

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09051

研究課題名(和文)尿プロテオミクス解析による認知症予測バイオマーカーの網羅的探索

研究課題名(英文)A comprehensive study of urinary proteome of Alzheimers disease and exploration of urinary biomarker for Alzheimers disease..

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：尿は侵襲無く、簡単に採取可能であり、尿を用いたアルツハイマー病バイオマーカーはアルツハイマー病早期診断やスクリーニング検査に非常に役立つと期待される。

本研究はアルツハイマー病の尿バイオマーカー探索を目的として、(1)アルツハイマー病患者と認知機能正常高齢者の尿プロテオームの包括的比較を網羅的質量分析により行った。(2)質量分析結果から候補タンパク質を絞り、ELISAによる検討を行い、アルツハイマー病患者尿で有意に増加したタンパク質を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は高齢者にありふれた疾患であるが、現在のところ根本治療がなく、発症前を含む早期診断による進行抑制のような予防的対策が重要とされる。そのためには、できる限り侵襲が無く、簡単に受検可能なバイオマーカーの開発がのぞまれている。尿は無侵襲性に容易に採取できる生体液であり、尿を用いたバイオマーカー開発はアルツハイマー病の予防的対策に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Urine is a body fluid that can be collected easily and noninvasively. It contains variety of biomolecules including proteins in the body, whose composition changes in response to physiological and pathological conditions, thus, it is suitable as a material for biomarker. Development of biomarker for Alzheimer's disease (AD) using urine are expected to be very useful in the early diagnosis and screening of AD.

In this research project; (1) we performed a comprehensive study of urinary proteome of 18 AD patients compared with that of 18 cognitively normal control individuals by label-free mass spectrometry and found that changes in the urinary proteome of AD patients reflect systemic changes related to AD pathophysiology such as inflammation, glucose metabolism, and lipoprotein metabolism. (2) Urinary levels of several proteins that were significantly increased or decreased in the proteomics were analyzed by ELISA. One of the proteins examined was significantly increased in AD urine.

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 ELISA ApoC3

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界における認知症の患者数は2040年には8000万人を超えるとの推計されている。本邦では、2025年には65歳以上の高齢者の5人に1人(約700万人)が罹患すると予想されている。なかでも認知症の50%以上を占めるアルツハイマー病(AD)患者の増加が著しい。ADは、世界中で精力的に研究が行われているが、有効な治療法は確立されていない。一方で、ものわすれなどの臨床症状に20年ほど先立って脳の病理学的変化が現れることが知られており、早期診断、あるいは発症前診断による予防的介入が重視されている。現在有効とされる早期診断検査は脳脊髄液検査やMRIやPETによる画像検査であり、侵襲性や費用の点で誰もが容易に受検できるものではない。

近年の生体液バイオマーカー探索はプロテオミクス等による網羅的探索から候補分子を選択し、さらに個別に検討を行うという方法がとられることが多い。この手法を用いて比較的low侵襲性に採取できる血液からバイオマーカーを探索する研究が数多くなされているが、確立されたものはない。ひとつの原因として、血漿タンパク質の95%以上を占めるアルブミンなどの約20種類のタンパク質が、微量に存在する物質の測定を妨げることや、これらの主要なタンパク質を前もって除く前処理により測定の定量性、再現性が大幅に失われることが示唆されている。

尿は侵襲無く容易に頻回に採取可能な生体試料である。尿には、電解質、尿酸やクレアチニンなどの代謝産物をはじめとして、さまざまな生体分子が含まれ、全身の代謝性変化を反映してその成分が変化する。健常人の尿に含まれるタンパク質は~200 µg/ml程度と血液に比べ非常に少なく、微量なタンパク質の検出を妨げる高濃度のタンパク質が少ないことは、プロテオミクスの素材として有利な点である。近年の質量分析技術の進歩により、健常人の尿中から1000~3000以上のタンパク質が検出されるようになり、腎泌尿器系疾患だけでなく、種々のがん、リウマチ性疾患、心血管系疾患など、さまざまな疾患のバイオマーカー探索が行われるようになったが、尿プロテオミクスを用いたADのバイオマーカー研究は報告されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、尿検体という非侵襲的な生体試料を用い、尿中タンパク質の網羅的解析(プロテオミクス解析)からADの尿バイオマーカーを探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は新潟大学倫理委員会(承認番号1836,2015-2081)国立長寿医療センター倫理・利益相反委員会(承認番号1134)の承認を受けて行った。

