

# 研究結果報告書

2012年4月28日

〈研究課題〉軽度認知障害からアルツハイマー病への進展を予測するための

## ペプチドプロファイル探索

代表研究者	聖マリアンナ医科大学	生化学教室	准教授	黒川 真奈絵
共同研究者	聖マリアンナ医科大学	生化学教室	教授	加藤 智啓
	聖マリアンナ医科大学	神経精神科学	教授	山口 登
	聖マリアンナ医科大学	神経精神科学	講師	宇田川 至
	聖マリアンナ医科大学	神経精神科学	大学院生	野口 美和

### 【まとめ】

アルツハイマー病(AD)、健常人(HC)、軽度認知障害(MCI)、AD以外の認知症等、全245例の血清中の小蛋白質(ペプチド)を網羅的に解析した結果、ADの疾患マーカーの候補として25個の血清ペプチドが検出された。またADとHCの判別に寄与するペプチド24個は、全て同一蛋白質の断片であった。これら血清ペプチドは、将来ADへと進展するMCIを含め、ADの疾患マーカーとなり得る可能性が示された。

### 1. 研究の目的

#### 1-1 ADの疾患マーカーの確立

現在日本の65歳以上の人口における認知症の罹患率は10%に達し、アルツハイマー病(Alzheimer's disease, AD)はその約2/3を占める。ADの克服は国内のみならず、今や世界的な社会問題である。また、物忘れなどのみを示す軽度認知障害(mild cognitive impairment, MCI)はADのハイリスク群であり、その一部はADに進展する。しかし残る一部はそのままMCIとして推移することが知られている。もしこのMCIの2つの亜群を予め判別できれば、MCIに留まると判断される者は安心して社会活動を行うことができ、ADに進展する可能性の高い者は十分な観察と早

期の治療が可能となる。

現在、ADの確定診断は脳組織の病理学的検査によってのみ可能なため、通常診療においては記憶障害・失行等の症状、改訂長谷川式簡易知能評価スケール等の認知機能検査、頭部CTやMRI、SPECT等の画像評価により総合的に診断されている。血液検査等の簡便で客観的な検査が求められているが、ADの血液マーカーは未だ確立されていない。

ペプチドミクスは、検体中の主に10kD以下の小蛋白質(ペプチド)を質量分析により網羅的に解析する新しい手法であり、血液マーカーの探索に有用と考えられる。そこで、我々はペプチドミクスの手法を用いて、ADの血清バイオマーカー候補を探索し、そのバイオマーカーによりMCIの予後を予測することを目的とした。

#### 1-2 ADの病態解析

これまでADの原因として、脳組織へのアミロイドβ蛋白質の沈着やタウ蛋白質のリン酸化の関与等が報告されてきているが、ADの病態は未だ解明されていない点が多い。

我々は、上記バイオマーカー候補の検索に際し、候補ペプチドについてそのアミノ酸配列を同定し、由来蛋白質を追跡する。ADのバイオマーカー候補となるペプチドは、ADの病

態に關与している可能性が高く、これらペプチドの同定により、ADの病態について、既報とは異なる重要な側面に焦点を当てる。

## 2. 研究方法と経過

### 2-1 血清ペプチドの網羅的検出および定量

聖マリアンナ医科大学病院神経精神科外来を受診したAD 112例、健常人(healthy control subjects, HC) 58例、MCI 20例、その他の認知症(脳血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症等) 19例、認知症以外の精神疾患(うつ病、妄想性障害、せん妄等) 10例、その他の疾患 26例、合計 245例の血清より、弱陽イオン交換体を搭載した磁気ビーズを用いてペプチドを単離精製した。単離したペプチドを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間法による質量分析(mass spectrometry, MS)にて、各ペプチドの質量電荷比およびイオン強度を測定することにより網羅的・定量的に検出した。検出された全ペプチドのイオン強度を、ClinProt システム(Bruker Daltonics)を用いて数値化した。この数値を用いて、AD群と健常群間でt検定を行い、群間で量に有意差を認めるペプチドを選定した。

### 2-2 多変量解析によるAD判別モデルの作製

ADの疾患バイオマーカー候補となるペプチドの選定のため、多変量解析を行い疾患判別モデルを作製した。具体的には、直交部分最小二乗法—判別分析(orthogonal partial least square-discriminant analysis, OPLS-DA, Simca-P+, Umetrics)を用い、AD群とHC群を判別するモデルを作製した。この判別モデルの作製に貢献度の高いペプチドは variable importance of projection (VIP)というスコアが1以上として示されるため、このVIP値を用いて疾患バイオマーカー候補となるペプチドを選定した。作製した判別モデルを用い、MCIの亜群の判別および実際の予後との比較を試みた。

### 2-3 ADの病態に関わるペプチドの同定

AD群とHC群で有意差を示したペプチド、およびOPLS-DAにより作製したAD/HC判別モデル作製において高い貢献度を示したペプチドについて、タンデム質量分析(MS/MS)法にてアミノ酸配列を同定した。得られたアミノ酸配列より、これらペプチドが由来する親蛋白質を検索した。

なお、この研究は臨床試験として聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会にて承認された後に、各被験者の文書による同意を得て行った。

## 3. 研究の成果

### 3-1 ADの病態に關与するペプチドの同定

AD 14例およびHC 14例の血清ペプチドを質量分析により網羅的に解析した結果、100個のペプチドイオンピークを認めた。検出された全100個のペプチドイオン強度について、AD群と健常群の間でt検定を行ったところ、両群間で有意差のあるペプチドを18個検出した。

