

「研究テーマ名」

認知症における新規血中バイオマーカーの探索 ～炎症誘導性マイクロRNAの意義～

神戸大学大学院 保健学研究科 吉田 幸祐

## 1 研究の背景と目的

令和7(2025)年には我が国の認知症患者は約700万人に達し、65歳以上の高齢者の約5人に1人が認知症を発症すると見込まれている。令和5(2023)年12月に、認知症の診断、特にアルツハイマー病を診断するための検査としてPET検査(アミロイドPET)と髄液検査(アミロイド $\beta$  42/40比)が新規保険適用された。しかしPET検査は、高価であること、被爆が避けられないこと、実施施設に限られること等、課題がある。また髄液検査についても、腰椎穿刺を施行できる医師に限られること、侵襲性が高く被検者の負担が大きいため、経過観察のために受診毎に実施する検査材料ではない。認知症の診断や予後予測する血液バイオマーカーについては未だエビデンスレベルが低く、一定のコンセンサスを得られていない現状を踏まえると、貴重な髄液材料の情報を反映し、認知症の発症や予後予測できる簡便な血液バイオマーカーに対する期待値は非常に大きい。

背景病理がアルツハイマー病である認知症(アルツハイマー型認知症;以下AD)では、(i)認知症状として昼夜逆転といった概日リズムの破綻を認めること、また(ii)脳脊髄液において炎症性サイトカインが増加することが知られる。

我々は、まず(i)に関連して、慢性炎症性疾患である関節リウマチにおける概日リズムの制御機構を研究してきた。その結果、概日リズムを生み出す時計遺伝子の発現と関節炎の発症に密接な関係があることを見出した(*J Immunol.* 2010;184(3):1560-5.)。さらに(ii)に関連して、関節リウマチ滑膜細胞において、炎症性サイトカインTNF $\alpha$ が時計遺伝子調整因子であるPAR-bZip(proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper) familyを減少させることを見出した(*Scand j rheum.* 2013;42(4):276-280)。興味深いことに我々がターゲットとしたmiRNAの1種は、本遺伝子の3'未翻訳領域を介して遺伝子発現を調節する可能性があり、miRNAは時計遺伝子の発現調整を介して炎症を誘導する重要な因子となりうる可能性が示唆された。

以上を総じて考えると、アルツハイマー型認知症の病態理解において、「アミロイド $\beta$ 、タウ蛋白」だけでなく、「miRNA」「炎症」「時計遺伝子(概日リズム)」が鍵となる可能性がある。

そこで我々は、「炎症性miRNA(または抗炎症性miRNA)は、認知症の発症や進行、予後を予測するバイオマーカーになりうるか?」についての検証に取り掛かった。

## 2 研究方法・研究内容

今回、下記2点について評価を行った。

- (A); 認知症を診断できる(鑑別できる)バイオマーカーの探索
- (B); 認知症の進行を予測できるバイオマーカーの探索

**対象:** 共同研究施設である兵庫県立リハビリテーション西播磨病院にて、軽度認知障害(Mild Cognitive Impairment; MCI)と診断された方のうち、腰椎穿刺による髄液検査を実施される方を対象とした。本研究は、神戸大学大学院保健学研究科なら

びに兵庫県立リハビリテーション西播磨病院の倫理委員会の承認を得て実施されたものである。

**検体採取：**脳脊髄液は滅菌スピッツに採取し、1900 x g、4℃で10分間遠心し、上清を別容器に分注した後、脳脊髄液中のアミロイドβ40/42やリン酸化タウ蛋白、総タウ蛋白をCLEIA法(外部委託)により測定した。またmiRNA解析用の脳脊髄液は測定まで-80℃に保存した。静脈血はEDTA-2Na採血管に採取し、1900 x g、4℃で10分間遠心した後、血漿を別容器に分注し、さらに3000 x g、4℃で15分間遠心した。得られた血漿を別容器に分注し、測定まで-80℃に保存した。

**miRNA抽出：**miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて血漿または髄液各200μlからmiRNAを含むTotal RNAの抽出を行った。Spike Inコントロールとしてcel-miR-39を使用し、 $5.6 \times 10^8$ コピー/検体となるように、各検体へ添加した。

**逆転写・リアルタイムPCR：**抽出したmiRNAをTaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher scientific)を用いて逆転写し、その後Step One Plus Real-Time PCR system (Applied Bio systems, Foster City, CA, USA)を用いてリアルタイムPCR(50℃2分、95℃10分、95℃15秒・60℃60秒、40サイクル)を実施した。

**臨床データとの相関分析：**

①上記項目と認知機能の評価(Mini Mental State Examination、以下MMSE)、MRI画像を利用した海馬の萎縮度の評価(Voxel-based Specific Regional analysis system for Alzheimer's Disease、VSRAD)、など他の検査項目との相関関係の評価した。ADマーカーが陽性であるかを対象としたmiRNAによって区別できるか、ROC曲線(Receiver Operating Characteristic curve)を用いて評価した。

