

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))

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
(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 学長

研究要旨

本年度は、健常人に加え、新たに軽度認知障害と認知症患者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、認知症患者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、健常人群と認知症患者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、未病者を含む健常者と軽度認知障害、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歳までの健康な被験者 (以下、Healthy群) 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、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、HNMH群) 。

2. 測定項目

参加した被験者から採血を行い、生化学項目 (亜鉛、アラキドン酸など) の他、血中アミロイドβ (以下、Abeta) の測定に使用した。Abetaの測定は、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。

糞便メタゲノム解析は、Healthy群の中から60歳以上 (以下、ActiveSenior群)、MCI群とHNMH群の3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解析は、Healthy群 (65歳以上)・MCI群・HNMH群の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。

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、血中アミロイドβ (Composite Biomarker 値) のグラフを示した。HNMH群については、病態別に小グループを付与し、比較を行った。3群の比較では、HNMH>MCI>Healthyの順に、Abetaの蓄積が見られた。またHNMH群内の病態別6グループの比較

は、AD群（アルツハイマー群）のAbetaの平均値±SEは、 1.28 ± 0.23 とHNMH群内で最も高く、またPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。

次にActiveSenior群、MCI群、HNMH群から糞便を採取しDNA抽出を行い、糞便メタゲノム解析を行った。図2に腸内菌叢の系統分類結果を示した。HNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の組成に違いが見られた。PDAD群は、class Verrucomicrobiae、class Gammaproteobacteria、class Bacilliの増加、class Clostridiaの減少が見られ、DLB群は、class Actinobacteria、class Coriobacteriiaの増加が見られた。

最後に認知症と関連のあるメチル化サイトの探索のため、「MCI群」と「HNMH群」に加え、Healthy被験者のうち65歳以上を使用し、「Active Senior群」とし、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73万メチル化サイトを解析に使用した。群間比較において特に、有意差 ($p < 0.01$) かつlogFC値±0.1以上のサイトを抽出した。Active Senior群とHNMH群の比較では、Active Senior群>HNMH群は、2872サイト。HNMH群>Active Senior群は、6サイト。Active Senior群とMCI群の比較では、Active Senior群>MCI群は、50サイト、MCI群>Active Senior群は、7サイトであった。また、HNMH群とMCI群の比較では、HNMH群>MCI群は、0サイト、MCI群>HNMH群は、5144サイト見られた（図3）。データは示していないが有意差を示したサイト数が多いActive Senior群>HNMH群とMCI群>HNMH群の両比較において、染色体上の領域別の頻度を比較したところ、転写領域（TSS200, TSS1500）は、有意差が見られたサイト全体の約15%程度、特に多かったのはBodyの約50%であった。図4に、Active Senior群と病者（MCI群とHNMH群）の有意差の見られたサイトの共通性を確認したところ、Active Senior群がMCI群とHNMH群に対しβ値が高値であったメチル化サイトは、合計35サイトであった。その他、2837サイトがHNMH群のみ、15サイトがMCI群のみであった。次に、有意差が見られたCpGサイトと今回測定した生化学項目との相関を調べたところ、認知症研究の重要マーカーであるアミロイドβ値と緩やかな相関が見られたサイトが検出された（図5）。

（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（HNMH群）の3群間比較の結果、HNMH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、HNMH群の病態別の群比較では、AD群が最も高いAbeta値を示し、PDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。以上より血中のAbetaの蓄積がアルツハイマー病と関連がある事が示された。

糞便メタゲノム解析は、図2に示したHNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の分布に特異的な組成が見られた。また、今回の結果から、PDAD群は、ADのみ、もしくはPDのみ発症者と異なる菌叢である事が示された。これは、PDADなどの病種が併発している被験者のデータが取得できたことにより、単独の症例の患者と併発症例の患者との比較が可能となり、またさらに上記の菌叢解析を進めることで、併発症例の要因の探索にも有効であると考えられた。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る。

次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65歳以上（Active Senior群）・軽度認知障害（MCI群）・認知症患者（HNMH群）の3群を用いて、エピゲノム解析では、特にActive Senior群と比較し病者（HNMH群、MCI群）で脱メチル化が進んでいるものも多く見られた。病者と健康な被験者65歳以上の比較において、特に有意差があったものの中には、詳細は示していないがHOOK遺伝子、BAZ1A遺伝子などアルツ

ハイマーに関連する遺伝子。そのほか、年齢に関連する遺伝子の転写領域にもメチル化に有意差が見られた。また特にアミロイドβと相関のあるサイトには、早老に関連すると報告がある遺伝子の転写に関わるサイトとの関係が確認できた(図5)。今回統計的に選び出したサイトが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。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 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