#### (1)AD患者と認知機能正常高齢者の尿プロテオームの比較解析<sup>1</sup>

##### 対象者【新潟群】

AD群 新潟大学医歯学総合病院神経内科通院AD患者18名。

- 平成27年4月1日時点において60歳以上86歳以下、NINCDS-ADRDA診断基準によりprobableもしくはpossibleアルツハイマー病と診断された者。

対照群 AD群と性、年齢をマッチさせた認知機能正常高齢者18名。

- 地域住民コホート(村上コホート研究<sup>2</sup>)で2014-2015年に行った簡易認知機能検査[Mini-mental State Examination(MMSE)30点満点]の結果が28-30点(認知機能正常)であった者。

##### 方法

対象者から随時尿を得、試験紙(プレテスト5b,和光;ヘマ-コンピスティック-ロング,シーメンス)を用いて尿蛋白の定性検査を行い、1000×g、10分遠心後、分注し、実験に用いるまで-20℃に保存した。尿よりタンパク質をメタノール沈殿法で抽出し、500ngのトリプシン消化ペプチドを非標識液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)により分析しプロテオミクスを行った。同定されたタンパク質はNormalized Spectral Index(SI<sub>N</sub>)法<sup>3</sup>により半定量を行った。いずれかの群で10検体以上同定された578タンパク質を対象としてAD群と対象群のプロテオームの比較解析を行った。各タンパク質の平均値の比較を有意水準0.05としてウェルチ補正t検定で行った。有意に増加または減少したタンパク質群のバイオフィンマティクス解析として、エンリッチメント解析をDAVID Bioinformatics Resources 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)<sup>4,5</sup>により、分子ネットワーク解析をKeyMolNetソフトウェア(株式会社KM Data)<sup>6</sup>を用いて行った。

#### (2)質量分析結果のELISAによる確認

##### 対象者

(1)に同じ【新潟群】。

国立長寿医療センター(NCGG)バイオバンクから譲渡されたAD尿検体(n,14)、軽度認知機能障害(MCI)尿検体(n,5)、【NCGG群】

##### 方法

対象者の随時尿を用いて、(1)の質量分析で有意に変動したタンパク質(候補タンパク質)についてELISAを行った。尿クレアチニン測定はネフェロメトリー法で行った(スポットケムD-01,アークレイ株式会社)。代表値の比較にはMann-Whitney U検定を用いた。

#### (3)地域住民コホート尿を用いた候補タンパク質濃度の測定

##### 対象者

地域住民コホート(村上コホート研究<sup>2</sup>)で2014-2015年に行った簡易認知機能検査(MMSE)を受検した者のうち、随時尿検体のある者。

#### 方法

対象者の随時尿を用いて、候補タンパク質について ELISA を行った。尿クレアチニン測定はネフェロメトリー法で行った(スポットケム D-01, アークレイ株式会社)。

#### 4. 研究成果

##### (1)AD患者と認知機能正常高齢者の尿プロテオームの比較解析<sup>1</sup>

対象者【新潟群】の特徴:AD群,対照群ともに男性8例,女性10例(男性44.4%)、年齢はそれぞれ、72.9±5.6歳、72.8±5.2歳、MMSE得点は、21.6±4.5点、28.8±0.7点。尿蛋白は±がAD群に1例あった他は全て-

結果と考察:AD群で有意に2倍以上増加したタンパク質は73種類,0.5倍未満に減少したタンパク質は36種類であった。その中でFDR<0.05であった24タンパク質を表1に示した。有意

に変動した109タンパク質のエンリッチメント解析では、リソソーム,補体活性化,糖新生に関するタンパク質の数が有意に多いことが示された(表2)。分子ネットワーク解析では、AD尿で発現変動があったタンパク質の相互作用で構成されるネットワークにおいても、AD尿で発現変動があったタンパク質とADに関連するタンパク質との相互作用から構成される分子ネットワークのいずれにおいても上位5位にランクされたパスウェイはのうちの4つは同じで、リポタンパク質代謝, Heat shock protein 90 (HSP90)シグナリング, Matrix metalloproteinase (MMP)シグナリング, チオレドキシシンによるレドックス制御であった。(表3)

