

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591686

研究課題名(和文)生物学的意義の異なる複数バイオマーカーを組み合わせた認知症鑑別及び早期診断

研究課題名(英文)Differential and early diagnosis of dementia using distinct plasma biomarkers

研究代表者

相馬 仁(Sohma, Hitoshi)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：70226702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：認知症診断の上で客観的に補助的役割を担う血漿マーカーを検討した。本研究で214名の認知症患者(AD150名、DLB50名、MCI14名)、高齢者鬱病患者(6名)、健常高齢者(387名)から血液検体を得た。候補マーカーアネキシンA5の血漿中濃度はAD、DLB患者で健常高齢者と比較して有意に高かった。もう一つの候補マーカーMFG-E8もADで高くなることが示唆された。更に、認知症のない鬱の高齢者においてアネキシンA5濃度は、健常高齢者と変わらなかった。一方、MCI患者14名のアネキシンA5濃度は、健常高齢者と比較して有意に高く早期診断に有用となる可能性があり、血漿マーカーとしての有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated plasma biomarker for subsidiary role on diagnosis of dementia. Plasma samples were obtained from 150 AD patients, 50 DLB patients, 14 mild cognitive impairment (MCI) patients and 279 community-dwelling healthy elderly individuals (control). We have previously identified annexin A5 and MFG-E8 as potential plasma biomarkers. The plasma level of MFG-E8 tended to be elevated in AD patients than in control. The plasma level of annexin A5 was significantly higher in both AD and DLB patients than in control. This suggests that annexin A5 is a common marker for both AD and DLB, which implies the probability of a pathological aspect of overlapping of AD and DLB. Interestingly, the level of plasma annexin A5 was also significantly higher in MCI patients than in control. This suggests that annexin A5 was elevated an early stage of the onset of AD and/or DLB and might contribute to early diagnosis of the disease.

研究分野：分子病態学

キーワード：血漿バイオマーカー、アネキシンA5 MFG-E8 アルツハイマー病 レビー小体型認知症 軽度認知障害

## 1. 研究開始当初の背景

我々はかつてない高齢化社会を迎え、それに伴い認知症患者の増加が社会の課題となって押し寄せてきている。認知症の正確な早期診断と科学的根拠に立つ予防は、本人のみならず家族や介護者等、患者を取り巻く関係者の負担と経済的な負担の軽減につながる取り組みとして重要であることは論を俟たない。

認知症の50%以上を占める**アルツハイマー病(AD)**の診断には、NIA-AA, NINCDS-ADRDA, ICD-10, DSM-IVをはじめとする複数の診断基準があり、またMRI, SPECT, PETによる画像診断は、正確な診断に大きな貢献をしている。しかし、多くの医療過疎地域を抱える我が国では、何処でも簡単に画像診断を受けることはできず、また、個人の経済的負担が大きくなる。更に、患者数の多さに対して専門医数が少なく、確定診断の困難さが指摘されている。

このような状況の中、客観的診断に繋がる**バイオマーカー**への期待は大きい。バイオマーカーの探索には、分子生物学的研究結果を基盤にした戦略がとられ、これまでに異常代謝産物(42残基ペプチドやA<sub>42</sub>)やTAUの蓄積など、有力なものが複数報告されている。しかし、それらはいずれも、脳脊髄液(CSF)に存在するマーカーである。CSFの採取は侵襲性が高く、簡便ではなく、検査を一般化するにはハードルが高すぎる。それに比して血液採取はより侵襲性が低く、一般に受け入れやすく、**血漿バイオマーカー**が存在すると非常に有用である。血漿バイオマーカー探索は、世界中で試みられてきているものの、現在のところ有効ものは認められていない。その理由の一つに血漿には、アルブミンをはじめとする主要成分とマーカー候補になると考えられる微量成分の濃度差が非常に大きく、直接解析することは不可能であるためである。

## 2. 研究の目的

認知症の代表であるアルツハイマー病の診断を血漿マーカーによって客観的で簡便な診断に結びつけることを目指した。この目的のために、すでに明らかにした候補マーカー及び新規マーカーの探索により、複数マーカーを用いて、より精度の高い方法を提案することである。そして、レビー小体型認知症、高齢者鬱患者の血漿サンプルを用い、複数マーカーの特異性を検討した。更に、健常者と認知症の人の中間の段階(グレーゾーン)にあたる軽度認知障害患者の血漿についても

