

令和元年6月4日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19799

研究課題名（和文）尿メタボロ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）Comprehensive search for biomarkers predicting dementia using urine metabolomics analysis

研究代表者

中村 和利（Nakamura, Kazutoshi）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70207869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、網羅的な低分子代謝産物の解析（メタボロミクス解析）により、アルツハイマー病（AD）患者に特有の尿中（水溶性）低分子バイオマーカーを同定することを目的とし、AD病患者群9例と対照群9例の尿検体に見出されるイオン性代謝産物の特性を予測モデルと妥当性モデルの両方で比較した。予測モデルで増加、減少した代謝産物がそれぞれ2個、7個、妥当性モデルで有意に増加、減少した代謝産物がそれぞれ3個、6個同定された。両モデルに共通して有意な減少を示した代謝産物はGlycerol-3-phosphateであった。Glycerol-3-phosphateは新たなADのバイオマーカーである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出された尿中glycerol-3-phosphateは、アルツハイマー病の新たなバイオマーカーの可能性があり、尿でアルツハイマー病が予測できることが期待される。また同時に、glycerol-3-phosphateが減少したことはアルツハイマー病におけるリン脂質代謝の異常を反映している可能性がある。今後は尿中の脂溶性代謝産物の変化についての解析を行うことが重要と考える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to determine specific urine biomarkers of Alzheimer disease (AD) by using metabolomics. Urine samples of 9 AD patients and 9 controls were analyzed with predictive model and validation model. Two and 7 metabolites were increased and decreased, respectively in predictive model, and 3 and 6 metabolites, respectively, were in validation model. Especially, glycerol-3-phosphate was significantly decreased in the both model. It is suggested that urine glycerol-3-phosphate is a new biomarker.

研究分野：予防医学

キーワード：アルツハイマー病 メタボロミクス 尿 バイオマーカー 予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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 3560 万人 (2012 年) といわれ、2040 年には 8000 万人を超えるとの推計があり、認知症の増加は世界的な問題である。残念ながら、認知症の約 2/3 を占めるアルツハイマー病の有効な治療法は未だ確立されておらず、その発生予防と早期発見による重症化予防が重要視されている。

バイオマーカーを用いたアルツハイマー病の二次予防の研究が世界的に行われている。有用な早期診断マーカーとして、脳脊髄液におけるアミロイド β の低下、タウの増加、MRI・PET による画像解析上の変化が知られている。しかし、これらの検査は侵襲が大きい、あるいは費用が高額であるため、健常集団のスクリーニング目的には適当でない。血中バイオマーカーを探索する試みも数多くなされており、将来的に有望であるが、現在のところ臨床的に有用性の高いマーカーは得られていない。

我々は、これまでアルツハイマー病の環境・遺伝リスク要因の疫学研究、および血中バイオマーカーの探索を行ってきたが、新たに侵襲のない尿検体に注目し、新潟大学 Biofluid Biomarker Center の「なんでも尿検査」プロジェクト (連携研究者: 山本) と連携しプロテオミクスに基づいたアルツハイマー病バイオマーカー探索を開始した。これをさらに展開させるため低分子代謝物質 (メタボライト) をターゲットとしたメタボロミクス解析による尿中バイオマーカーの探索に挑戦したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、網羅的な低分子代謝産物の解析 (メタボロミクス解析) により、アルツハイマー病患者に特有の尿中低分子バイオマーカーを同定することに挑戦することを目的とした。具体的にはアルツハイマー病患者尿と対照尿を用いたメタボロミクス解析により、患者対照間で有意に異なる尿中低分子代謝物を特定することである。

3. 研究の方法

(1) 研究デザイン: アルツハイマー病患者群と対照群の尿検体に見出される水溶性 (イオン性) 代謝産物の特性を比較する横断研究

(2) 研究倫理における配慮: 本研究は新潟大学倫理審査委員会の承諾を得て行った。

(3) 対象者・検体:

【予測モデル作成用尿検体: 1st set】

患者群 新潟大学医歯学総合病院神経内科の認知症外来にてアルツハイマー病と診断された患者 9 人の尿検体。患者の年齢は 60 ~ 79 歳とした。

対照群 研究代表者中村が行っている大規模地域住民コホート研究参加者の中で、簡易認知機能検査 Mini-Mental State Examination (MMSE) で正常 (MMSE 28 点以上) と判断された者のうち、各患者と性・年齢をマッチさせた 9 名の尿検体