以上より、AD患者尿プロテオームは、糖尿病や動脈硬化,慢性炎症に関連する変化を反映することが示唆された。リソソーム, HSP90シグナリングが示唆する細胞におけるタンパク質の恒常性の変化や、チオレドキシシンによるレドックス制御が示唆する酸化ストレスは、加齢による変化と共通するが、ADにおいても重要とされている。これらがAD患者尿プロテオームを特徴づけたことは尿のADバイオマーカーの素材としての可能性を示唆した。

##### (2)質量分析結果のELISAによる確認<sup>7</sup>

###### 【新潟群】を対象とした研究

結果と考察:質量分析結果から、AD群で有意に減少、または増加したタンパク質それぞれから最もp値が低かった、ApoC3, Igfbp3および全検体から検出されたタンパク質の中で最も有意にAD群で増加した、ApoDについてELISAを行った。ApoC3, Igfbp3はAD群で増加傾向(p=0.104, p=0.064)、ApoDはAD群で有意に増加した(p=0.019)(図1)。尿中でのクレアチニン補正前の濃度(中央値)は対照群で ApoC3 129.4pg/ml < Igfbp3 6232pg/ml < ApoD 192.9ng/mlであり、ある程度以上の濃度で尿中に存在するタンパク質については質量分析結果が尿中でのタンパク質濃度を予測できることが示唆された。

###### 【NCGG群】を対象とした研究

対象者【NCGG群】の特徴:尿蛋白陽性(+または2+)の5例(AD群に1例,対照群に4例)を除外して解析を行った。最終的な対象者数はAD群(n,13)、

表1 AD尿において有意に変動したタンパク質 (P<0.05, FDR<0.05)

Accession No.	Protein description (gene name)	Log2FC (AD/control)	Welch's p-value
P06703	Protein S100-A6 (S100A6)	-10.37	0.000
P02656	Apolipoprotein C-III (APOC3)	-9.63	0.000
P36915	Guanine nucleotide-binding protein-like 1 (GNL1)	-9.05	0.002
Q6UY14-3	Isoform 3 of ADAMTS-like protein 4 (ADAMTSL4)	-8.52	0.001
Q00796	Sorbitol dehydrogenase (SORD)	-8.52	0.002
O00592	Podocalyxin (PODXL)	-8.45	0.001
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta(HSP90AB1)	-8.16	0.002
Q9Y3B3	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7 (TMED7)	-8.15	0.002
P07711	Cathepsin L1 (CTSL)	-7.84	0.002
P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM1)	-6.46	0.002
Q9NPY3	Complement component C1q receptor (CD93)	-6.38	0.002
P08253	72 kDa type IV collagenase (MMP2)	5.98	0.001
P07357	Complement component C8 alpha chain (C8A)	6.29	0.002
Q92954	Proteoglycan 4 (PRG4)	6.38	0.001
P55083-2	Isoform 2 of Microfibril-associated glycoprotein 4 (MFAP4)	7.32	0.002
O75309	Cadherin-16 (CDH16)	7.33	0.001
P55957-2	Isoform 2 of BH3-interacting domain death agonist (BID)	8.22	0.002
Q9BRK5	45 kDa calcium-binding protein (SDF4)	8.77	0.001
P15121	Aldose reductase (AKR1B1)	9.13	0.002
P78380	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (OLR1)	9.39	0.001
P17936-2	Isoform 2 of Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3)	9.49	0.001
P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1 (CBR1)	9.82	0.001
P29622	Kallistatin (SERPINA4)	10.00	0.001
P06312	Ig kappa chain V-I region (Fragment) (IGKV4-1)	15.80	0.001

表2 AD患者尿プロテオームで発現変動が認められたタンパク質のエンリッチメント解析の結果。

代表的なターム (GO, KEGG pathway)	エンリッチメントスコア
リソソーム	4.25
補体活性化	2.38
糖新生	1.7

DAVID Bioinformatics Resources 6.8による解析。エンリッチメントスコア>1.3が有意とされる。

表3 分子ネットワーク解析で有意であったパスウェイ(上位5つ)。

###### (A) AD患者尿プロテオームの分子によるネットワーク

順位	パスウェイ	スコア
1	HSP90シグナリングパスウェイ	103.42
2	リボプロテイン代謝	86.74
3	チオレドキシシンによるレドックス制御	53.19
4	MMPシグナリングパスウェイ	45.63
5	テトラスパンニンシグナリングパスウェイ	45.32

