

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20223

研究課題名（和文）新規のリキッドバイオプシー技術を用いたアルツハイマー病診断法の確立

研究課題名（英文）Development of the novel liquid biopsy systems for diagnosing Alzheimer's disease

研究代表者

伊原 航平（IHARA, Kohei）

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・学術研究員

研究者番号：10866106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病は最も罹患者数の多い神経変性疾患であり、早期診断方法の確立が大きな課題となっている。薬物代謝酵素シトクロムP450は、様々な疾患の発症により発現パターンが変化することが知られており、アルツハイマー病などの神経変性疾患においてもP450の発現量の変化が報告されている。これまでに申請者らは、血中のシトクロムP450関連物質の量や質の変化を簡便に検出するP450蛍光阻害アッセイ法を開発した。本研究では、本手法がアルツハイマー病患者と健常者の血清を識別できるかどうかを評価した。その結果、本手法がROC解析においてAUC値 0.933 でアルツハイマー病を識別できることを明らかにした。

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認知症の原因として最も多い疾患であり、超高齢化社会を迎える日本や、世界の多くの国で問題となっている。これらの疾患を克服するためには、早期の診断と早期の治療介入が必要とされているが、自覚症状がほとんどない発症初期の患者に対する有効なスクリーニング検査は確立できておらず、アルツハイマー病の克服において重要な課題の一つになっている。本研究では、新規の診断技術P450蛍光阻害アッセイ法を用いて、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の診断への応用可能性を示すことができた。この新規技術は、神経変性疾患を克服するための一助になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease worldwide. Effective liquid biopsy methods and biomarkers for AD have not yet been established. Previously, we developed a cytochrome P450 inhibition assay which can detect alterations of metabolite levels associated with P450s caused by onset of some inflammation associated diseases. In recent year, it has been revealed that the pathology of AD is related to the function of P450s. However, it is unknown whether the P450 inhibition assay can be applicable to AD diagnosis. Here, we demonstrated whether the P450 inhibition assay can discriminate sera between patients with AD and healthy controls. The results of the assay revealed that P450 inhibition assay can discriminate AD with area under the receiver operating characteristic curve values 0.933 in humans. These results demonstrate that the P450 inhibition assay can aid in the future development of liquid biopsy-based diagnostic methods for AD.

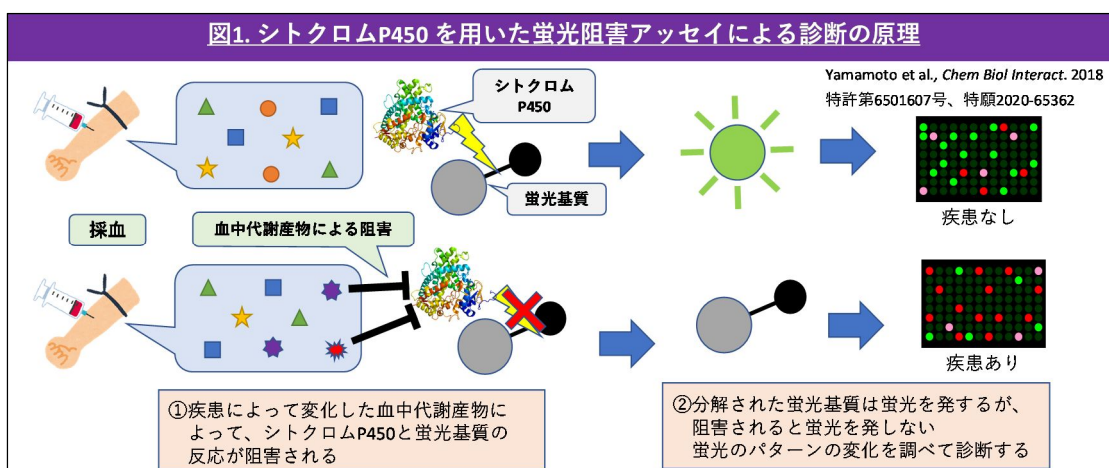
研究分野：生化学

キーワード：リキッドバイオプシー 診断 シトクロムP450 アルツハイマー病 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は、超高齢化社会を迎える日本や、世界の多くの国で問題となっている。これらの疾患を克服するためには、早期の診断と早期の治療介入が必要とされているが、自覚症状がほとんどない発症初期の患者に対する有効なスクリーニング検査は確立できていない。現在、アルツハイマー病の診断には、脳脊髄液の分析やアミロイド PET 検査などが利用される。しかし、大きな痛みや後遺症の危険性を伴う脳脊髄液の採取は侵襲性が低いとは言えず、特殊な設備が必要なアミロイド PET 検査は多額の費用を要する。そのため、自覚症状がほとんどない発症初期の段階で気軽に検査できず、早期診断ができない原因の一端になっている。すなわち、早期診断を可能にする、高感度かつ簡便なスクリーニング検査の開発がアルツハイマー病やパーキンソン病の克服において重要な課題の一つになっている。

