様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　６ 月 ２８ 日現在

機関番号：１０１０５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：１８Ｋ０６１９３

研究課題名（和文）汎用的な認知症バイオマーカーを探索するマルチソース解析

研究課題名（英文）Multi-source analyses exploring robust biomarkers for dementia

研究代表者
茅野　光範（Kayano, Mitsunori）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：２０５９００９５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目標は、認知症の早期発見・早期介入のために汎用的なバイオマーカーを開発することであった。本研究では、特に、認知症の過半数を占めるアルツハイマー病（AD）の血中マイクロRNA（miRNA）について、複数のmiRNAを同時に評価し、世界中のアルツハイマー病患者の膨大な血中miRNA発現解析結果（マルチソース＝延べ30,000件）を統合解析（メタ解析）するための理論を構築した。研究期間中にいくつもの新しい結果が報告されたためそれらを取り入れて、現在、解析結果をまとめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究成果により、認知症の過半数を占めるアルツハイマー病（AD）の早期発見・早期介入のための血液バイオマーカーが開発できる（社会的意義）。現在、軽度認知障害（MCI）等で実用化されている血液検査の改良につながる。一方、構築した理論はアルツハイマー病の血液miRNAバイオマーカーだけでなく、他の生体分子、重金属、さらには、他のさまざまな疾病の統合解析に適用可能である（学術的・社会的意義）。

研究成果の概要（英文）：The aim of the study was to explore blood biomarkers (microRNA) for Alzheimer's disease which is one of the most frequent dementia all over the world. Previous results imply that single blood microRNA cannot be efficient enough for screening the patients. We propose a statistical meta-analysis theory to evaluate multiple blood microRNAs simultaneously and have been applying the theory to real world examples (multi-source = totally >30,000 studies).

研究分野：統計的バイオインフォマティクス

キーワード：アルツハイマー病　末梢血　マイクロRNA　メタ解析　共発現解析　相関解析　Fold change

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

高齢化に伴い認知症患者が激増しているが、未だに根本的な治療法は開発されていない。しかし、軽度の段階であれば、認知症の進行を抑えられ、15～50%の割合で改善する場合もあると報告されている。そのため、早期発見・早期介入のために、例えば、診断バイオマーカーの開発など、低侵襲・低コストで高精度な診断法を確立し、認知症患者のスクリーニングを行うことができれば、認知症を予防出来る可能性がある（**図 1**）。

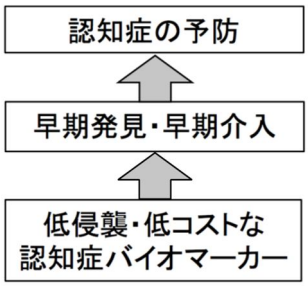

図1. 本研究の背景

認知症の主要な原因疾患はアルツハイマー病であると考えられている。アルツハイマー病の主な病理所見は、神経細胞の脱落による脳の萎縮以外では、脳内の細胞外アミロイドβの蓄積（老人斑の形成）、細胞内のタウタンパク質の蓄積（神経原線維変化）がある。そのため、体液中のこれらのタンパク質を直接測定し、認知症（アルツハイマー病）バイオマーカーとする試みが成されている。脳と物理的に近い脳脊髄液（髄液、cerebrospinal fluid, **CSF**）中のアミロイドβ、タウタンパク質等が安定したバイオマーカーとしてコンセンサスが得られている（Oslsson et al. *Lancet Neurol*. 2016; 49: 755-766 など）。しかしながら、髄液バイオマーカーでは低侵襲性に欠け、サンプル採取のための手間もかかるという問題がある。

一方で、より低侵襲・低コストで容易に検査可能な認知症バイオマーカーとして、血中バイオマーカーが盛んに研究されている。例えば、血中で安定するノンコーディング RNA（microRNA や lncRNA）や、アミロイドβなどのタンパク質、脂質などの代謝産物がバイオマーカーとして期待されている。これらの分子のうち、ノンコーディング RNA（特に microRNA）の研究が盛んであるが、決定的なバイオマーカーは確立されていない。そこで、本研究では、以下の仮説を検証する。

仮説（問い）

1) 髄液（CSF）中タンパク質に匹敵もしくはそれを凌駕する認知症バイオマーカーとなる RNAが血中に存在する。
2) そのRNAは既存の膨大な実験結果や発現データセットの中に埋もれており、血液 RNA や脳内 RNA の発現解析やネットワーク解析、それらの統合解析により検出できる。

２．研究の目的

本研究の目的は、世界中の認知症・アルツハイマー病患者の血中 RNA と脳内 RNA の発現解析とネットワーク解析（マルチソース）の統合解析（メタアナリシス）を行い、汎用的な認知症バイオマーカーとなる RNA を探索し、認知症・アルツハイマー病の予防に貢献することである（**図 2**）。