【妥当性検討用尿検体: 2nd set】: 同様の手順で、さらに患者 9 人をリクルートし、対照 9 人を設定した。

(4) 尿メタボロミクス解析:

質量分析

本研究では水溶性代謝産物を対象とし、CE-TOF MS 法による質量分析を行った。質量分析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT) 社に委託した。以下に概要を記す。

尿 20 μ L の試料に対し、内部標準物質の濃度が 1,000 μ M となるように調製した 20 μ L の水溶液及び 60 μ L の Milli-Q 水を加えて攪拌し、限外ろ過チューブ (ウルトラフリー MC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5kDa) で遠心 (9,100 \times g, 4 分, 60 分) 限外ろ過処理を行い、CE-TOFMS (Agilent CE-TOFMS system) のカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands ver.2.17.1.11 (慶應義塾大学開発) を用いて、シグナル/ノイズ (S/N) 比が 3 以上のピークを自動抽出し、質量電荷比 (m/z)、ピーク面積値、泳動時間 (Migration time: MT) を得た。得られたピーク面積値を Creatinine のピーク面積値によって相対面積値に補正した。なお、Creatinine はカチオンモードでのみ検出され、アニオンモードの補正にはカチオンモードの内部標準物質で補正した Creatinine の相対面積値を用いた。

検出されたピークに対して m/z と MT の値をもとに HMT 代謝物質ライブラリ及び Known-

Unknown ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は MT で ± 0.5 min、m/z では ± 10 ppm とした。なお、候補が絞り込めず、複数のピークに同一の候補代謝物質が付与された場合は、枝番を付与して表記した。

単変量解析

各代謝産物の相対面積値により、患者・対照間の尿中代謝産物量の比較を t 検定(Welch 補正)を用いて行った。

Receiver operating characteristic (ROC)解析

ROC 解析は SAS studio v3.7 (Enterprise Edition) により行った。

4. 研究成果

(1) 対象者の特徴

対象者の特徴を表 1 に示す。

表 1 対象者の特徴

		1st set		
		対照群	患者群	P-value
数		9	9	
性 (男:女)		3:6	3:6	
年齢 [歳], 平均 (SD)		70.3 (5.2)	70.1 (5.3)	0.929
MMSE[点], mean (SD)		28.9 (0.8)	21.0 (3.6)	<0.001
		2nd set		
		対照群	患者群	P-value
数		9	9	
性 (男:女)		3:6	3:6	
年齢 [歳], 平均 (SD)		75.3 (4.2)	75.8 (4.5)	0.83
MMSE[点], mean (SD)		28.7 (0.7)	22.1 (5.3)	0.006

(2) 質量分析の結果

メタボロミクス解析により、1st set、2nd set それぞれ 286 種類、294 種類、のべ 304 種類のイオン性代謝物質が同定された。2 変量解析の結果では、1st set で有意に増加した代謝産物が 2 個、有意 ($p < 0.05$) に減少した代謝産物が 7 個、2nd set で有意に増加した代謝産物が 3 個、有意に減少した代謝産物が 6 個同定された(表 2)。その中で 1st set、2nd set に共通して有意な増加又は減少を示した代謝産物は glycerol-3-phosphate であった。

表 2 患者群で有意に増加又は減少していた代謝産物

1st set (患者=9, 対照=9)

代謝化合物	量比 (患者/対照)	p-value	同定数 (患者, 対照)
Ectoine	0.52	0.024	5, 5
Mannosamine	0.52	0.029	9, 9
Isopropanolamine	0.55	0.032	8, 9
Glycerol 3-phosphate	0.48	0.036	9, 9
Tyramine	0.61	0.039	8, 6
7-Methylguanine	1.28	0.039	9, 9
Pyrophosphate	0.55	0.040	2, 2
S-Methylcysteine	0.48	0.046	2, 3
Sulfotyrosine	1.36	0.047	9, 9

2nd set (患者=9, 対照=9)

代謝化合物	量比 (患者/対照)	p-value	同定数 (患者, 対照)
Glycerol 3-phosphate	0.48	0.020	9, 8
XC0120	1.27	0.035	8, 8
cAMP	1.35	0.039	7, 8
Taurine	0.62	0.042	9, 9
Pimelic acid	0.63	0.044	9, 8
5-Methylcytosine	1.32	0.048	6, 8
γ -Glu-2-aminobutyric acid	0.45	0.048	5, 8
Imidazole-4-acetic acid	0.72	0.049	9, 9
Glucuronic acid-1		0.049	
Galacturonic acid-1	0.54	0.049	2, 4

glycerol-3-phosphate はグリセロリン脂質生合成の起点となる分子(図 1)であることから、グリセロリン脂質代謝に関連する分子について検討したところ、複数の関連代謝物が同定されており、その多くが患者群で減少していた(表 3)。

