

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21581

研究課題名（和文）尿リポドミクス解析による認知症予測バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Search for biomarkers predicting dementia using urine lipidomics 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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではアルツハイマー病患者18名、認知機能正常高齢者18名の随時尿を用い尿中脂質分子種の網羅的解析を行った。これまでの研究で得ていた同じ尿検体を用いた水溶性低分子代謝物の網羅的解析結果と合わせて、アルツハイマー病患者に特有の尿中代謝物の変化を検討した。その結果グリセロール3リン酸分子とその下流に脂質代謝に関連する複数の分子種の減少とカフェインとその代謝物の減少が示唆された。本研究により尿中代謝物を用いたアルツハイマー病バイオマーカーの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

超高齢社会において認知症はありふれた疾患である。アルツハイマー病は認知症の過半を占め、増加している。本研究では侵襲なく採取できる尿を用いたメタボロミクスにおいてアルツハイマー病患者尿と認知機能正常高齢者尿のメタボロームが異なっていることを示した。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 の減少とその関連代謝物の減少は、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。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a comprehensive analysis of urinary lipid molecular species using spot urine samples from 18 patients with Alzheimer's disease and age- and sex-matched 18 elderly people with normal cognitive function. Combining the results of a comprehensive analysis of water-soluble metabolites in the same urine samples obtained in previous studies, we examined changes in urinary metabolites specific to patients with Alzheimer's disease. The results suggested a decrease in glycerol 3-phosphate molecules and several molecular species related to lipid metabolism downstream of glycerol 3-phosphate molecules, as well as a decrease in caffeine and its metabolites. This study suggests that urinary metabolites may be a potential biomarker for Alzheimer's disease.

研究分野：予防医学

キーワード：リポドミクス 尿 アルツハイマー病 バイオマーカー 予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会において、認知症はありふれた疾患になる可能性が高い。そうであるとすれば、認知症の予測や進展予防を患者または家族でコントロールせざるを得ない時代が来ると予想される。我々は、ありふれた尿検体から認知症（アルツハイマー病）のスクリーニングを可能とするバイオマーカーの開発を目的としてプロテオミクス、メタボロミクス研究を行っている。

2. 研究の目的

我々は、これまでにアルツハイマー病患者尿と対照尿における水溶性低分子代謝物質の比較メタボロミクス解析を行った。その結果、アルツハイマー病におけるリン脂質代謝の異常が尿に反映されている可能性が強く示唆された。アルツハイマー病の尿リピドミクス研究は研究開始時点で報告されていなかったため、本応募研究では、アルツハイマー病患者尿と対照尿の脂質分析（リピドミクス）を行い、これまでの水溶性低分子代謝物の分析結果と合わせた解析により、アルツハイマー病患者に特有の尿メタボロームの変化を探索し、尿バイオマーカー同定に挑戦した。

3. 研究の方法

[デザイン] アルツハイマー病患者群と対照群の尿の脂質特性を比較する横断研究

[対象者・検体]

- ・患者群：新潟大学医歯学総合病院ものわすれ外来を受診した 60 歳以上 80 歳未満のアルツハイマー病（AD）患者より 18 名。AD の診断は NINCDS-ADRDA 診断基準によった。
- ・対照群：村上コホート参加者のうち、2015 年の調査時に MMSE を受検し、尿検体（随時尿）のあるものから認知機能正常（Mini-Mental State Examination 28 点以上）かつ、症例群と性、年齢を合わせた 18 名。

なお、本研究は新潟大学倫理審査委員会の承認を得て行った。（課題番号 1836、2015-2081）

[尿リピドミクス解析]

参加者より得た尿検体（随時尿）を用いて、質量分析による尿中脂質分子種の比較解析（リピドミクス比較解析）を行った。質量分析は LC-FTMS (CER1、Saitama、Japan) を用いた。各代謝産物の相対値の比較は Wilcoxon ' s rank-sum test で行った ($\alpha=0.05$)。判別分析 (OPLS-DA) は SIMCA14.0 (Umetrics AB、Umea、Sweden) で行った。パスウェイ検索は Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースを用いた。エンリッチメント解析は MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) を用いた。データ整理、統計解析には SAS® Studio 3.7 (SAS Institute Inc.、Cary、NC、USA)、グラフ作成には GraphPad software (La Jolla、CA、USA) を用いた。

4. 研究成果

(1) 対象者の特徴

対象者の特徴は患者群、対照群ともに男性 8 名女性 10 名、平均年齢は患者群 72.9 歳 (SD=5.6)、対照群 72.8 歳 (SD=5.2)、MMSE 得点は患者群 21.6 点 (SD=4.5)、対照群 28.8 歳 (SD=0.7) であった。