この100個のペプチドイオン強度の数値を用いたOPLS-DAによりAD群とHC群を判別するモデルの作製を試みたところ、 $R^2=0.999$ 、 $Q^2=0.324$ の判別モデルを作製することができた。この判別モデル1の説明変数( $R^2$ )は0.999と、最高値1に近接した非常に高い値を示し、作製した判別モデルが使用した症例をほぼ説明(完全に2群に分離)出来ていることを示した。また予測変数( $Q^2$ )は、判別モデル作製に用いた症例の6/7を用いて当該モデルを作製し、残り1/7の症例を予測することを7回繰り返す(クロスバリデーション)という手法により、モデルの予測能を示す変数である。最高値は $R^2$ と同じ1であるが、通常生物学的なモデルではこの $Q^2$ が0.4を超えることが目標とされる。判別モデル1において、 $Q^2$ は0.324と0.4を超えておらず、予測能についてはもう少し向上させることが望ましいと考えられた。

この100個のペプチドのうち、判別モデル1の作製において貢献度の高かったペプチドを16個検出した。この16個をt検定の結果と比較した結果、10個のペプチドが重複した。AD群と健常群で有意差を示したペプチド、および疾患判別モデル作製に

高い貢献度を示したペプチド、計24個の同定を試みた。その結果、同定されたペプチドは全て、同一蛋白質由来の断片化されたペプチドであることが判明した。

### 3-2 MCI を含めた血清ペプチドの網羅的解析

より優れた AD の判別モデルの作製、MCI の予後予測、および作製した AD の判別モデルが他の疾患をどれだけ判別できるかを確認するために、さらに多くの症例を準備した。具体的には、AD 112 例、HC 58 例、MCI 20 例、その他の認知症（脳血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症等）19 例、認知症以外の精神疾患（うつ病、妄想性障害、せん妄等）10 例、その他の疾患 26 例、合計 245 例において、質量分析により血清ペプチドを網羅的に定量した。その結果、157 個のペプチドを検出した。

この 157 個のペプチドを用い、さらに優れた AD の判別モデルを作製するため、モデル 1 とは異なる症例として AD 10 人、HC 10 人を選択し、新たな判別モデルの作製を試みたところ、 $R^2=1.000$ 、 $Q^2=0.598$  というモデルを作製することができた（判別モデル 2）。このモデルは、 $R^2$  が最高値である 1 を示して AD と HC を完全に 2 群に分離しており、 $Q^2$  も生物学的モデルの指標である 0.4 を超えていることから、優れた AD の判別モデルであると考えられた。

### 3-3 AD の疾患バイオマーカーの候補の選択とその評価

AD の疾患バイオマーカーの候補を絞り込むため、判別モデル 2 の作製に高い貢献度 ( $VIP>1$ ) を示したペプチド 25 個を用いて、判別モデル 2 と同じ症例により新たな判別モデルの作製を試みたところ、 $R^2=0.946$ 、 $Q^2=0.606$  という非常に予測能の高い判別モデルを作製することができた（判別モデル 3）。判別モデル 3 でも、判別モデル 1、2 と同様、

モデル作製に用いた全 AD および全 HC (training set) を完全に 2 群に分けることが出来た。そのため、この training set における area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) は 1.00 であり、感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率、正確性は、全て 100% となった。

この判別モデル 3 について、モデルを作製したのとは異なる症例である AD 20 人および HC 20 人 (testing set) を用いて、実際の判別がどのような結果を示すか評価 (validation) を行った。その結果、testing set における判別モデル 3 の AUROC は 0.68 であり、感度 80%、特異度 65%、陽性適中率 70%、陰性適中率 76%、そして正確性は 73% を示した。training set より数値は低下したが、比較的少ないペプチド数で、AD の判別がある程度可能なモデルが作製できたと考えられた。

## 4. 今後の課題

MCI においては、既に判別モデル 2 および 3 により AD 移行群と非移行群の判別がなされているが、一部の症例について予後を追跡中である。そのため MCI の予後予測については、全ての症例の予後が判明した際に総括して行う予定である。

判別モデル 3 においてペプチド数を 25 個にまで絞り込んだが、実際臨床で測定可能なのは 3-4 個までに限られることが考えられる。この 25 個のペプチドのうち、高い判別能を示す 3-4 個のペプチドを組み合わせ、臨床応用に耐え得る検査法として確立していきたい。

今回我々が同定したペプチドは、驚くことに全て同一蛋白質の断片であった。当該蛋白質は、アミロイド  $\beta$  蛋白質ともタウ蛋白質とも異なっており、これらの蛋白質が示す AD の病態とは異なる側面が注目される結果となった。実際これまでに、AD および MCI 患者では健常高齢者と比較して当該蛋白質の前駆体濃度が上昇していること、AD で認められるアミロイド  $\beta$  蛋白質の存在下では当該蛋白質の代謝生成物に

構造異常が認められていること等が報告されており、AD と当該蛋白質の異常とは密接な関係があることが示されている。AD における同定された当該蛋白質の断片化ペプチドが果たす役割を、プロテオミクス等を用いた機能解析実験等にて探索する予定である。また今後、判別モデル 2 で AD/HC 群間で有意差を示したペプチドや、判別モデル 3 を構成するペプチドについても同定していきたい。

なお、判別モデル 3 等の validation である程度高い値を示したモデル、および上記の 3-4 個以下のペプチドに絞り込んだモデルにおいて、AD、その他の認知症、認知症以外の精神疾患等を盲検法にて判定することにより、当該モデルの対照疾患との判別能、および AD の重症度と各ペプチド量の変化の相関等も評価していきたい。

## 5. 研究成果の公表方法

学術誌における論文掲載、およびプロテオミクスならびに神経精神科関連の各学会で公表予定である。

以上