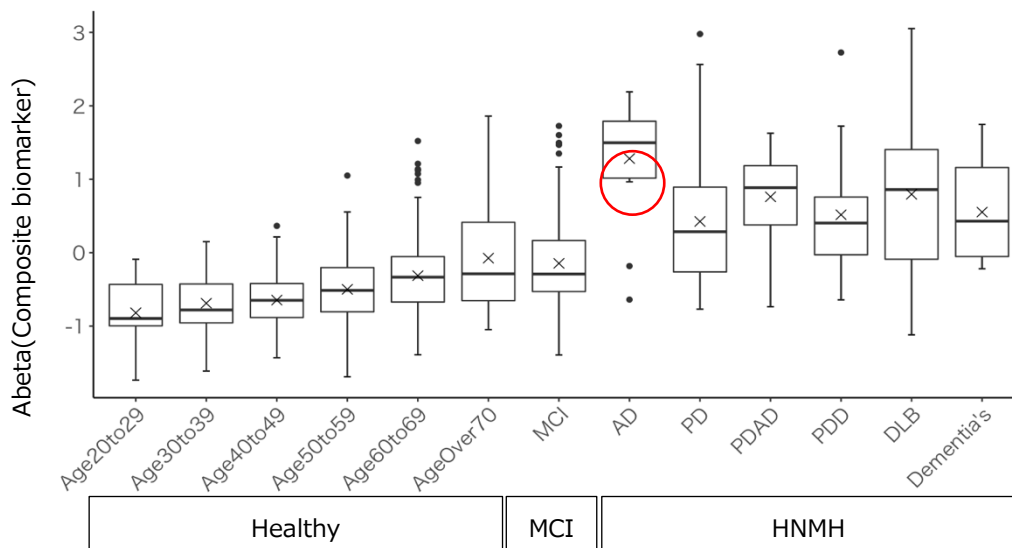


図1. アミロイドβ値 (Composite biomarker) の比較
 Healthy: 健常人、MCI: 軽度認知障害、HNMH: 認知症患者

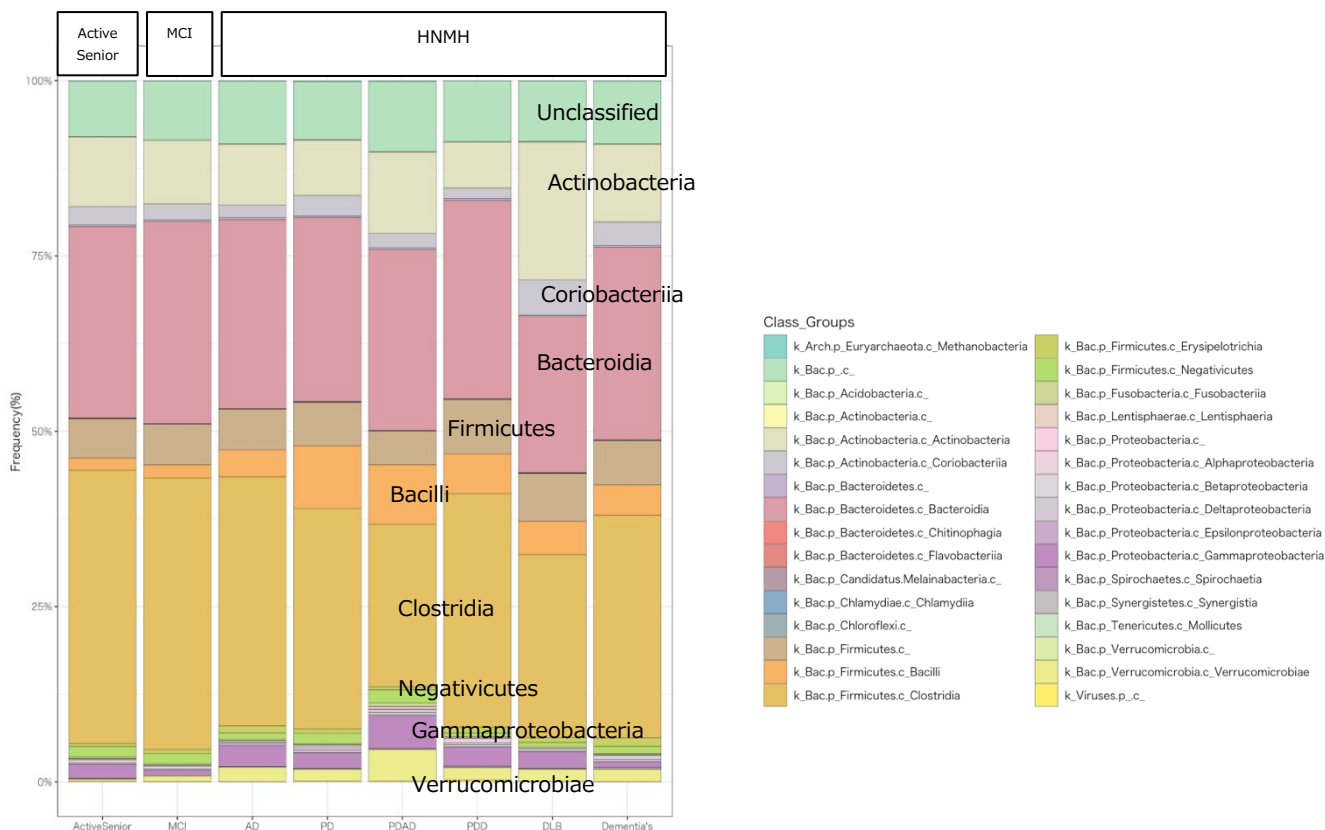


図2. 腸内菌叢 (Class) の比較