(2) 質量分析の結果

対象者の尿中から LC-FTMS により脂溶性代謝物/脂質分子種 12 クラス、81 分子が検出された (表 1)。

(3) 質量分析結果の解析

質量分析結果の解析は本研究と同じ尿検体を用いて応募者らがこれまでに進めていたメタボロミクス解析 (水溶性代謝産物の解析) (挑戦的研究(萌芽)研究課題 17K19799) の結果と統合して行った。

メタボロミクス解析 (CE-TOFMS) により水溶性/イオン性代謝物 198 分子が同定されていた。

各代謝物の比較した結果、対照尿と比較して患者尿で有意に濃度が高かった

表 1 リピドミクスで検出された脂質分子種

脂質クラス	脂質分子種						
AcCa (10 種)	AcCa(8:0)	AcCa(9:0)	AcCa(10:1)	AcCa(10:0)	AcCa(11:1)	AcCa(11:0)	
	AcCa(12:4)	AcCa(12:3)	AcCa(12:2)	AcCa(14:3)			
BisMePA (1 種)	BisMePA(16:1_20:2)						
Cer (4 種)	Cer(m17:1_17:1)	Cer(d20:1_16:0)	Cer(m19:0_21:2)	Cer(m19:0_23:2)			
	CerP(t17:1_22:1)	CerP(t17:1_24:4)	CerP(d18:0_24:5)				
DG (2 種)	DG(18:0_18:0)		DG(18:2_21:0)				
	FA(16:0)	FA(18:0)	FA(20:0)	FA(21:0)	FA(24:0)	FA(27:0)	FA(30:0)
FA (9 種)	FA(36:0)						
	Hex1Cer(m19:0_21:2)		Hex1Cer(m19:0_23:2)		Hex1Cer(d18:1_24:1)		
PC (10 種)	PC(16:0_16:0)	PC(16:0_18:3)	PC(16:0_18:1)	PC(18:0e_16:1)	PC(18:2_18:2)		
	PC(18:1_18:2)	PC(18:0_18:2)	PC(18:0_18:1)	PC(16:0_22:6)	PC(18:0_20:3)		
PE (8 種)	PE(16:0p_18:1)	PE(16:0p_20:4)	PE(18:1_18:2)	PE(18:0_18:2)	PE(16:0_22:6)		
	PE(18:1_20:4)	PE(18:0p_20:4)	PE(18:0_20:4)				
PS (4 種)	PS(16:0_18:1)	PS(16:0_20:4)	PS(18:0_18:2)	PS(18:0_18:1)			
SM (4 種)	SM(d18:2_16:0)		SM(d20:1_22:2)	SM(d20:1_22:1)	SM(d18:0_24:1)		
	TG(10:0_12:0_14:0)	TG(12:0_12:0_14:0)	TG(12:0_12:0_16:0)	TG(12:0_12:0_18:1)			
TG (22 種)	TG(12:0_14:0_16:0)	TG(12:0_14:0_18:1)	TG(12:0_16:0_16:0)	TG(12:0_16:0_18:1)			
	TG(14:0_16:0_16:0)	TG(14:0_16:1_18:1)	TG(14:0_16:0_18:1)	TG(16:0_16:0_16:0)			
	TG(16:0_16:0_18:1)	TG(10:0_20:1_20:5)	TG(16:0_16:1_18:1)	TG(16:0_18:1_18:2)			
	TG(16:0_18:1_18:1)	TG(16:0_18:0_18:1)	TG(16:0_18:2_18:2)	TG(18:1_18:1_18:2)			
	TG(18:1_18:1_18:1)	TG(18:1_18:2_18:3)					

表 2 患者群と対照群で有意に差のあった分子

化合物名	KEGG compounds ID	増減比 (患者/対照)	p-value (Wilcoxon)
患者群で有意に多かった化合物			
Hex1Cer(m19:0_21:2)	C05005	1.99	0.009
PE (16:0p_20:4)	C04756	1.39	0.028
PC (18:0_20:3)	C00157	1.50	0.035
PE (18:0p_20:4)	C04756	1.50	0.035
cAMP	C00575	1.26	0.037
患者群で有意に少なかった化合物			
Glycerol 3-phosphate	C00093	0.44	0.001
Caffeine	C07481	0.05	0.002
Ethanolamine phosphate	C00346	0.51	0.002
Paraxanthine	C13747	0.46	0.004
Pimelic acid	C02656	0.65	0.007
AcCa (11:1)	C02301	0.45	0.010
AcCa (9:0)	C02301	0.54	0.013
DG(18:2_21:0)	C00165, C00641	0.46	0.018
Taurine	C00245	0.68	0.018
TG (16:0_16:0_16:0)	C00422	0.67	0.022
Mannosamine	C03570	0.74	0.033
Indole-3-acetaldoxime, indole-3-acetamide	C02937, C02693	0.63	0.036
TG(10:0_20:1_20:5)	C00422	0.53	0.038
Leucine	C00123, C01570, C16439	0.81	0.041
Piperidine	C01746	0.40	0.045
FA (21:0)	C00162, C00638	0.50	0.045
FA (14:0)	C00162, C06424	0.68	0.045
FA (36:0)	C00162	0.51	0.048
FA (33:0)	C00162	0.52	0.048
FA (30:0)	C00162	0.53	0.048
4-Guanidinobutyric acid	C01035	0.72	0.049