###### (B) AD患者尿プロテオームとAD関連分子との分子ネットワークでの結果。

順位	パスウェイ	スコア
1	リボプロテイン代謝	90.35
2	CREBによる転写制御	88.81
3	HSP90シグナリングパスウェイ	57.46
4	MMPシグナリングパスウェイ	47.19
5	チオレドキシシンによるレドックス制御	44.02

KeyMolnetによる解析。スコア>20が有意とされる。

MCI 群(n,5)、対照群(n,32) ;それぞれ男性 30.8%(n,4)、20%(n,1)、50%(n,16) ; 年齢 79.9±6.6 歳、81.8±3.9 歳、71.9±8.4 歳 ; MMSE 得点 17.1±7.9 点、24.6±1.8 点、対象群は MMSE のデータなし。

結果と考察 : ApoC3、Igfbp3、ApoD について、NCGG 群の尿で ELISA を行った(図 2)。Igfbp3、ApoD の濃度は AD plus MCI 群と対照群間で差が認められず、ApoC3 は新潟群同様 AD plus MCI 群で増加傾向であった。

新潟群、NCGG 群いずれにおいても ApoC3 が増加傾向であったため全対象者の結果をまとめて検討した(図 3)。AD plus MCI 群で対照群よりも有意に増加し(図 3A、 $p=0.015$ )、MCI の者を除き AD 対 対照で比較すると有意性が増した(図 3B、 $p=0.011$ )。ApoC3 は AD バイオマーカー候補としてさらに研究する必要があると考えている。

(3) 地域住民コホート尿を用いた候補タンパク質濃度の測定。

結果と考察 : 地域在住高齢者 276 名 (68.2±6.7 歳;男性 138 名、68.7±6.4 歳;女性 138 名、67.6±6.9 歳)の尿中 Protein-X 濃度の ELISA を行った。MMSE 得点は全体では 27.5±2.3 点(最小値 20 点-最大値 30 点)、男性 27.3±2.3 点(21-30 点)、女性 27.7±2.3 点(20-30 点)であった。

クレアチニン補正後の Protein-X 濃度と MMSE 得点の Pearson 相関係数( $r$ )は男性  $r=-0.27$ ,  $p=0.002$ 、女性  $r=0.07$   $p=0.37$  であった。今後 Protein-X についても測定することを検討している。我々はこの地域住民コホート参加者に対し、継続して認知機能追跡調査を行っている。今後の追跡調査により、我々が見出したバイオマーカー候補分子の尿中濃度と将来の認知機能変化との関連を明らかにしていきたい。

#### 参考文献

1. Watanabe Y, Hirao Y, Kasuga K, Tokutake T, Semizu Y, Kitamura K, et al. Molecular Network Analysis of the Urinary Proteome of Alzheimer's Disease Patients. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*. 2019;9(1):53-65.
2. 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. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2018;23(1):28.
3. Griffin NM, Yu J, Long F, Oh P, Shore S, Li Y, et al. Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. *Nature Biotechnology*. 2009;28(1):83-9.
4. Huang D, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *n.d.*;4(1):44-57.
5. Huang D, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. 2009;37(1).
6. Sato H, Ishida S, Toda K, Matsuda R, Hayashi Y, Shigetaka M, et al. New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet. *Curr Drug Discov Technologies*. 2005;2(2):89-98.
7. Watanabe Y, Hirao Y, Kasuga K, Tokutake T, Kitamura K, Niida S, et al. Urinary ApoC3 is a potential biomarker for Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*. (Accepted).