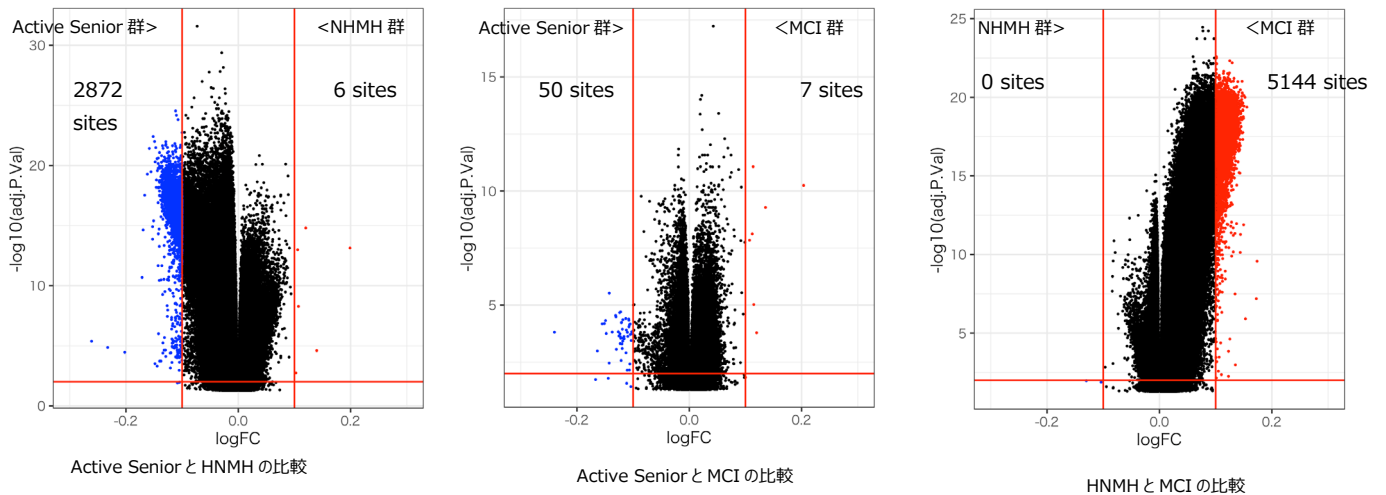


図 3. メチル化群間差

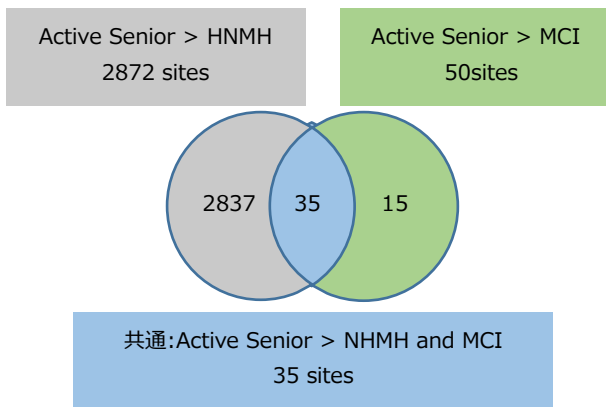


図 4. 群間比較 (共通サイトの確認)

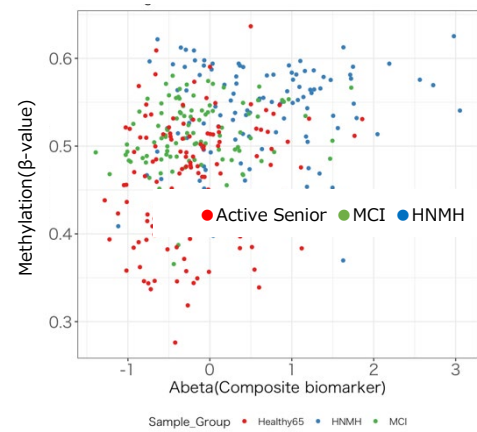


図 5. Abeta とメチル化サイトの関係