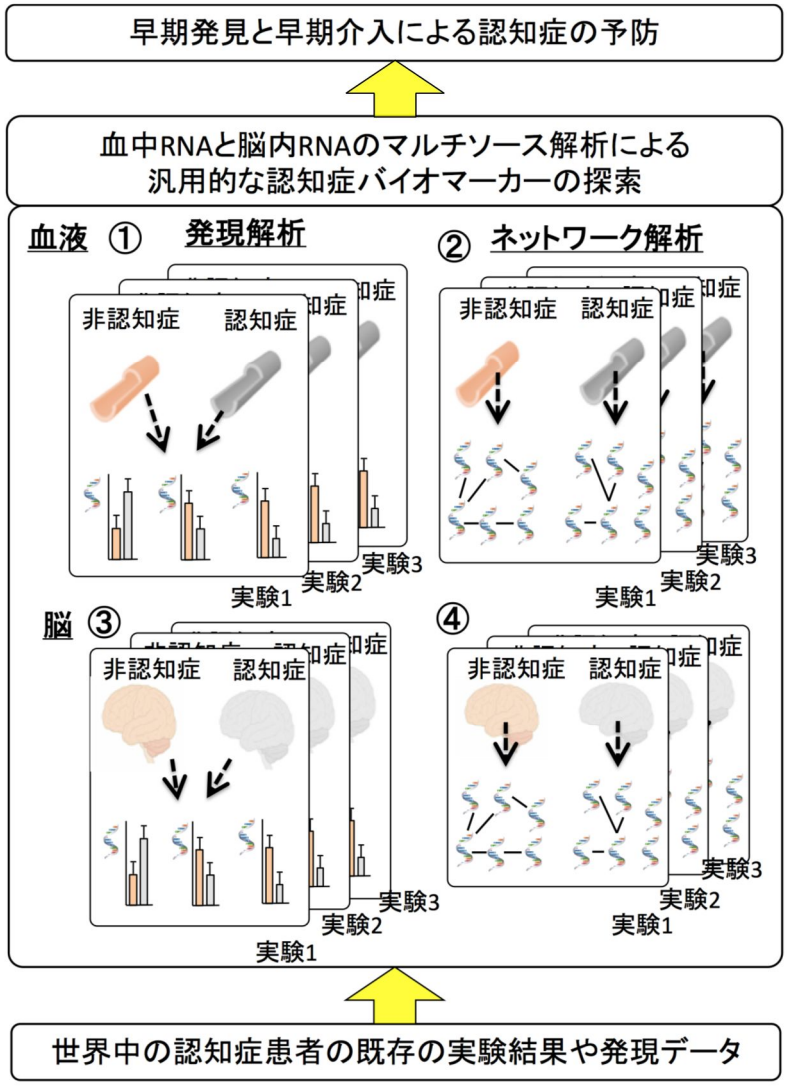

図 2　本研究の目的、方法：
血中 RNA と脳内 RNA のマルチソース解析により、
認知症バイオマーカーを探索し、認知症の予防に貢献する。

３．研究の方法

研究開始当初の計画では、４年間の研究期間内に、以下の①～④を行う予定であった。

① **血中RNA発現の統合解析**
② **血中RNAネットワークの統合解析（この関連理論を開発した）**
③ **脳内RNA発現の統合解析**
④ **脳内RNAネットワークの統合解析**

①と②によって、CSF 中のマーカータンパク質に匹敵あるいは凌駕する、汎用的な認知症・アルツハイマー病バイオマーカーとなる RNA を直接探索する。また、③と④により、①と②で検出した認知症・アルツハイマー病マーカーRNA の脳内での挙動を知ることでそれらの RNA の妥当性を担保し、さらに、汎用的なマーカーとなり得る他の RNA を列挙する予定であった。

しかし、ちょうど研究期間中に①と②の成果が海外のグループから発表され、また、アルツハイマー病に関わる血中マイクロ RNA の総説論文も複数発表された。さらに、③に関連して、CSF 中のマーカータンパク質等との性能比較が直接可能な理論が構築できそうであったため、③に関連した方法の開発を主に実施した。現在、①と③の実データ解析のために、研究期間中に延べ数万件（数万報の報告）が追加された先行研究のデータをまとめている。

③に関連した方法の開発について、まず、バイオマーカーの性能を評価するための基準の一つに対照群と患者群の平均発現量の比（Fold Change; **FC**）がある。既に実用化されている CSF 中の各マーカータンパク質では、FC = 2.0 程度（$p<0.001$）である（Olsson et al, *Lancet Neurol.* 2016）。この数値は過去の複数の研究の FC を統合した平均的な値であり、この統合解析をするための理

論は確立されている（Friedrich et al. *BMC Medical Research Methodology*, 2008）。もし、血中マイクロ RNA 単一でこの性能を持てれば革新的な結果となる。しかし、そのような結果は報告されていない。そのようなマイクロ RNA は存在しない可能性もある。ただし、複数の血中マイクロ RNA を組み合わせて FC=2.0 程度の性能が得られれば、それも十分画期的な結果となる。本研究が目指したのはこのような血中マイクロ RNA を探し出すことであった。

