

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790743

研究課題名(和文) レビー小体型認知症の診断バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) The search for diagnostic biomarkers of Dementia with Lewy bodies.

## 研究代表者

中下 聡子 (Nakashita, Satoko)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00569270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：認知症診断マーカーには主にアルツハイマー型認知症(AD)についての検討が多く、画像検査や脳脊髄液を用いたバイオマーカーが主体となっている。本研究は、ADとの鑑別が必要でありかつ頻度が高い神経変性疾患であるレビー小体型認知症(DLB)を標的とし、採取が簡便で臨床応用しやすい血清で診断マーカーを検討した。

3つの候補蛋白を同定し、診断マーカーとしての有用性と病期診断を検討した。血清THBとRBPの血清濃度はDLB群で高値であり、DLB群とAD+健常対照群との診断精度は感度91%、特異度66%であった。血清PF4はDLB群において発症からの時間経過で上昇しており、病期診断に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Biomarkers of Alzheimer's disease (AD) were mainly discussed on using neuro-imaging and cerebrospinal fluid. This study, we focused on Dementia of Lewy bodies (DLB) that is the second common form of neurodegenerative dementia, and using serum samples that is easily applied to clinical practice and epidemiological research.

Three proteins were identified in the biomarker discovery study. The mean serum thymosin 4 (THB) level of the DLB patients was significantly higher than those of other disease patients and health control subjects. The mean serum retinol binding protein4 (RBP) level of the DLB patients was significantly higher than those of AD patients. The combination of THB and RBP exhibited high discriminatory ability of DLB patients from non-DLB subjects with a sensitivity 91%, a specificity of 66%. The serum Platelet factor4 (PF4) has been rising over time from the onset in the DLB group, it will be useful in staging of the disease.

研究分野：神経内科

キーワード：レビー小体型認知症 診断バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

現在高齢化社会は急速に進行しており、高齢化社会が進行するにつれて認知症を有する高齢者の絶対数も増加の一途をたどっている。島根県海士町での疫学調査では、65歳以上の高齢者の中で認知症を有する割合が10%以上との報告をしている<sup>1)</sup>。認知症を有する人口の割合が増加することは、医学的のみならず社会問題にもつながっており、認知症患者に対しての医学的早期介入がより重要になってくる。

このような背景から、認知症に対する早期介入が必要でありそのためには早期診断が求められる。現在、認知症の代表的な疾患としてはADの生物学的診断マーカーの開発が進められてきておりpreclinicalな段階からアミロイドの蓄積が確認されている。

一方でDLBは変動を伴う認知機能の低下、幻覚、パーキンソンニズムを臨床的特徴として呈する神経変性疾患であり、高齢者の認知症の10%以上を占めADに次いで多い認知症疾患である<sup>1)</sup>。DLBにおいては、病理学的にシヌクレインが蓄積することが知られており、ADとは異なる発症機序をと考えられる。更にコホート研究ではDLBはADに比べてDLBは症状の進行が早く、死亡までの期間も短い症例が存在するため、この認知症を呈する両疾患の鑑別のための早期診断は重要となる<sup>2)</sup>。しかし、臨床的にはこれらの鑑別が難しいことも多く早期から治療的介入が難しい一因となっている。

DLBの早期診断マーカーが必要であるという考えから本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、アルツハイマー病(AD)に次いで多くかつ進行の早い認知症であるレビー小体型認知症(DLB)の診断マーカーの確立を目指す。診断マーカーの確立にあたっては、採取の簡便な血清サンプルでの検討を行ってきた。今までの研究で得られた結果より、DLBにおいてコントロール群、AD群と比較し有意に高値である候補蛋白を同定している。本研究では、その候補蛋白が診断マーカー、更に早期診断に有用なマーカーとなるかについても検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 候補蛋白の探索

