

論文の内容の要旨

論文題目：

脂質網羅的分析法の開発とアルツハイマー病バイオマーカー探索への応用

氏名： 佐藤 義明

[要旨]

アルツハイマー病 (AD) は発症原因が未だ不明で適切な診断法や根本治療がなく、最もアンメットニーズの高い疾患に位置づけられているのが現状である。最近、AD の原因物質であるアミロイドβの脳内沈着を視覚化・定量化する診断用放射性医薬品や、神経変性の指標となる脳脊髄液 (CSF) 中のリン酸化タウ蛋白 (p-Tau) 濃度の測定キットが体外診断薬として承認を受けた。しかしながら、脳画像診断は、放射性同位体元素を作り出すサイクロトロンを施設内あるいは施設の近傍に保有することが必須であり、しかも PET 装置も高額なことから、極限られた病院でしか実施できない。一方の p-Tau の測定においては侵襲性の高い脳脊髄液の採取が伴うことから個人病院への波及性は乏しい。さらに両バイオマーカーの診断指標は、認知機能との相関も低いことから AD の進行度や薬の有用性を判定することは難しい。このような背景から、低侵襲性の早期診断ならびに日常診療における診断補助や薬効の指標となる客観的バイオマーカーが強く望まれている。

生体内において内因性代謝物は、様々な疾患において遺伝子やタンパク質の異常発現を反映し、表現型変化に直結するものと考えられている。このことから、近年、疾患関連パスウェイ、バイオマーカーの同定および治療薬の作用機

序解析を目的として、内因性代謝物の網羅的解析が多くの研究機関で実施され注目を浴びている。一方で、AD と脂質の関連性は非常に強く、数多くの報告があり、例えば、リン脂質 (PLs) は神経伝達やイオンチャネルの働きなど、脳の機能に強く関連し、またガングリオシドはシナプスの形成や神経突起の伸長に関与していることなどが報告されている。

そこで我々は、低侵襲性の AD バイオマーカー探索を目的として、AD と密接に関連していると考えられる内因性の脂質分子に着目し、網羅性が高く再現性に優れた脂質分析法を開発すると同時に、記憶機能向上モデルマウスの脳や低侵襲性試料であるヒト血漿を用いた脂質網羅的解析を行うこととした。

先ず初めに、PLs, ガングリオシドの網羅的分析法を検討した。一般的に、脂質を分析する際、試料中の夾雑物質あるいは脂質代謝物が多量に含まれる場合には、検出器である MS においてイオン化抑制が生じ、特に存在量が少ない脂質分子の同定および再現性の確保が困難となる。そこで我々は、PLs の分析の前処理段階で夾雑物質、PLs の中でも存在量の多いフォスファチジルコリン、存在量の中程度のフォスファチジルエタノールアミン (PE) および存在量の少ない酸性 PLs を効率的に分画し、得られた各画分を逆相系 HPLC にて測定する PLs の二次元分離法を確立した。同時に、酸性 PLs の逆相系 HPLC 分析時に見られるピークのテーリングや抽出時の回収率の改善にも成功した。さらに、この分析法の有用性を確認するため、従来法と比較した結果、本分析法はより多くの PLs を同定し、優れた精度を確保できる分析法であることを明らかにした。次に、ガングリオシドの網羅的分析法を検討し、イオン交換カラムによる中性脂質や塩基性 PLs の選択的除去法の確立により、再現性に優れ、網羅性を確保したガングリオシドの分析法の確立に成功した。

刺激の豊かな環境で飼育したマウスやラットは、神経伝達物質の分泌や神経可塑性などの亢進から、脳における構造変化、学習および記憶能力が促進することが知られている。そこで記憶機能に関連する脂質代謝物を同定するため、刺激豊かな環境下で飼育した記憶機能が向上したマウスを用いて脳内リン脂質およびガングリオシドの網羅的解析を行った。その結果、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 結合型 PLs がマウスの大脳皮質にて特異的に減少していることが明らかとなった。一般的に、脳内における DHA 結合型 PLs は DHA の主な貯蔵形態であり、また DHA は神経系の発達において重要な働きを示すことが知られているという報告などがあることから、本研究で確認された DHA 結合型 PLs の変化は、記憶機能と DHA 代謝の関連性を支持するものと考えられた。以上の結果から、記憶機能が低下しているヒトにおいても DHA 結合型 PLs および関連代謝物の挙動が変化する可能性があるとの仮説を立てた。

そこで次に、AD バイオマーカー探索を目的として、AD 患者の血漿による PLs の網羅的解析を行った。その結果、DHA 結合型 PLs は、ヒト血漿では変動しな

かった．一方で，健常者と比較して AD 患者にて有意に変動するピークが新たに 31 個確認された．健常者と比較して MCI 患者および AD 患者で顕著に変動するピークについて同定したところ，リゾ PE (18:1) が AD で減少する分子として同定された．リゾ体を生成する酵素が AD 患者の脳内にて減少する報告があることから，リゾ PE (18:1)は AD の早期ステージを予想出来る血漿中バイオマーカー候補と考えた．続いて，AD 患者の血漿中で変動する PLs の再現性を確認するため，異なる対照群で解析した．その結果，先の 31 個のピークのうち 4 つについては，健常者と比較して AD 患者において変動する傾向を示したが，統計学的に有意な変動ではなかった．