のが 5 分子、有意に低かったのが 21 分子だった(表 2)。OPLS-DA 解析の結果、それら 26 分子で 2 群を有意に判別することができた (p<0.001) (図 1)。

脂質クラスごとの量の比較を行ったところ、アシルカルニチン、ジアシルグリセロール、脂肪酸は対照尿に対し患者尿で有意に量が少なく、トリアシルグリセロールは対照尿に対し患者尿で量が少ない傾向であり、アルケニル型ホスファチジルエタノールアミンは対照尿に対し患者尿で有意に量が多かった(表 3)。有意に変動した 26 分子を用いて Metaboanalyst によるエンリッチメント解析と、KEGG パスウェイの検索を行った。エンリッチメント解析で有意であったパスウェイはグリセロ脂質代謝、グリセロリン脂質代謝、カフェイン代謝であった。KEGG 検索の結果、4 分子以上が含まれたパスウェイを表 4 に示した

(4)考察

メタボロミクスは代謝物の網羅的解析を行うものであるが、代謝産物はその物理化学的性質がさまざまであり、単一の方法ですべてを網羅することはできない。本研究では CE-TOFMS と LC-FTMS を行うことで水溶性代謝物から脂溶性代謝物まで幅広く網羅した。その結果、AD 患者尿においてグリセロ

図 1 OPLS-DA 解析の結果

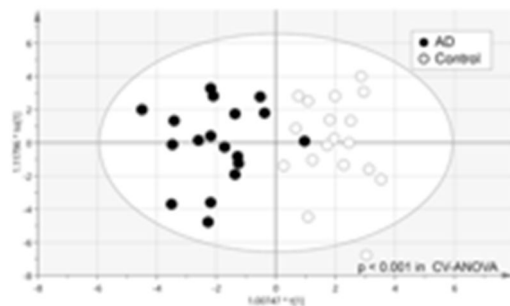


表 3 脂質クラス毎の比較

脂質クラス (同定された分子種数)	増減比 (患者/対照)	p-value (Wilcoxon)
AcCa (10)	0.56	0.006
alkenyl PE (3)	1.38	0.027
DG (2)	0.50	0.031
FA (10)	0.45	0.047
Hex1Cer (3)	1.34	0.055
TG (22)	0.61	0.069

表 4 KEGG パスウェイ検索の結果

パスウェイ ID	パスウェイ (含まれた化合物の数)
hsa01100	Metabolic pathways (15)
hsa04714	Thermogenesis (5) 熱産生
hsa00561	Glycerolipid metabolism (4) グリセロ脂質代謝
hsa00564	Glycerophospholipid metabolism (4) グリセロリン脂質代謝
hsa05231	Choline metabolism in cancer (4) がんにおけるコリン代謝
hsa04923	Regulation of lipolysis in adipocytes (4) 脂肪細胞での脂質分解調節

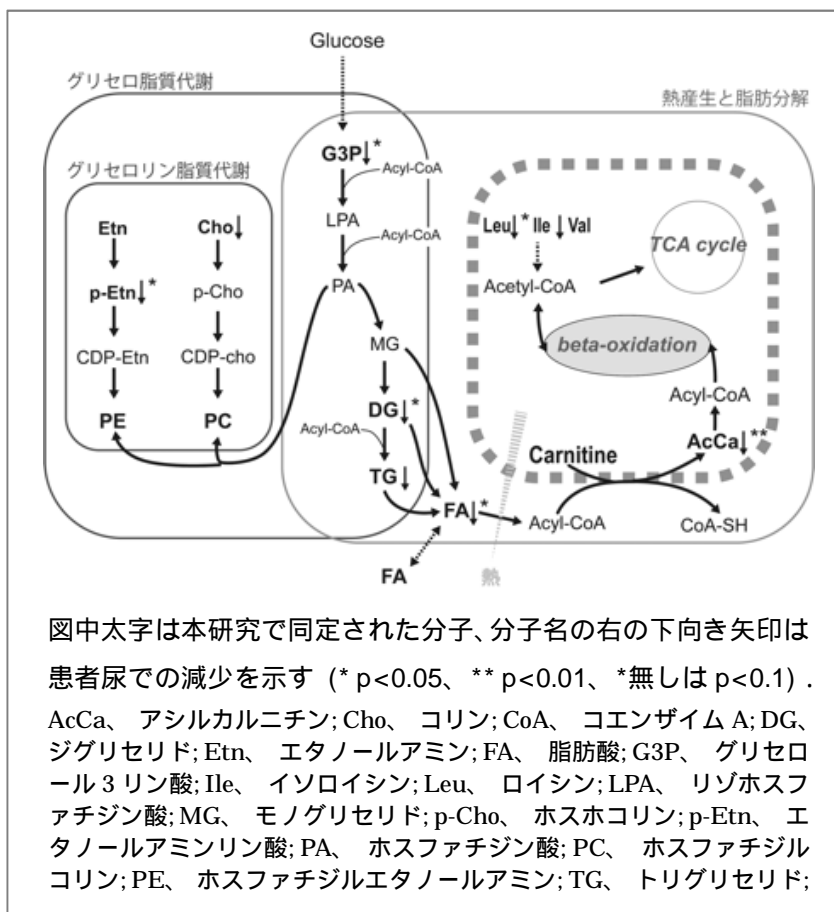
ール 3 リン酸分子とその下流にある複数の分子種の減少と。カフェインとその代謝物の減少が示唆された。