申請者らのグループは、薬物代謝酵素シトクロム P450 を用いた新規のリキッドバイオプシー技術を開発し、潰瘍性大腸炎の診断方法を確立することに成功した (Yamamoto *et al.*, *Chem Biol Interact.* 2018, 特許第 6501607 号) (図 1)。シトクロム P450 は薬物の代謝反応を担う酵素の 1 つであり、様々な化合物の酸化反応を触媒する。申請者らのグループは、シトクロム P450 の基質特異性の広さを利用し、これを血中代謝産物の変化を観測するバイオセンサーとして利用した診断方法「P450 蛍光阻害アッセイ」を開発した。測定の手順は次の通り。検査対象の血清とシトクロム P450、蛍光基質を混ぜて反応させる。血清中に含まれる物質がシトクロム P450 と蛍光基質の反応を阻害し、蛍光を発しなくなる (図 1 の)。その結果、健常者と患者の血清中に存在する代謝産物の違いによって、蛍光のパターンに変化が生じる (図 1 の)。この蛍光の変化を観測することで疾患の有無を判定する。本研究では、この新規診断技術を使ったアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の診断方法を確立することを目指した研究を行う。



2．研究の目的

実用化に向けた臨床性能評価試験を実施するための準備段階となる、診断技術の基礎データを取得することを目的とし、以下の3点を明らかにするための実験を行う。

本技術が疾患の発症を検出できているのかを確認するための疾患モデル動物を使用した診断技術のコンセプト検証。本技術がアルツハイマー病の診断に有効に機能するのかを評価するための患者検体を用いた臨床性能評価。本技術で評価している血中の物質が何かを明らかにするための血中成分の分離と評価。

3．研究の方法

本研究で達成すべき3つの目的について、以下の実験を行う。

疾患モデル動物を使用した、診断技術のコンセプト検証実験

本技術では、シトクロム P450 の反応を利用して血中代謝産物のパターン変化を検出しているが、血中の代謝産物は様々な影響で変化する。例えば、食事や睡眠、運動などの生活習慣、疾患の治療のための投薬、さらには遺伝的な背景の違いが血中物質に影響を与える。新技術を実用化するためには、これらの要因を排除し、疾患の有無だけで血中代謝産物に変化が生じ、診断結果が変わることを証明する必要がある。そこで本研究では、遺伝的背景や飼育環境をコントロール可能なモデル動物を用いて実験を行う。

患者検体を用いた臨床性能評価による新規診断技術の精度と有効性の評価

本技術の診断への応用可能性を評価するため、数十症例の患者血清を用いて、本技術を用いて実際にアッセイを行う。その結果から ROC 曲線を作成し AUC 値を算出することで診断の精度を評価する。

新規診断技術で評価している血中代謝産物の分離と同定

新規診断技術は、血中の物質の量や質の変化を検出して疾患の有無を評価するが、具体的にどの物質を評価しているかは不明であり、その診断原理はブラックボックス化している。そこで本研究では、測定の原因を理解するため診断結果に影響を与える血中の成分をクロマトグラフィーなどを用いて分離し、影響を及ぼす血中成分を明らかにする。

4．研究成果

疾患モデル動物を使用した、診断技術のコンセプト検証実験

アルツハイマー病モデルマウスとコントロールマウスから血清を回収して P450 実験を行った。本アッセイでは 11 種類の P450 分子種を使用した。その結果、疾患モデルマウス群の血清で CYP1A2 と CYP2C19 の阻害率に有意な変化が認められた。また、肝臓における複数の P450 発現量の変化も認められた。この結果から、アルツハイマー病の発症によって肝臓で P450 発現量変化が生じ、血中の P450 関連物質の量を変化させた可能性が示唆された。また、本研究ではアルツハイマー病と同じ神経変性疾患であるパーキンソン病の評価も実施した。パーキンソン病モデルラットを用いた実験でも、同様に肝臓での P450 発現量の変化と P450 蛍光阻害アッセイでの阻害率の変化が認められた。以上の結果から、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症は、生体内での P450 発現パターンを変化させ、その変化を P450 蛍光阻害アッセイ法で検出できることが示唆された。