以上，新たに開発した網羅的分析法を活用することにより，記憶機能や AD との関連性が示唆される DHA 結合型 PLs やリゾ PE (18:1) などの脂質分子が記憶機能に差のあるモデルマウスの脳内や AD 患者の血液で変動することを見出した．AD 患者の血液を用いた研究においてコホート間で異なる結果が得られた原因として，患者の多様性および血液採取条件が施設間で異なることが示唆され，マーカーとしての可能性を更に追求するためには，適切な患者情報の獲得や，サンプル採取法から分析法に至る標準化が今後の課題と考えられる．さらに，代謝物の挙動が動物モデルとヒトで乖離することが見いだされ，探索段階から低侵襲性のヒト試料を直接使用し AD バイオマーカーを探索する重要性も同時に示唆された．

そこで次に，直接ヒトの試料を使用したバイオマーカー探索に着手した．先の検討から，PLs 群から再現性のよい血漿中 AD バイオマーカーを見出すことは難しいと考え，PLs 以外の脂質分子群について検討することにした．これまで，AD の発症や進行に関わる因子としてコレステロール代謝の異常が報告され，AD との関連性が注目されている．これは，コレステロール関連代謝物を測定することで新規な AD バイオマーカーを見出す可能性を示唆するものである．そこで，新規 AD バイオマーカーを見出すことを目的としコレステロール代謝物やその前駆体に着目した網羅的分析法を LC/MS にて構築すると同時に，ヒト試料での AD バイオマーカー探索に適用することとした．種々の検討の結果，LC/MS の検出器に大気圧化学イオン化法を採用することにより煩雑な誘導体化の必要もなく，コレステロールの前駆体およびその代謝物を高い網羅性の分析法を構築した．続いて，構築した分析法を用いて，白人健常者と AD 患者の血漿を用いて AD バイオマーカー探索を実施したところ，AD 患者にてデスモステロールが有意に減少することが判明した．AD 患者での血漿中デスモステロール濃度の減少は，別のコホートである白人 109 例の試験においても同様の結果が得られ，再現性の高いバイオマーカーであることが明らかとなった．さらに，血漿中と CSF 中のデスモステロール濃度には良好な相関があり，CSF や海馬においてもデスモステロールが減少することを確認した．以上の結果から，血漿中デスモステ

ロールは AD 患者の中樞神経系におけるコレステロール代謝異常を反映する血液中の AD バイオマーカーである可能性が示唆された。

2010 年に Kölsch らは、既にドイツ人のコホートを用いガスクロマトグラフィー／質量分析計 (GC/MS) にて血漿中デスモステロールを測定し、AD 患者において変化がないことを報告している。一方で、我々の研究では血漿中デスモステロールは AD 患者で減少することを確認し、Kölsch らの結果とは矛盾する。そこで、この原因として双方の研究の大きな相違点である分析法に着目した。種々の検討の結果、彼らの GC/MS 法はデスモステロールと夾雑物質との分離が不十分であり、デスモステロールを正確に定量できていないことを確認したことから、我々の結果との乖離は分析法の妥当性によるものであることが明らかになった。

次に日本人の AD 患者 200 名と健常者 201 名の血漿を用いて、AD バイオマーカーとしてのデスモステロールの妥当性を検証した。その結果、デスモステロールは日本人を対象とした研究でも AD で有意に減少した。更に本マーカーは APOE 遺伝多型や年齢との関連性は低く、また MMSE スコアと関連のあることが明らかとなった。そこで、さらに詳細に認知機能との関連を検討するために、AD 患者の MMSE スコアと血漿中デスモステロールの経時的変化を追跡した。その結果、追跡期間中に MMSE スコアが大きく低下する患者群において、血漿中デスモステロール濃度がより顕著に減少することが判明したことから、デスモステロールは認知機能の変化を反映するバイオマーカーであることが強く示唆された。

以上、生体内の PLs, ガングリオシドおよびコレステロール関連代謝物の高い網羅性と再現性に優れた分析法を確立した。この脂質網羅的分析法は、バイオマーカー探索に有用であり、更に、これまでの知見に新たな情報を付与できる可能性が示唆された。また、開発した手法を AD バイオマーカー探索に応用することで、認知機能と関連するデスモステロールが AD の新規の血中バイオマーカーとして同定することができた。本検討で見出した血漿中デスモステロールの挙動を把握することにより認知機能を客観的指標で予測できる可能性があることから、臨床有用性は極めて高く、さらに創薬現場での本バイオマーカーによる患者の層別化や薬の効果のモニターの可能性を示唆し、AD の臨床研究への効率化に大きく貢献できるものと考えられる。