SELDI-TOF-MS解析法でDLB群8例、コントロール(CTL)群8例において血中蛋白の網羅的検討を行い、マーカー候補ピークを割り出した。

#### (2) 候補蛋白の絞り込み

DLB群8例、コントロール(CTL)群8例、AD群8例においてマーカー候補ピークの中からDLB群を特異的に分別する4つのピークを見出した。

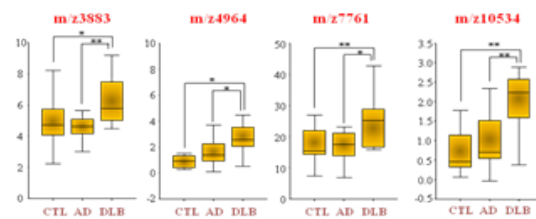


図1. SELDI-TOF-MS解析によるDLB候補ピーク

#### (3) 候補ピークの同定

精製のため-80℃で冷凍保存している血清サンプルを用いて目的ピークのみを検出する最適化条件や溶出条件を決定した。候補蛋白を精製用スピンカラムに結合させ、単一ピークを確認したのち、溶出条件で目的の候補蛋白溶出を行い精製した。精製蛋白はプチドマスフィンガープリンティングおよびMS/MS解析を行った。その結果、3つの候補蛋白としてthymosinβ4 (THB4)、Retinol binding protein 4 (RBP4)、Human Platelet factor4 (HPF4)を同定した。

#### (4) 候補蛋白の血中濃度測定

パーキンソン病(PD)群78名、AD群52名、DLB群22名、対照(CTL)群46名の保存血清を用いて、汎用性に高いELISAキットにて同定した各蛋白の血清濃度測定し、診断の有用性をROC解析で検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ELISA法による血中濃度の結果

THB4血清濃度はDLB群において他の疾患群と比較して有意に上昇していた。RBP4血清濃度はAD群に比較してDLB群で有意に上昇していた。

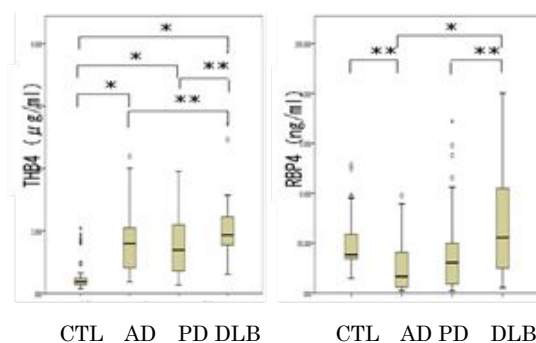


図2. 血清THB4(左)、RBP4(右)測定結果。

#### (2) 診断精度の検討

血清THB4・RBP4測定によるDLB群、非DLB群の診断精度を行った。DLB群vs非DLB群THB4、RBP4それぞれの血中濃度とTHB4、RBP4双方の二項ロジスティック解析を行い、予測値を基にROC解析を行い、診断精度を検討したところ、感度91%、特異度66%(AUC=0.862)であった。

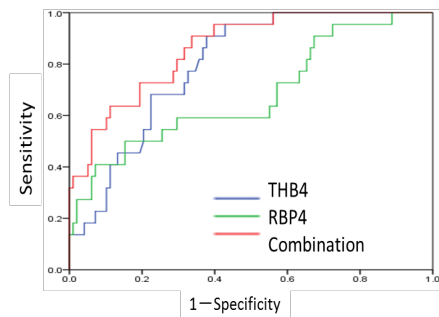


図 3.血清 THB4, RBP4 測定による DLB 群, 非 DLB 群の診断精度

表 1. THB4, RBP4, 2 項目の組み合わせによる AUC, 感度, 特異度の内訳.

	AUC	感度	特異度
THB4	0.796	91%	62%
RBP4	0.680	50%	85%
THB4+RBP4	0.862	91%	66%

### (3) 病期診断の検討

血清 HPF4 測定では、DLB 群, 非 DLB 群においての有意差は認めていなかった。しかし、DLB 群において縦断的な変化を検討すると、時間の経過で血清 HPF4 値は上昇していた。血清 HPF4 は病期診断に有用であると考えられた。

血清 THB4 と RBP4 は縦断的には下がる例が多く、診断マーカーとしての意義が大きいと考えられた。

### (4) 考察

本研究の利点として、神経変性疾患のバイオマーカーとして汎用されている脳脊髄液ではなく、採取が容易である血液サンプルを使用したことで設備を整った施設でなくても容易に測定が可能である。そして、市販の ELISA キットを使用して測定が可能であり、臨床応用の際の汎用性が簡便である。よって、臨床応用の際には一般外来などでスクリーニングとして行う検査としての活用が期待できる。

THB4 は神経疾患においては Creutzfeldt-Jakob disease の脳脊髄液中の上昇や、血液中では冠動脈疾患や肝疾患での上昇の意義が報告されている。本研究では血清 THB4 は DLB 群において AD, PD, CTL 群より高値であった。一方で血中 RBP4 はメタボリックのバイオマーカーとして糖尿病に関連して上昇することが知られており、他にも膠原病, 悪性腫瘍, 肝疾患での上昇, 低下について報告されている。本研究では血清 RBP4 は DLB 群では上昇, AD 群では低下を示していた。これらのマーカーの DLB のおける臨床的な意義や病期や重症度との関連を調べることで診断マーカーとしての有用性を高めることができる。血清 HPF4 は血小

板活性因子であり凝固系や炎症などに関連したマーカーであることが知られている。今回の検討で、血清 HPF4 自体は DLB 群にて有意に高いことは認められなかった。しかし、DLB 群で縦断的に測定すると徐々に上昇していくことが判明した。

血液バイオマーカーを使用するに当たっては、他疾患や急性・炎症性疾患, 治療などの影響を受けやすい。そのため、単独のバイオマーカーではなく、複数のバイオマーカーを組み合わせることで、他要因による偽陽性・偽陰性の影響を受けにくい診断マーカーを確立が可能となると考えられる。

このたび SELDI-TOF MAS 解析により、DLB の血清中で高値である候補蛋白を同定した。その中で、血清 THB4 と RBP4 の結果から、DLB の診断バイオマーカーとなる可能性が示された。血清 HPF4 は病期や重症度診断に有用であると考えられるが、個々人の変化の追跡には有用であるも個体差による値の違いが大きく、血清 THB4 と RBP4 とうまく組み合わせる必要があると考えられた。

今後、これらのバイオマーカーの臨床的意義確立のための臨床情報を生かした縦断的な検討が必要である。また血液バイオマーカーの使用に際しては疑陽性・偽陰性も増えるため、複数のバイオマーカーを組み合わせることで診断精度を高めていくことが重要である。

### 引用文献

- 1) Wada-Isoe K et al. Prevalence of dementia in the rural island town of Ama-cho, Japan Neuroepidemiology 2009;32:101-106
- 2) 和田健二 他. シヌクレオパチーの疫学と臨床
- 3) Wada-Isoe K et al. Serum proteomic profiling of dementia with Lewy bodies: diagnostic potential of SELDI-TOF MS analysis. J Neural Transm. 2007;114:1579-1583

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3 件)

中下 聡子, Thymosin 4 and Retinol binding protein 4 as potential serum biomarkers for diagnosis of dementia with Lewy bodies. Alzheimer's Association 2013 International Conference. 2013/7/15. Boston(USA)

中下 聡子, レビー小体型認知症の血清バイオマーカーの有用性、臨床的意義の検討、第 53 回日本神経学会総会、2013 年 6 月 1 日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

中下聡子、レビー小体型認知症の血清バイオマーカーの検討、第52回日本神経学会総会、2012年5月24日、東京国際フォーラム（東京都・千代田区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中下 聡子 (NAKASHITA Satoko)  
鳥取大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00569270