検討し、候補血漿マーカーの早期診断へ可能性を検討した。

ひいては治療効果の評価、増大するAD患者数に対応する専門医の負担軽減への貢献を目指していくことが最終目的である。

## 3. 研究の方法

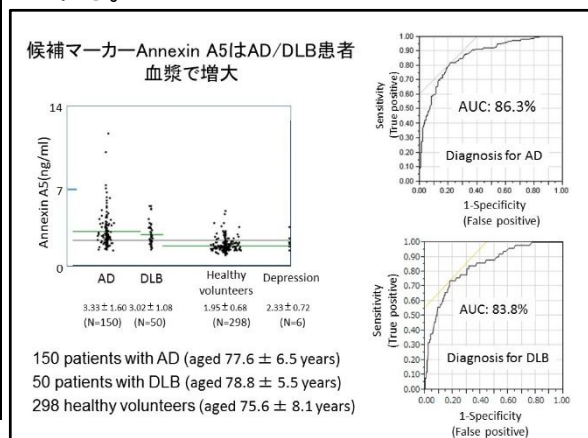
ヒト血液の採取の際には、札幌医科大学臨床研究審査委員会の審査を受け、承認を得た。研究協力者である老年精神医学の専門医による、臨床的判断に基づいた正確な診断がなされた214名の認知症患者の血漿を用いた。内訳は、アルツハイマー病(AD)150名、レビー小体型認知症(DLB)50名、軽度認知障害(MCI)14名)である。また、認知症のない高齢者鬱患者(6名)と、コントロールとして近隣の老人クラブから387名の健常高齢者に協力をお願いし血液検体を得た。

血漿には、アルブミンをはじめとする主要成分とマーカー候補になると考えられる微量成分の濃度差が非常に大きく、 $10^{12}$ 倍以上になることが明らかになっている。従って、直接解析することは不可能であるため、我々は初代培養神経細胞を用いる方法を取り、複数の候補マーカーを得ている。

アネキシンA5の定量は、モノクローン抗体を作製し、そのうちの2種の抗体を用いて、Chemiluminescent Enzyme Immunoassay (CLEIA)法 (SphereLight assay)を確立して行った。

## 4. 研究成果

すでに我々が明らかにした候補マーカー(アネキシンA5)血漿中濃度はADで $3.33 \pm 1.61$  ng/ml、DLBで $3.02 \pm 1.08$  ng/mlで、健常高齢者の値( $1.88 \pm 0.69$  ng/ml)と比較して有意に上昇していた。ADとDLBは類似した症状を示すことや、同様の治療薬が使われることから両者の共通性が示されていることが、血漿マーカーアネキシンA5からも示唆される。



アネキシン A5 濃度は年齢と共に上昇することが健常高齢者において明らかになったが、AD/DLB 患者と比較すると有意に低い値であった。更に、認知症のない鬱の高齢者において血漿アネキシン A5 濃度は  $2.33 \pm 0.72$  ng/ml で、健常高齢者と同程度であった。高齢者において鬱の症状が認知症で認められることも多く、診断を困難することが報告されている。血漿アネキシン A5 濃度から両者を区別できる可能性を示している。

一方、MCI に関して、その診断後 1 年に 10-15% が認知症に移行し、さらに年月を追うごとのこの割合は増大することが報告されている。今回、MCI と診断された 14 名の患者血漿のアネキシン A5 濃度を測定した結果  $3.43 \pm 1.45$  ng/ml で、健常高齢者と比較して有意に高いことが明らかになった。一度、MCI の診断を受けることで、対象者は認知症へと移行するかもしれないという精神的な苦痛を強いられることになるため、予後予測に有用な因子となる可能性がある。アネキシン A5 は血漿バイオマーカーとして早期の AD/DLB 診断に使える可能性がある。

血漿Annexin A5濃度 (ng/ml)

type	数	平均	標準偏差
AD	150	3.33	1.61
DLB	50	3.02	1.08
Control	387	1.88	0.69
MCI	14	3.43	1.45

Significantly different between Control and AD, DLB, or MCI

我々は、アネキシン A5 以外に新規 AD バイオマーカー候補として Milk Fat Globular Protein EGF-8 (MFG-E8) を明らかにしていた。AD モデル動物 (Tg2576 マウス) を用いて、抗 MFG-E8 による脳標本の蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、MFG-E8 は A $\beta$  ペプチドの蓄積のある老人斑の大小に関わらず、その核を成すように内部に染まる像が得られ、特徴的な局在があった。この特徴は他の AD モデル動物 (APP<sup>swe</sup>/PS1 マウス) においても同様の結果を得た。すなわち、MFG-E8 は老人斑の核を形成し A $\beta$  がその核を取り巻く局在をすることが確かめられた。更に、市販の ELISA キットにより AD 患者と健常者それぞれ 20 名の血漿における MFG-E8 濃度を測定した。その結果、AD で健常高齢者に比べて有意に高くなることがわかった。この測定には 20 名という少ない検体数での解析であるので、より多くの検体数を用いて解析する必要がある。

