

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 義明

現在日本において、認知症患者の増加は医療および社会経済学的な問題の1つになっている。認知症患者の約7割をアルツハイマー病（AD）が占めており、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。AD診断の指標として、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濃度の測定キットが体外診断薬として承認を受けている。しかし、この2つの診断手法には以下の課題を抱えている。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装置が高額なことから、極限られた病院でしか実施できない。また、リン酸化タウ蛋白濃度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も知られおり、医療現場や創薬現場でこれらバイオマーカーを指標に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医療現場および創薬現場において、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。

近年、疾患関連パスウェイに基づく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、ADと脂質の関連性には数多くの報告がある。このような背景のもと佐藤は、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を本研究の目的とした。

まず佐藤は、リン脂質（PLs）、ガングリオシドおよびスルファチドの網羅的分析法を検討した。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が困難となる。そこで佐藤は、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、フォスファチジルエタノールアミン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。さらに佐藤は、この分析法の有用性を確認するため従来法と比較し、本分析法がより多くの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。次に佐藤は、ガングリオシドとスルファチ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とスルファチドの分析法の確立にも成功した。

刺激の多い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。そこで佐藤は、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、ガングリオシドおよびスルファチ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を明らかにした。脳内におけるDHAの主な貯蔵形態はDHA結合型PLs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。通常の飼育マウスへのDHAの長期投与は刺激の豊かな環境で飼育したマウスとの記憶機能の差が減少させるという報告があることから、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。以上の結果から佐藤は、記憶機能が低下している AD 患者においても 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。

次に佐藤は、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ところ、記憶機能が向上したモデル動物での変化が認められた DHA 結合型 PLs は、ヒト血漿では変動しないという結果を得た。一方で佐藤は、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 個確認した。その中で健常者と比較して 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、オレイン酸を持つリゾホスファチジルエタノールアミン(リゾ PE (18:1))が AD で減少する分子として同定した。PLs から 1 つの脂肪酸が遊離したリゾ PLs は、AD で関連の深い炎症に関わっており、またリゾ体を生成する酵素であるホスファリパーゼ A2 が AD 患者の脳内にて減少することが報告されている。このことから佐藤は、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 (AD 患者、MCI 患者および健常者の各 10 名) で解析した結果、リゾ PE 18:1 を含む 4 つのピークについては、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は認められなかった。

次に佐藤は、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した。これまで、AD の発症や進行に関わる因子として酸化ストレス、炎症、アポリポタンパク質 (APOE) ϵ 4 の存在およびコレステロール代謝の異常などが報告され、特に疫学のおよび分子生化学的エビデンスからコレステロール代謝と AD の関連性が注目されている。そこで佐藤は、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。続いて佐藤は、構築した分析法を用いて、白人健常者と AD 患者の各 10 名の血漿を用いて AD バイオマーカー探索を実施したところ、AD 患者にて有意に減少するピークを一つ見出した。本ピークを精密質量とカラムへの保持時間の情報を基に同定した結果、このピークはコレステロールの前駆体であるデスモステロールであることを明らかとした。さらに、AD の中枢神経系におけるデスモステロールの変化を検討した結果、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。以上の結果から佐藤は、血漿中デスモステロールは AD 患者の中枢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を示唆した。

次に 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するために、日本人の AD 患者 200 名と健常者 201 名の血漿を用いて、AD 患者と健常者の比較および APOE 遺伝多型、年齢および認知機能との関連性について評価した。その結果、デスモステロールは日本人を対象とした大規模な横断研究でも同様に AD で有意に減少することを見出した。さらに、デスモステロールは APOE 遺伝多型や年齢との関連性は低く、AD にて変動するバイオマーカーであること、また MMSE スコアと相関のあることを明らかにした。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。その結果佐藤は、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を見出した。健常人を対象とした場合では MMSE とデスモステロールの値はほぼ一定であったことから、血漿中デスモステロールは認知機能の変化を反映する AD バイオマーカーであることを強く示唆した。

生体内においてデスモステロールは DHCR24 という酵素により、コレステロールへと代謝される。この DHCR24 活性は、プロゲステロンなどのニューロステロイドにより阻害され、一方で、

ADの脳においてニューロステロイドが減少することも報告されている。これらの報告から、本研究により佐藤が明らかにしたADにおけるデスモステロールの減少は、ニューロステロイドの減少に伴うDHCR24活性の亢進が原因の一つと考察した。さらに、デスモステロールはミエリン形成に重要な役割を担い、LXRのリガンドとして、さらにNFκBの活性化を抑制することが報告されている。したがって脳内のデスモステロールの減少は、記憶形成の低下、AD関連タンパクの変動によるアミロイドβの産生亢進、さらには炎症の惹起に影響すると考えられていることから、ADの発症や進行に関与していると推察した。

以上本研究において佐藤は、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、認知機能と相関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。これは、臨床研究における血漿中デスモステロール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、本研究は医学薬学領域において極めて重要な研究であり、博士(薬学)に充分値するものと判断した。