

尿プロテオミクスによるアルツハイマー病早期診断マーカーの開発

渡邊裕美

新潟大学大学院医歯学系 環境予防医学分野

【研究の背景】

アルツハイマー病(AD)は認知症の過半数を占める疾患である。その特徴として、記憶障害などの臨床症状出現に先立つこと 20 年有余からアミロイド β タンパク質の沈着に代表される脳の病変的変化が始まっていることが挙げられる。臨床的症候を発した AD の有効な治療薬がない現在、早期の患者、あるいはハイリスク者を簡便に同定する為のバイオマーカーが求められている。現在、低侵襲性の血液バイオマーカーが数多く研究されているが、我々は地域住民コホート研究の経験から、より多くの一般住民を巻き込むため、検査の侵襲性を可能な限り低くすることの重要性を実感している。そのため、現在数多く研究されている低侵襲性の血液バイオマーカーではなく、無侵襲性な尿バイオマーカーの開発が重要であると考えた。

尿成分の 30%は血液由来であり、血液同様に生体の代謝変化を反映すると考えられる。近年の生体液バイオマーカー探索は質量分析による網羅的探索から始まるのが主流であるが、尿は血液に比べ非常にタンパク質濃度が低く、また、プロテアーゼ等による変化も受けにくいことから、質量分析に適した素材といえ、腎泌尿器系疾患の他にも、糖尿病や心血管系疾患やがんのバイオマーカー探索研究が報告されている¹⁾。しかし、アルツハイマー病の尿バイオマーカー探索研究の報告はきわめて少ない。

【目 的】

本研究は、無侵襲的に採取できる尿から質量分析技術を用いてアルツハイマー病のバイオマーカーを探索することを目的とする。具体的には、①既に取得済みの患者・対照尿の質量分析(プロテオミクス)によるバイオマーカー候補の探索と ELISA による再現性の確認、②新規患者・対照尿の取得と ELISA による妥当性解析、③住民コホートの尿検体を用いた候補タンパク質の測定による認知機能との関連の横断・縦断解析、を行う。

【方 法】

- ① Niigata 群:患者群は新潟大学医歯学総合病院神経内科通院アルツハイマー病患者 18 名。対照群は、新潟県村上保健所管内における地域住民コホート研究[村上コホート研究]²⁾のサブコホートである関川村サブコホート参加者から、認知機能正常かつ患者群と性、年齢を合わせた 18 名。認知機能評価として、Mini-mental state exam(MMSE)を用いた。対照群は MMSE 28 点以上とした。対象者より随時尿を取得し、新潟大学生体液バイオマーカーセンターにて LC-MS/MS 解析を行った。同定されたタンパク質は normalized spectral index(SI_N)法³⁾により量を推定した。SI_N 値による半定量解析、Gene ontology(GO)解析、KeyMolnet(KMデータ)による分子ネットワーク解析などの結果より候補タンパク質を選択し、ELISA を行う。
- ② NCGG 群:国立長寿医療研究センターよりアルツハイマー病患者尿 14 検体または軽度認知障害(MCI)患者尿 4 検体、対照尿 37 検体を取得した。①で質量分析結果の再現が見られたタンパク質について ELISA を行う。
- ③ 関川村サブコホートの尿検体を用いて①で質量分析結果の再現が見られたタンパク質について ELISA を行い、MMSE 得点等との相関解析を行う。

本研究の実施に当たっては新潟大学倫理審査委員会の承認を得た。

【結 果】

Niigata 群尿検体の質量分析の結果、患者尿、対照尿いずれかの半数以上の検体で同定されたのは 578 タンパク質であった。そのうち 129 タンパク質が対照群に比べて有意に増加又は減少していた。GO 解析や分子ネットワーク解析の結果、アルツハイマー病患者尿における尿プロテオームの変化はリソソーム、糖代謝、補体活性、リポタンパク質代謝、HSP90 シグナリング等の変化を示していることが示唆された。これらの結果から幾つかのタンパク質について ELISA を行ったところ、2 つについて質量分析結果を再現する結果が得られた。しかしながら、これら 2 つのタンパク質については NCGG 群で再現性を得ることは出来なかった。一方で、これらのタンパク質のうちの 1 つについて関川村サブコホートの住民尿のうち 189 検体 (67.4±6.7 歳、男性 53.4%、MMSE27.4±2.3 点 (min20-max30 点)) まで ELISA を行ったところ、女性において、MMSE 得点と弱い負の相関が認められた。

対象者の特徴

	患者群 (n=18)	対照群 (n=18)
Niigata 群		
平均年齢(歳)	72.9±5.6	72.8±5.2
男性 (n,%)	8, 44.4	8, 44.4
MMSE 平均得点 (最小-最大)	21.6±4.5 (10-28)	28.8±0.7 (28-30)

	患者群 (n=18)	対照群 (n=37)
NCGG 群		
平均年齢(歳)	80.4±5.9	72.8±8.3
男性 (n, %)	6, 44.4	17, 45.9
MMSE 平均得点 (最小-最大, n)	18.3±7.5 (0-27, 18)	28.3±1.5 (27-30, 3)

【考 察】

近年、アルツハイマー病の背景に糖尿病、血管機能異常、全身の炎症性変化などの全身性の代謝変化があることが示唆されている。本研究で、アルツハイマー病患者の尿プロテオームの変化がこのようなアルツハイマー病の背景となる全身性変化を反映している可能性が示唆された⁴⁾。一方で、ELISA による検討を行ったタンパク質の全てが質量分析結果を再現するわけではなく、再現されたタンパク質でも、別の患者対照群においては結果が再現しないなど、質量分析結果と ELISA による尿中タンパク質濃度との対応、対象者の背景による尿成分の違いの可能性など、解決すべき課題も明らかとなった。本研究の強みとして、住民コホートにおいて尿検体を得ており、対象者の認知機能を継続的に追跡することから、認知症発症前バイオマーカー探索につながる可能性がある。今後、ELISA で未検討の他の候補タンパク質についての解析と、住民コホートにおける横断・縦断的解析を継続する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

尿を用いたアルツハイマー病(認知症)バイオマーカーは、尿が非侵襲的に何度でも採取可能な試料であることから、一般健康診断レベルでのスクリーニングに利用でき、認知機能正常の高齢者に対する早期あるいは発症前スクリーニングとして非常に有用である。さらに、認知機能低下防止のための介入の効果の指標としても有用となる可能性がある。得られたバイオマーカーから新たな認知症発症の病理学的基盤が明らかとなることも期待され、臨床的にも社会的にも非常に有意義な研究と考える。

【参考・引用文献】

1. Thomas S, Hao L, Ricke WA, Li L. Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. Dunn MJ, ed. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10(4):358-370.
2. Nakamura K, Takachi R, Kitamura K, et al. The Murakami Cohort Study of vitamin D for the prevention of musculoskeletal and other age-related diseases: a study protocol. *Environ Health Prev Med*. 2018;23(1):e010364.
3. Griffin NM, Yu J, Long F, et al. Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. *Nat Biotechnol*. 2009;28(1):83-89.
4. Watababe Y, Hirao Y, Kasuga K, et al. Molecular network analysis of the urinary proteome of Alzheimer's disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra*. 2019;9:53-65.