## 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)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Significant increase of plasma tetranectin in ovx mice as defined by proteomics analysis. Sasaki K, Ozasa Y, Iba K, Wada T, Imai S, Matsumoto K, Sohma H, Aoshima M, Yamashita T, Kokai Y. J Orthop Sci 19(5): 809-819 (2014). (査読有) DOI: 10.1007/S00776-014-0586-3
2. Consensus paper of the WFSBP task force on biological markers: biological markers for alcoholism. Hashimoto E, Riederer PF, Hasselbrock VM, Hasselbrock MN, Mann K, Ukai W, Sohma H, Thibaut F, Schuckit MA, Saito T. World J Biol Psychiatry 14(8):549-564 (2013) (査読有) DOI: 10.3109/15622975.2013.838302
3. Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies. Sohma H, Imai S, Takei N, Honda H, Matsumoto K, Utsumi K, Hashimoto E, Saito T, Kokai Y. Front Aging Neurosci, 5;5:15 (2013) (査読有) DOI: 10.3389/fnagi.2013.00015
4. Effects of atelocollagen on neural stem cell function and its migrating capacity into brain in psychiatric disease model. Yoshinaga T, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Shirasaka T, Kigawa Y, Tateno M, Kaneta H, Watanabe K, Igarashi T, Kobayashi S, Sohma H, Kato T, Saito T. J Neural Transm 120(10):1491-1498 (2013) (査読有) DOI: 10.1007/s00702
5. Pulmonary surfactant protein A protects lung epithelium from cytotoxicity of human  $\beta$ -defensin 3. Saito A, Aiki S, Sohma H, Nishitani C, Inoue K, Ebata N, Takahashi M, Kuronuma K, Takahashi H, Kuroki Y. J Biol Chem, 287(18):15034-15043 (2012) (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M111.308056
6. Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by proteomics. Oki G, Wada T, Iba K, Aiki H, Sasaki K, Imai S, Sohma H, Matsumoto K, Yamaguchi M, Fujimiya M, Yamashita T, Kokai Y. Pain. 153(3): 532-539 (2012)

(査読有) DOI:  
10.1016/j.pain.2011.11.008

〔学会発表〕(計 5件)

1. Takahashi Y, Yamamoto T, Naishiro Y, Shiratori M, Sato T, Akasaka H, Kameda M, **Sohma H**. Effectiveness of Community-Based Interprofessional Education in the First Academic Year 2014 Oct. 30<sup>th</sup>: Weihei, China.
2. **Sohma H**. Community health care training to establish greater Mutual understanding between medical students and the community. "Transformative Learning for Health Equity" 2014 Jan. 29<sup>th</sup>: Pattaya, Thailand.
3. **相馬仁**. 認知症血漿分子マーカーの解析. 病理談話会 2012 Oct. 13<sup>th</sup>: 札幌医科大学、札幌
4. **相馬仁**. アルツハイマー病血漿分子マーカーの解析. 特別講演、第49回日本生化学会北海道支部例会 2012 July 20<sup>th</sup>: 北海道大学、札幌
5. **Sohma H**, Imai S, Matsuki K, Takei N, Honda H, Utsumi K, Hashimoto E, Saito T, Kokai Y. Investigation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies. Keynote Lecture. 3rd International Conference on Biomarkers & Clinical Research 2012 July 2<sup>nd</sup>: Las Vegas, U.S.A.

〔図書〕(計 2件)

1. 横山まどか、**相馬仁**. 滞在実習で育む地域医療マインド. 特集 IPE の達成とこれから 「地域で学ぶ」を中心に. 看護教育 pp122-128、2015
2. **相馬仁**. 生物学的マーカー(バイオマーカー). 新しい診断と治療の ABC83(別冊)アルコール依存症第3章 診断、最新医学・別冊 pp75-84、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 1件)

名称: 親油性分子で表面修飾された温度応答性磁性微粒子および該微粒子と両親媒性分子を含むリポソーム様構造体を形成する組成物.

発明者: 小海康夫、**相馬仁**.

江口優、大西徳幸.

権利者: 北海道公立大学法人札幌医科大学  
JNC(株)

種類: 特許

番号: 第5565546号

出願年月日: 平成20年9月12日

取得年月日: 平成26年6月27日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://web.sapmed.ac.jp/cme/d\\_meded/kyouiku/sohma.html](http://web.sapmed.ac.jp/cme/d_meded/kyouiku/sohma.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相馬 仁 (SOHMA HITOSHI)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号: 70226702

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: