分子メカニズムの解明を目指し、唾液微生物叢(300検体以上)の解析から認知症、MCI、非認知症を高精度で予測するモデルを機械学習法により構築した。また各種認知症モデルマウスの解析から、脳内Ab蓄積、行動異常、ニューロン新生などに強く相関する腸内微生物群を特定した(分担研究)。

分担研究者

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)
大島登志男 (早稲田大学・理工学術院教授)

研究協力者

服部正平 (早稲田大学・客員主管研究員)
本田賢也 (慶應義塾大学・医学部・教授)
服部信孝 (学校法人順天堂 順天堂大学・医学部・教授)
赤澤智宏 (学校法人順天堂 順天堂大学・医学部・教授)
中島欽一 (国立大学法人九州大学・大学院医学研究院・教授)
菊水健史 (麻布大学・獣医学部・教授)
須田互 (理化学研究所・副グループリーダー)

A. 研究目的

日本では超高齢化の進行とともに、認知症の患者や認知症予備軍である軽度認知障害の数は増え続けており、認知症の人口に対する割合が他国に比べて大きく、認知症の半分をアルツハイマー型が占める。アルツハイマー型認知症の発症は、アミロイドβ (Abeta) の蓄積が大きく関わっていることが知られており、今まで、バイオマーカーとしては、Abeta-42、単球遊走因子 (Monocyte Chemotactic Protein-1; MCP-1)、ミクログリア機能調節因子 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2 ; sTREM2)、心臓由来脂肪酸結蛋白 (Heart-type Fatty Acid-Binding Protein ; H-FABP)、シナプスタンパク質ニューログラニン (synaptic protein neurogranin)、ニューロフィラメント軽鎖 (neurofilament light chain; NFL)、キチナーゼ様タンパク質YKL-40などが報告されている。脳内に蓄積するAbetaに関して感度の高い検査としては、PIBトレーサを用いたPET画像検査や脳脊髄液 (髄液) での測定等があるが、高額、侵襲性が高いことが問題だった。しかし、近年、血清Abetaの測定法が確立し、PET画像との相関も高いことが報告されるようになった。

そこで、健常者 (未病者を含む) の認知症に関わるバイオマーカー、エピジェネティックデータ、腸内・口腔内マイクロバイーム等を解析し、認知症発症と深く関わる新たなバイオマーカーの発見、さらには食品・食事との関係を明らかにする。これらの情報をデータベースへ集約すると共に、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

本研究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474名である。

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。Abetaは、 $A\beta_{1-42}$ 及び前駆体である APP₆₆₉₋₇₁₁ が良好な診断バイオマーカーであることが知られている。そこで、被験者の血漿に、抗アミロイドβモノクローナル抗体を結合した磁気ビーズを処理した後、免疫沈降 (IP) を行い、アミロイドβを磁気ビーズから溶出した後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分

析法 (MALDI-TOF MS) により $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 及びそれらの前駆体である APP₆₆₉₋₇₁₁ の3種のペプチドを測定し、APP₆₆₉₋₇₁₁/ $A\beta_{1-42}$ 及び $A\beta_{1-40}$ / $A\beta_{1-42}$ 2種のバイオマーカー値を算出した。それぞれの値を z-score 化 (データセットの値を平均値=0、標準偏差=1になるよう変換した値) して大きくスケールの異なる値をスケールした後、平均化した値を Composite Biomarker (CM) 値として算出した。測定は、島津テクニカルリサーチにおいて行なった。CM値は値が大きければアルツハイマー型認知症のリスクが高くなることが知られている。

被験者から血液を採取して、常法に従い、DNAを抽出・増幅し、DNAを「ジャポニカアレイ®」 (遺伝子多型解析用アレイ、東北大学 東北メディカル・メガバンク機構製) にかけて、各対象者の遺伝子多型を検出した。なお、この「ジャポニカアレイ®」は、日本人の大規模ゲノム解析の成果に基づいて作製された、約66万個の一塩基多型 (SNP) が搭載された遺伝子多型解析用アレイである。

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

「ジャポニカアレイ®」遺伝子多型解析用アレイを用いて検出した約66万個のSNPマーカーについて品質管理を実施し、クオリティコントロールとして、ジェノタイプピングの成功率が0.99未満のSNPs、歪んだハーディー・ワインベルク平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) の p 値 (HWE: $p < 1.0 \times 10^{-6}$) を有するSNPs、および0.01未満のマイナーアレル頻度 (MAF) の15308個のSNPsを除外後、関連解析に使用した。クオリティコントロールを通過した合計643,607個のSNPsとCM値の関連について PLINK1.9¹⁾を用いGWAS解析を行った。GWAS解析の結果、ヒト染色体領域に存在する計4個のSNPsが有意なゲノムワイド水準 ($p < 1.0 \times 10^{-5}$) を満たし、Abeta (CM値) との有意な関連を示した。4個のSNPsはアルツハイマー型認知症やAbeta蓄積との関連は今まで報告されていなかった。

GWAS解析に用いた前述の474名の被験者から、50歳以下の187名を選び、さらに、Abeta蓄積量に影響を与えることが報告されているApoE4を保有していない142名を選び、前述の4個のSNPサイトにおいてCM値と遺伝子型分布についてのオッズ比を計算するとともに、Pearsonのカイ2乗検定を行った。なお、CM値

