

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10427

研究課題名(和文) 縦断研究による、尿プロテオミクスによる認知症予測バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Exploration of predictive urinary biomarkers for dementia using urine proteomics in a longitudinal setting.

研究代表者

渡邊 裕美 (Watanabe, Yumi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50325479

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)：地域住民を対象とした約5年の期間をおいた2回の調査で、調査参加者の簡易認知機能検査(MMSE)を実施し、尿検体を集めた。約5年間にMMSE得点が大きく(4点以上)減少した7名(平均年齢71.3歳、男性4名)の尿と、性・年齢を合致させたMMSE得点が正常(28-30点)範囲で維持された7名(平均年齢71.9歳、男性4名)の尿中のタンパク質を質量分析により網羅的に比較した。その結果、これら合計14名の尿では、炎症に関連する3つのタンパク質の量によって、MMSE得点低下群と維持群のいずれも7例中6例(85%)を正しく判定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症はもの忘れなどの症状が現れる10年以上前から脳の変化が始まっていると示唆されている。現在のところ、根治的な治療法はないが、生活習慣の改善などで発症を遅らせることができる可能性がある。そのため認知症のリスクが高い人を容易に特定できる非侵襲的で簡便な方法が必要とされている。本研究は簡単に採取できる尿を用いて近い将来の認知機能低下を予測できる可能性を示唆した。簡単に受検可能な認知症予測検査の開発は認知症の高リスク者への、より効果的な予防的アプローチを可能にする。

研究成果の概要(英文)：The study participants were those who participated in two surveys of cognitive performance using the Mini Mental State Examination (MMSE) over a period of approximately five years and whose urine samples were collected at both surveys. Mass spectrometry analysis was used to comprehensively compare the urinary proteome of the seven participants whose MMSE scores declined significantly (by 4 or more points) over the 5-year period with that of the seven sex- and age-matched participants whose MMSE scores remained in the normal range (28-30 points). The mean ages were 71.3 and 71.9 years, respectively, and there were four males in each group. The results showed that the levels of the three inflammation-related proteins in the urine of these 14 subjects were correctly determined in 6 out of 7 (85%) in both groups.

研究分野：疫学

キーワード：尿バイオマーカー プロテオミクス アルツハイマー病 認知症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 急激に増大する認知症患者の発症の抑制は公衆衛生・社会経済上の重要課題である。認知症は、もの忘れなどの症状が現れる 10 年以上前から脳の変化が始まっていると示唆されている。現在のところ、根治的な治療法がないが、生活習慣の改善などで発症を遅らせることができる可能性がある。そのため認知症のリスクが高い人を容易に特定できる非侵襲的で簡便な方法が必要とされている。

(2) 申請者らは、認知機能低下に伴って変動する尿中成分を明らかにし、健診などで簡単に受検可能な認知症予測バイオマーカー開発に貢献することを目指している。その目的で、地域住民コホートにおいて認知機能検査 (Mini-Mental State Examination [MMSE]) と尿検体の採取を継続して行ってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿検体を用いてプロテオミクス解析(質量分析)を行い、約 5 年間の認知機能低下に伴って変動する尿中タンパク質を縦断的に特定することである。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者は、村上コホート研究 参加者の中で、2015 年および 2019/2021 年の 2 回の認知機能調査の両方に参加し、MMSE を受検し、尿検体を提供した者から選択した。認知機能低下群として、約 5 年間に MMSE 得点が 4 点以上低下した 7 名 (D 群) を選んだ。対照群 (M 群) として、同期間中に認知機能が正常範囲にとどまり、かつ、D 群と性・年齢をマッチさせた 7 名である。

(2) LC-MS/MS による質量分析により尿プロテオミクスを実施し、尿中タンパク質を網羅的に同定・定量した。いずれかの群で 4 検体以上検出されたタンパク質を統計解析の対象とした。欠損値は各タンパク質の最小値の 1/5 の値で補完した。