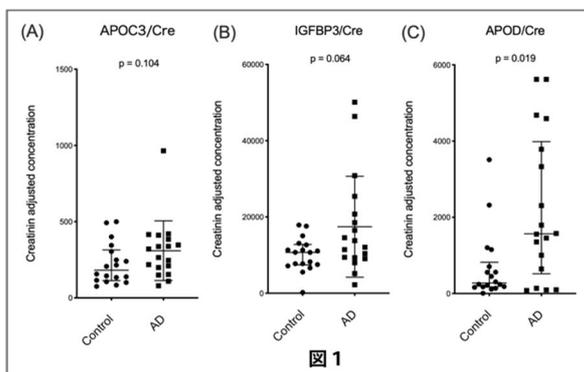


図 1

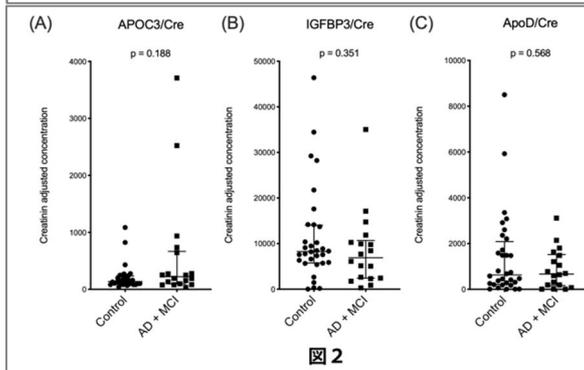


図 2

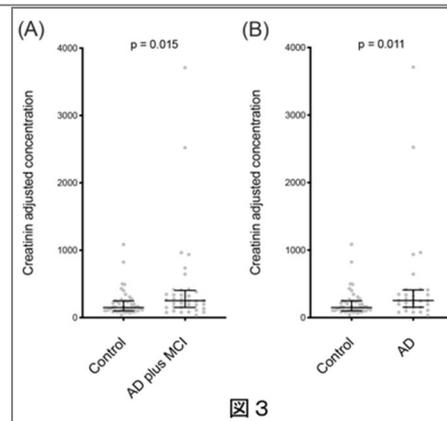


図 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Yumi, Hirao Yoshitoshi, Kasuga Kensaku, Tokutake Takayoshi, Kitamura Kaori, Shumpei Niida, Ikeuchi Takeshi, Nakamura Kazutoshi, Yamamoto Tadashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Urinary ApoC3 is a potential biomarker for Alzheimer's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra	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） なし	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 -

1. 著者名 Watanabe Yumi, Hirao Yoshitoshi, Kasuga Kensaku, Tokutake Takayoshi, Semizu Yuka, Kitamura Kaori, Ikeuchi Takeshi, Nakamura Kazutoshi, Yamamoto Tadashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular Network Analysis of the Urinary Proteome of Alzheimer's Disease Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra	6. 最初と最後の頁 53～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000496100	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 -

1. 著者名 渡邊裕美	4. 巻 34
2. 論文標題 尿プロテオミクスによるアルツハイマー病バイオマーカー研究.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 54-58
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 -

〔学会発表〕 計5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、徳武孝允、北村香織、池内健、山本格、中村和利
2. 発表標題 非標識プロテオミクスによる尿を用いたアルツハイマー病バイオマーカーの可能性
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊裕美
2. 発表標題 尿プロテオミクスによる認知症バイオマーカー探索
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 裕美, 平尾 嘉利, 春日 健作, 徳武 孝允, 池内 健, 中村 和利, 山本 格
2. 発表標題 アルツハイマー病患者尿中タンパク質の分子ネットワーク解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊裕美、平尾嘉利、春日健作、徳武孝允、池内健、中村和利、山本格
2. 発表標題 尿プロテオミクスによるアルツハイマー病バイオマーカー探索
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊裕美、平尾嘉利、春日健作、徳武孝允、池内健、中村和利、山本格
2. 発表標題 アルツハイマー病患者の尿中蛋白質プロファイルの解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2017年大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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>  
環境予防医学 研究内容  
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/activity/research/kiso/eisei.html>

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	山本 格  (Yamamoto Tadashi)  (30092737)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授   (13101)	
研究分担者	中村 和利  (Nakamura Kazutoshi)  (70207869)	新潟大学・医歯学系・教授   (13101)	
連携研究者	池内 健  (Ikeuchi Takeshi)  (20372469)	新潟大学・脳研究所・教授   (13101)	
連携研究者	北村 香織  (Kitamura Kaori)  (80468975)	新潟大学・医歯学系・助教   (13101)	
連携研究者	平尾 嘉利  (Hirao Yoshitoshi)  (10647613)	新潟大学・産学地域連携推進機構・特任助教   (13101)	