一般に、比で表現された統計量 Y（例えば FC）の統合解析を実施するには、効果量 Z = log Y の平均値と分散が推定・近似できれば良い。それらから Y の平均値と信頼区間が推定できる。例えば、FC = 2.0（平均値）、95%信頼区間が 1.5 から 2.5 となれば、過去の複数の報告を統合した上で有意に FC > 1 となる（平均発現量が患者群で増加する）ことが示せる。

４．研究成果

(1) 複数のマイクロ RNA の性能を評価するための統計理論の開発

対照群を群 0、患者群を群 1 として、$Y = FC = X^{(1)}/X^{(0)}$（$X^{(c)}$ は群 c におけるあるマイクロ RNA の平均発現量; c = 0, 1）について効果量 Z = log Y の平均値と近似的な分散は求められている（Friedrich et al. *BMC Medical Research Methodology*, 2008）。本研究でやりたいことは、マイクロ RNA-1、2、3（それぞれの平均発現量を X_1, X_2, X_3 とする）について、例えば、以下のような統計量 Y の平均値と分散を推定することである。

1) $X_1 \times X_2 \times X_3$ の比：$Y = \dfrac{x_1^{(1)}\ x_2^{(1)}\ x_3^{(1)}}{x_1^{(0)}\ x_2^{(0)}\ x_3^{(0)}}$

2) $X_1 \times X_2 / X_3$ の比：$Y = \dfrac{x_1^{(1)}\ x_2^{(1)} /\ x_3^{(1)}}{x_1^{(0)}\ x_2^{(0)} /\ x_3^{(0)}}$

1) は患者群で微妙に発現増加する 3 つのマイクロ RNA（例えばどれも FC = 1.3）の相乗効果でより高い FC（例えば FC = 2.0）を目指そうとするものである。2) は微妙に発現増加する 2 つのマイクロ RNA 1, 2（例えばどちらも FC = 1.3）と微妙に発現減少するマイクロ RNA-3（例えば FC = 0.7）の相乗効果を期待するものである。なお、測定方法や研究施設間のバラツキを抑えるためには、2) のような「割り算」の比であれば、相対量の比なので、望ましいと思われる。

本研究では、上記よりも一般的な形で、複数のマイクロ RNA の性能を評価するための汎用的な統計量を設定し、その平均値と分散を推定するための理論を構築した（論文投稿前・特許申請前のため詳細（具体的な式）は割愛する）。

(2) 実データへの適用

上記理論を適用するために、本研究期間中にも報告・追加された、延べ 30,000 件以上の先行研究結果をまとめている（現段階では、詳細は割愛する）。

(3) 複数のマイクロ RNA バイオマーカーの実用化ための統計理論の開発へ向けて

研究開始前に想定していた血中マイクロ RNA のネットワーク統合解析では「それらしい」結果は出せても、実用化には至らない。しかしながら、本報告書で記載している理論では、求めるべき統計量を明示しているため、開発したバイオマーカーの実用化が可能である。例えば、原理的には、「ある人のマイクロ RNA 1，2，3 の積（$X_1 \times X_2 \times X_3$ に対応）の値が〇〇以上なら患者の可能性が高い」などと判断可能である。

本研究において、実際に、比較的単純な統計量 Y を中心に、（X の正規性を仮定した元での）その理論的な分布を導出した。これは、検討事項が多く、（エフォート・労力として）本研究課題の枠を超えるものであり、また、実用化まで道のりが遠く、その時までオリジナリティを保ちたいため、詳細は割愛するが、「血中の生体分子発現量に正規性を仮定できれば」、認知症やアルツハイマー病だけでなく、他のさまざまな疾病のマーカー探索にも、原理的には応用可能である。

＜引用文献＞

- Friedrich, J. O., Adhikari, N. K., and Beyene, J., The ratio of means method as an alternative to mean differences for analyzing continuous outcome variables in meta-analysis: a simulation study. *BMC Medical Research Methodology*, 2008, 8(1), 1-15.
- Olsson, B., et al., CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 2016, 15(7), 673-684.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 茅野光範
２．発表標題 ヒトと動物の認知症に関わる血中分子の探索
３．学会等名 パーティクルフィルタ研究会講演会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計1件

１．著者名 新飯田俊平・茅野光範を含む83名	４．発行年 2022年
２．出版社 技術情報協会	５．総ページ数 537（内4ページを執筆）
３．書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬／診断技術への応用「マルチオミクス情報を用いた認知症に関係するバイオマーカーの探索」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

（論文投稿・特許出願準備中）

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
連携研究者	杉本　知之 (Sugimoto Tomoyuki) (70324829)	滋賀大学・データサイエンス学部・教授 (14201)	2019年から現所属

６．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
連携研究者	坂口　達也 (Sakaguchi Tatsuya) (00757031)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関