(3) 初回調査時の尿のプロテオミクス結果、および、2 回目調査時の尿のプロテオミクス結果から、それぞれ、直交部分最小二乗法判別分析 (OPLS-DA) を用いて D 群と M 群を判別するモデルを作成した。OPLS-DA は、2 つのグループの教師付き判別を行う分析である。OPLS-DA モデルの信頼性は、7 回のクロスバリデーションによる分散分析検定 (CV-ANOVA) によって決定された。 R^2 は適合度を測定するパラメータであり、 Q^2 はモデルの予測能力を測定するもう 1 つのパラメータである。理想的なモデルでは、 R^2 と Q^2 は同程度であるべきで、これは各標本が観察された群分離に等しく一様に寄与していることを意味する。しかし、 Q^2 が R^2 より大幅に低い場合には、モデルの頑健性は低く、過適合が示唆される。Wheelock らの提案に従い、本研究では最終モデルのモデル統計量として、成分数、 R^2 、 Q^2 、CV-ANOVA の p 値を示した。VIP とは、各モデル作成における要因の貢献度を表す指標である。VIP の値が高いほど、群間の判別への寄与が強く、VIP > 1 の変数は、モデルへの貢献度が平均以上である。VIPpred は VIP の予測成分である。統計解析には SAS9.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) と SIMCA ver 17 (Umetrics AB, Umea, Sweden) を用いた。

4. 研究成果

(1) 研究対象者の特徴を表 1 に示す。

(2) 質量分析の結果、同定されたタンパク質数を表 2 に示す。いずれかの群で 4 検体以上検出されたタンパク質は 1159 種類であった。

(3) 初回調査尿のプロテオミクスデータによる判別モデル作成を行った。まず全タンパク質を用いた判別モデルを作成した(モデル 1: $p=0.44$)。モデル 1 の VIP 上位 20 タンパク質でモデル 2 を作成したところ、有意なモデルが得られた(モデル 2: 成分数 2, $R^2=0.85$, $Q^2=0.71$, $p=0.016$)。

	D 群 (認知機能低下群) (n=7)	M 群 (認知機能維持群) (n=7)	P 値
初回調査時年齢 (歳)	71.3 ± 5.5	71.9 ± 5.3	
男性 (n)	4	4	
MMSE 得点、 初回調査時 (点)	27.7 ± 1.4	29.0 ± 0.6	0.05
MMSE 得点、 2 回目調査時 (点)	21.0 ± 1.5	29.3 ± 0.8	<0.001
MMSE 得点差 (2 回目-初回) (点)	6.7 ± 1.4	-0.3 ± 1.1	<0.001

表 1. 対象者の特徴

初回調査尿		2 回目調査尿	
D 群 (D1)	M 群 (M1)	D 群 (D5)	M 群 (M5)
830 ± 222	859 ± 135	1048 ± 100	1074 ± 96

表 2. タンパク質同定数

(3)- 2回目調査尿のプロテオミクスデータによる判別モデル作成を行った。まず全タンパク質を用いた判別モデルを作成した(モデル3: $p=0.53$)。モデル3でVIP>1.9の54タンパク質でモデルを作成したところ、有意なモデルが得られた(モデル4: 成分数3, $R^2=0.99$, $Q^2=0.91$, $p<0.001$)。

(3)- ORM1、ORM2、SERPINA3の3タンパク質が、モデル2とモデル4に共通して含まれていた。ORM1、ORM2、SERPINA3は全ての尿検体で同定され、その量は、いずれも、初回調査時でも2回目調査時でもD群>M群であった(図1)。そこで、初回調査尿のプロテオミクスデータから、この3タンパク質のみを用いた判別モデルを作成した。そのモデルは、初回調査の尿サンプルをD群、M群いずれも6/7(85.7%)の感度で正しく判別した。さらに、このモデルは2回目調査の尿サンプルについても、D群、M群いずれも6/7(85.7%)の感度で正しく判別した。

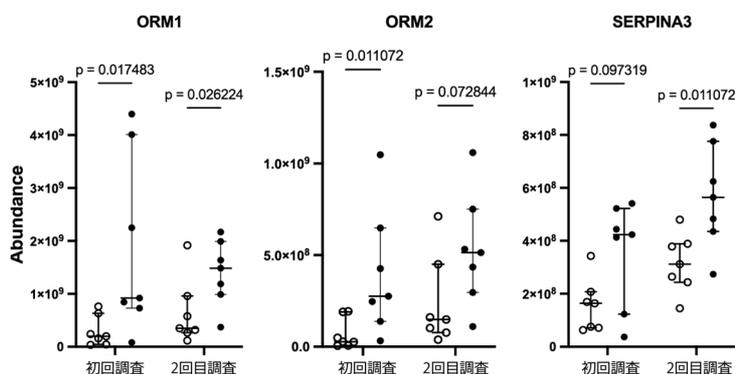


図1. ORM1、ORM2、SERPINA3の質量分析での定量値はM群、はD群。p値はWilcoxon rank sum test。

(4) 以上の結果から ORM1、ORM2、SERPINA3 が認知機能低下の予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された。申請者らが知る限り、本研究成果は、認知機能低下を予測する尿中タンパク質バイオマーカーに関する初の前向き解析である。

これらの3つのタンパク質はすべて、炎症に伴って敏感に発現量が増加する急性期タンパク質であり、がんや炎症性疾患など様々な疾患に関与することが知られている。全身性の慢性炎症は、加齢に伴う特徴の一つである。サンプル数が少ないため、認知機能低下群において、がんや高血圧などを併存する者が多かった可能性も考慮する必要があるが、本研究ではそれに関する背景情報は不明である。一方、炎症は神経変性による脳の変化や認知機能低下の潜在的な促進因子であるとする研究もある。

本研究の限界として、まず、サンプル数が限られていることがあげられる。上述のことに加えて、尿の成分の個体間、個体内での変動を考慮すれば、より多くのサンプル数の研究が望まれる。第2に、本研究では4点以上のMMSE得点低下を認知機能低下としており、認知症との診断を受けたというものではない。第3に、対象者のマッチングにおいて、性と年齢は考慮したが、初回調査時のMMSE得点はマッチさせていない(表1)。このことは選択バイアスにつながる可能性がある。

本研究は、サンプル数の限られたパイロット的な研究であるが、尿検査によって認知機能を予測可能で有る可能性を強く示唆するものである。今後、サンプル数を増やした研究を進めていきたい。

<引用文献>

Nakamura K, Takachi R, Kitamura K, Saito T, Kobayashi R, Oshiki R, 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.* (2018) 23:28. doi: 10.1186/s12199-018-0715-2

Wheelock ÅM, Wheelock CE. Trials and tribulations of omics data analysis: assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine. *Mol Biosyst.* (2013) 9:2589-2596. doi: 10.1039/c3mb70194h

Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* (2014) 69:S4-S9. doi: 10.1093/gerona/glu057

Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* (2019) 25:1822-1832. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0

Walker KA. Inflammation and neurodegeneration: chronicity matters. *Aging (Albany NY).* (2018) 11:3-4. doi: 10.18632/aging.101704

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 渡邊裕美、平尾嘉利、山本格	4. 巻 49(13)
2. 論文標題 尿プロテオミクスによる認知症予測バイオマーカーの可能性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical science Digest	6. 最初と最後の頁 30-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yumi Watanabe, Yoshitoshi Hirao, Kensaku Kasuga, Kaori Kitamura, Kazutoshi Nakamura and Tadashi Yamamoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Urinary proteome profiles associated with cognitive decline in community elderly residents;A pilot study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front. Neurol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2023.1134976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊裕美、平尾嘉利、春日健作、北村香織、中村和利、山本格
2. 発表標題 尿中急性期タンパク質(Acute Phase Protein)の変動による認知症予測の可能性
3. 学会等名 第94回日本衛生学会2023年大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡邊裕美、平尾嘉利、春日健作、北村香織、中村和利、山本格
2. 発表標題 縦断デザインを用いた、プロテオミクスによる認知症尿バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第42回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊裕美、平尾嘉利、春日健作、北村香織、中村和利、山本格
2. 発表標題 約5年間に認知機能が低下した高齢者と認知機能を維持した高齢者の尿プロテオームの&比較
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会 (JHUP0第21回大会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新潟大学大学院医歯学総合研究科環境予防医学分野 https://www.med.niigata-u.ac.jp/hyg/index.html 新潟大学大学院医歯学総合研究科環境予防医学分野 https://www.med.niigata-u.ac.jp/hyg/index.html 新潟大学医歯学総合研究科環境医学分野 https://www.med.niigata-u.ac.jp/hyg/index.html 新潟大学医学部医学科 / 研究内容一覧 / 環境予防医学分野 https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/activity/research/kiso/eisei.html</p>

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
研究分担者	平尾 嘉利 (Hirao Yoshitoshi) (10647613)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (13101)	
研究分担者	北村 香織 (Kitamura Kaori) (80468975)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

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
---------	---------