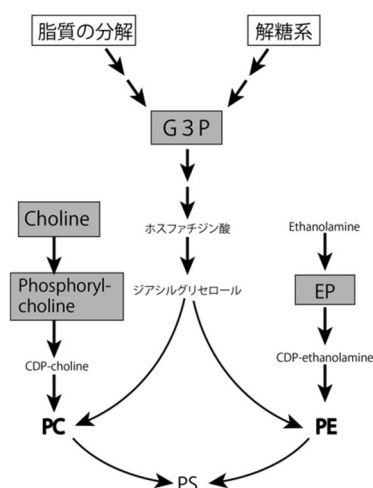


図 1 グリセロリン脂質生合成の概略図

G3P: glycerol-3-phosphate
 EP: ethanolamine phosphate
 PC: phosphatidylcholine
 PE: phosphatidylethanolamine
 PS: Phosphatidylserine
 網掛はメタボロミクス解析で減少した分子(表 3 参照)。

(3) ROC 解析

glycerol-3-phosphate について ROC 解析を行った。1st set のデータについての ROC 解析では AUC 0.83 (95%信頼区間 0.64-1.00)、ROC の左上隅に最も近い点を Cut of 値とした場合の感度、特異度はそれぞれ 66.7%、88.9%であった。これに基づいて 2nd set の予測を行ったところ、感度 33.3%、特異度 100%の結果となった。

全例を用いた ROC 解析では AUC 0.84 (95%信頼区間 0.71-0.97)であった。

(4) 考察

近年アルツハイマー病における脂質代謝の異常が注目されている。複数の研究でアルツハイマー病患者の脳や脳脊髄液、血液において phosphatidylcholine などのグリセロリン脂質の減少が報告されている^{1,2}。

本研究課題において、アルツハイマー病患者では尿中 glycerol-3-phosphate 量が減少している可能性が示唆された。glycerol-3-phosphate は解糖系の中間代謝物から生成され、グリセロリン脂質生合成の起点となる分子の1つである。

本研究で見出されたアルツハイマー病患者尿における glycerol-3-phosphate の減少は、新たなアルツハイマー病のバイオマーカーの可能性を示唆する。同時に、アルツハイマー病におけるリン脂質代謝の異常を反映している可能性がある。本研究で用いた質量分析方法 (CE-TOFMS) は水溶性代謝産物を同定するものであり、脂溶性代謝産物については解析できない。アルツハイマー病患者尿中の脂溶性代謝産物の変化についての解析を行うことが重要と考える。

参考文献

1. Wong, M. W. et al. Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimer's & Dementia* 13, 810-827 (2017).
2. Wilkins, J. & Trushina, E. Application of Metabolomics in Alzheimer's Disease. *Front Neurol* 8, 719 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.niigata-u.ac.jp/hyg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 裕美

表3 メタボロミクス解析で同定されたグリセロリン脂質代謝に関連する分子

代謝化合物	全36検体の比較解析 (患者 = 18, 対照 = 18)		
	量比 (患者/対照)	p-value	同定数 (患者, 対照)
Glycerol 3-phosphate (G3P)	0.48	0.001	17, 18
Ethanolamine phosphate (EP)	0.53	0.013	15, 18
Choline	0.78	0.168	18, 18
Phosphorylcholine	0.50	0.312	5, 4
Ethanolamine	0.92	0.339	18, 18
Triethanolamine	0.76	0.661	5, 8
Diethanolamine	1.14	0.707	12, 12
Glycerophosphocholine	1<	N.A.	0, 6

ローマ字氏名：(WATANABE, yumi)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：講師

研究者番号(8桁)：50235479

(2)連携研究者

池内 健 (IKEUCHI, Takeshi)

新潟大学・医歯学系・教授

山本 格 (YAMAMOTO, Tadashi)

新潟大学・医歯学系・特任教授

蒲澤 佳子 (KABASAWA, Keiko)

新潟大学・医歯学系・特任助教

北村 香織 (KITAMURA, Kaori)

新潟大学・医歯学系・助教

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、研究者個人に帰属されます。