1.0以上 (Case)、CM値1.0未満 (Control)の2グループとして比較した。その結果、50歳以下かつApoE4非保有集団においては、4個の内の1つであるヒト染色体領域8q24.3上のSNPについて、CM値1.0以上かつAAの対立遺伝子を持つ被験者では、Odds ratio = 9.62 95%CI (1.25, 74.06)、Pearson χ^2 乗検定 $p=0.001$ であった。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。北海道情報大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

認知症の最多割合を占める病型であるアルツハイマー型認知症では、脳内でのアミロイド β 蓄積が顕著に認められる。アミロイド β 蓄積は、臨床的な認知症が出現する約20年前から始まることが知られており、蓄積の初期段階での予防が望まれる。

一般的に、アルツハイマー型認知症の発症やアミロイド β 蓄積には先天的要因である遺伝要因と後天的要因である環境要因の両方が関与する。

アルツハイマー型認知症の感受性遺伝子としては、最も広く知られているのはアポリポプロテインE遺伝子タイプ4 (ApoE4)であり、日本では、全集団の10%程度がApoE4を保有する。ApoE4遺伝子を保有する群では、保有しない群と比較して60代以降アミロイド β 蓄積量に明確な差異が生じ、認知症発症リスクが高まることが知られている²⁾。

一方、ApoE4遺伝子以外の遺伝要因についても報告がなされている。

アルツハイマー型認知症発症への強い影響を持つApoE4遺伝子を持たない健常者かつ50歳以下の集団において、ヒト染色体領域8q24.3上のSNPにより、アミロイド β 蓄積の起こりやすさを判定することができた。本研究では健常者のみを対象としており、また、本研究実施後のアルツハイマー型認知症発症有無について追跡していない。よって、本研究の対象者には、将来的にアルツハイマー型認知症を発症する者、つまり研究時点でアルツハイマー型認知症

発症前早期段階の者と、将来的にアルツハイマー型認知症発症に至らない者が混在していることが予想される。このような集団であっても、統計学的にアミロイド β 蓄積リスクが高まると結論づけることができるSNPを検出できたことから、産業的にも、対象を限定せずに利用できるSNPであると言える。また、前記SNPは、これまで遺伝要因からの予防について見地が得られにくかったApoE非保有集団において利用可能なSNPであることから、産業的利用価値も大きいと言える。

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。

- 1) <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>
- 2) Jansen WJ et al. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. JAMA 313, 1924-1938, (2015). [PubMed: 25988462]

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
 - ①「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2020-153255 (2020年9月11日出願)
 - ②「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」特願2021-053424 (2021年3月26日出願)
2. 実用新案登録 なし

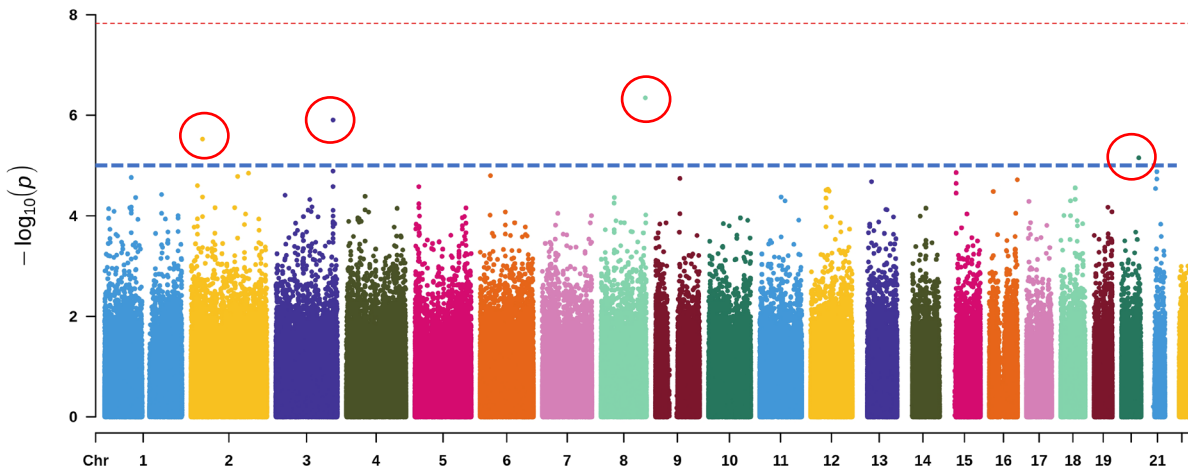


図 1. 全集団における Abeta と関連のある SNPs の選択 (マンハッタンプロット)
 青線を超える p 値 (縦軸) を示す 4 サイト (赤丸囲) が Abeta と関連あると判定された。

Odds ratio = **9.62**
 95%CI (1.25, 74.06)
 Pearson X²乗検定 p=0.01

	GG	GA and AA	Total
Case	2	2	4
Control	125	13	138
Total	127	15	142

図 2. ヒト染色体領域 8q24.3SNP サイトにおけるリスクアレル非保有/保有集団別
 case/control 数 (case;CM 値 1.0 以上、control;CM 値 1.0 未満の被験者数)