患者検体を用いた臨床性能評価による新規診断技術の精度と有効性の評価

本研究では、アルツハイマー病患者血清 40 検体と健常者血清 40 検体を用いて P450 蛍光阻害アッセイ法を実施した。本アッセイでは 11 種類の P450 分子種を使用した。その結果、CYP1A2、CYP2A13、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP3A5 の 7 つの分子種で有意な阻害率の変化が認められた。さらに、本研究ではロジスティック回帰による分類モデルを作製して、本アッセイが患者群と健常者をどれくらいの精度で分類できているか評価した。その結果、CYP1A1、CYP2C8、CYP2C18、CYP2C19、CYP3A5 の 5 種類の P450 分子種を用いた回帰モデルで、ROC 解析による AUC 値が 0.933 の精度で分離できることが示された。以上の結果から、本アッセイはアルツハイマー病の診断に応用可能であることが示された。今後の課題として、さらに症例数を増やし、病気の進行度合いと本アッセイの結果の相関性を評価する必要がある。

新規診断技術で評価している血中代謝産物の分離と同定

本研究では、P450 蛍光阻害アッセイ法が血中のどの成分に影響を受けて阻害率が変化しているのかを明らかにするため、血清成分の分離と評価を実施した。その結果、血中に最も多く存在するタンパク質である血清アルブミンが阻害アッセイに影響を与えていることを明らかにした。血清アルブミンは運搬体タンパク質として知られており、薬物や脂質などの内因性物質を 2 つの薬物結合サイトに結合させて運搬することが知られている。本研究では、アルツハイマー病及びパーキンソン病患者血清と健常者血清を用いて患者と健常者の間で血清アルブミンの質や量が変化しているかどうかを評価した。その結果、血清アルブミンの量では有意な差は認められなかったが、薬物結合サイトに結合しているものの量が変化していることを明らかにした。今後の研究では、アルブミンにどのような物質が結合しており、それらが疾患の発症によってどのように変化していくのかを明らかにしていく必要がある。また、本研究を通して、血清アルブミン以外の別の物質も阻害アッセイに大きな影響を与えることが示唆されている。今後は、血清アルブミン以外のどのような物質が阻害アッセイに影響を与えるのかさらに調べていくことが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Ihara Kohei, Oguro Ami, Imaishi Hiromasa | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Diagnosis of Parkinson's disease by investigating the inhibitory effect of serum components on P450 inhibition assay | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 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） 10.1038/s41598-022-10528-x | 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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 米塚 靖浩, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 肝細胞癌診断のための新規バイオマーカーの開発研究 |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤 七海, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 大腸がんの評価用新規バイオマーカーの開発 |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新規リキッドバイオプシー技術P450阻害アッセイを用いたパーキンソン病診断方法の確立 |
| 2. 発表標題 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 シトクロム P450蛍光阻害アッセイ法によるがんと神経変性疾患の分類モデルの確立 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 北本 真緒, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 肺がん診断用新規バイオマーカーの開発 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 岡田 悠花, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 ヒト潰瘍性大腸炎診断用新規バイオマーカーの開発 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 大山 凌太郎, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 がん疾患種分類用新規バイオマーカーの開発 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 市川 大祐, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 うつ病評価用新規バイオマーカーの開発 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大山 凌太郎, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 P450蛍光阻害アッセイ法と統計解析および機械学習を組み合わせた新規がんバイオマーカー技術の開発 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 岡田 悠花, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 ヒト潰瘍性大腸炎診断用新規バイオマーカーの開発 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 第95回日本生化学会大会 |
| 2. 発表標題 P450蛍光阻害アッセイ法を用いた新規のうつ病バイオマーカーの開発 |
| 3. 学会等名 福山 雅貴, 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊原 航平, 今石 浩正 |
| 2. 発表標題 新規リキッドバイオプシー技術P450蛍光阻害アッセイ法を用いたアルツハイマー病診断方法の開発 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|