グリセロール 3 リン酸は解糖系の中産物として生合成される分子であり、グリセロ脂質合成の起点となるなどエネルギー代謝における重要な役割を果たしている。本研究で患者尿において有意に減少、あるいは減少傾向であった複数の分子がグリセロ脂質合成系とそれに連なるグリセロリン脂質合成系、脂質分解系に関連していたことは、アルツハイマー病患者における細胞内エネルギー代謝の低下が反映された可能性があるかもしれないと考えている(図 2)。

本研究でアルツハイマー病患者尿で有意に、かつ大きく変化(減少)していたものにカフェインとその代謝物であるパラキサンチンがあった。複数の疫学研究でカフェイン摂取(主としてコーヒー摂取量)が認知症リスクの低下に関連していることが示されている。カフェイン摂取と認知症の関連はアルツハイマー病だけでなくパーキンソン病においても報告されている一方で、早期のパーキンソン病患者では血清カフェイン値およびその代謝産物の値の低下とコーヒー摂取量の低下とは関連しないとの報告 (Hong CT. et al., *Nutrients*12:1860, 2020; Fujimaki M. et al., *Neurology* 90:e404-e411, 2018) がある。アルツハイマー病患者における代謝機能の変化を尿中カフェイン代謝物の変化から探ることが出来れば興味深い。

本研究によりアルツハイマー病患者尿メタボロームが認知機能正常高齢者と異なる可能性が示唆された。しかし本研究は横断研究であり縦断的な調査研究が必要である。

図 2 脂質代謝に関連するグリセロール 3 リン酸 (G3P)とその下流のパスウェイ



図中太字は本研究で同定された分子、分子名の右の下向き矢印は患者尿での減少を示す (* p<0.05、** p<0.01、*無しは p<0.1) . AcCa、アシルカルニチン; Cho、コリン; CoA、コエンザイム A; DG、ジグリセリド; Etn、エタノールアミン; FA、脂肪酸; G3P、グリセロール 3 リン酸; Ile、イソロイシン; Leu、ロイシン; LPA、リゾホスファチジン酸; MG、モノグリセリド; p-Cho、ホスホコリン; p-Etn、エタノールアミンリン酸; PA、ホスファチジン酸; PC、ホスファチジルコリン; PE、ホスファチジルエタノールアミン; TG、トリグリセリド;

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yumi Watanabe, Kensaku Kasuga, Takayoshi Tokutake, Kaori Kitamura, Takeshi Ikeuchi, Kazutoshi Nakamura	4. 巻 12
2. 論文標題 Alterations in Glycerolipid and Fatty Acid Metabolic Pathways in Alzheimer's Disease Identified by Urinary Metabolic Profiling: A Pilot Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology (Front. Neurol.)	6. 最初と最後の頁 719159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2021.719159	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 印刷中
2. 論文標題 オミックスを利用した認知症尿バイオマーカー探索のためのパイロットスタディ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 新潟医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 -

〔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 渡邊裕美、春日健作、徳武孝允、北村香織、池内健、中村和利
2. 発表標題 アルツハイマー病患者尿中代謝産物の網羅的解析
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	渡邊 裕美 (Watanabe Yumi) (50325479)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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
研究協力者	山本 格 (Yamamoto Tadashi)	新潟大学・BB-CV イマ-カ-センター (13101)	
研究協力者	春日 健作 (Kasuga Kensaku)	新潟大学・遺伝子機能解析 (13101)	
研究協力者	北村 香織 (Kitamura Kaori)	新潟大学・環境予防医学 (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