②初診時と再診時(6か月~1年後)のMMSEスコアを比較し、認知機能低下群と認知機能維持群に分類した。初診時のmiRNA発現量を両群において比較した。

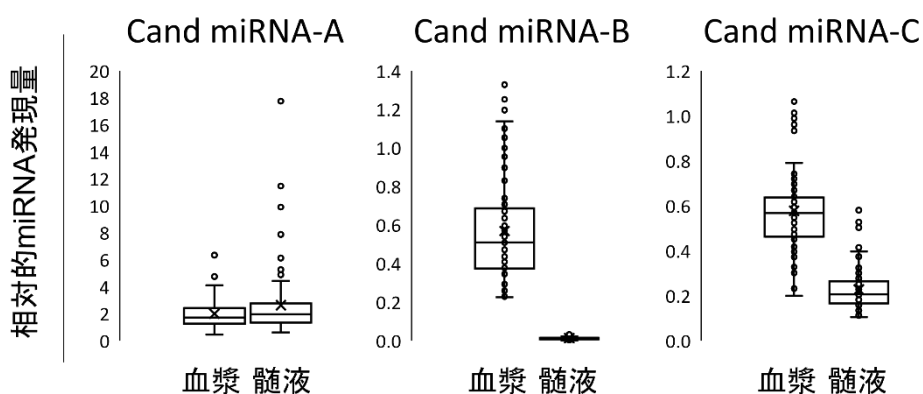


図1. 脳脊髄液中、血漿中miRNAの発現比較  
miRNAの種類により、脳脊髄液中と血漿中における発現分布は異なる。  
血漿と比較し、Cand miRNA-Aは脳脊髄液中に多く、Cand miRNA-Bや-Cは少ない。

### 3 研究成果

#### ・脳脊髄液中と血漿中のmiRNA発現量の比較

まず、炎症に関連する3種類のmiRNA(Candidate (Cand) miRNA-A, -B, -C)に焦点を当て、軽度認知障害(以下MCI)患者(総数81名)を対象として脳脊髄液と血漿中のmiRNA発現量を定量した。その結果、miRNAの種類によって、脳脊髄液と血漿に

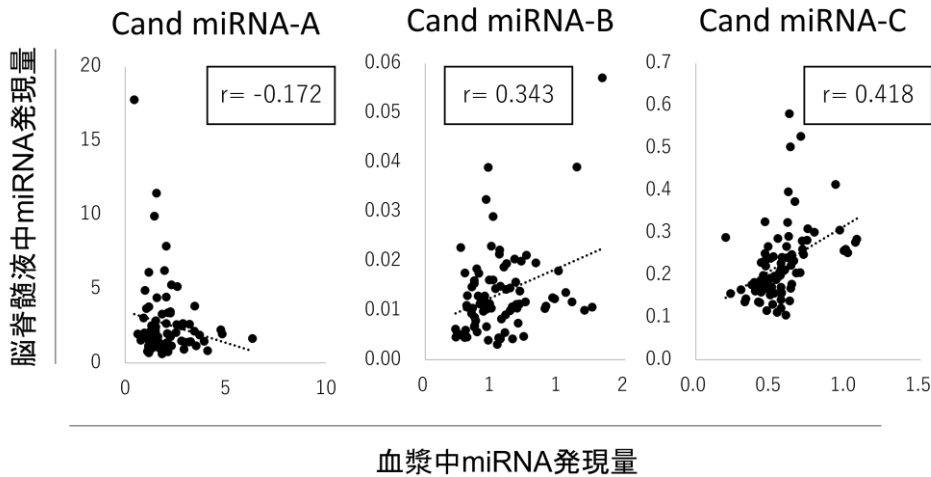


図2. 脳脊髄液中、血漿中miRNAの発現比較

おける発現量（分布）が異なることが明らかとなった。具体的には、Cand miRNA-Aは脳脊髄液において、Cand miRNA-B、-Cは血漿中において有意に発現していた（図1）。加えて、脳脊髄液中のmiRNAと血漿中のmiRNAの発現量に相関があるか評価したところ、Cand miRNA-Aは負の、Cand miRNA-B、-Cは正の相関関係にあることが明らかとなった（図2）。

・脳脊髄液中ADマーカーと脳脊髄液/血漿中miRNA発現の相関

次に、脳脊髄液中のADマーカー（アミロイドβ42/40比、リン酸化タウ、総タウ）と脳脊髄液/血漿中miRNA発現の相関を調べた。3種のmiRNAのうち、脳脊髄液中ADマーカーとの相関係数がもっとも高かったのは血漿中Cand miRNA-Cであり、脳脊髄液中アミロイドβ42/40比と正の相関、脳脊髄液中リン酸化タウ、総タウと負の相関を示した（相関係数  $r=0.3$  前後；図3）。

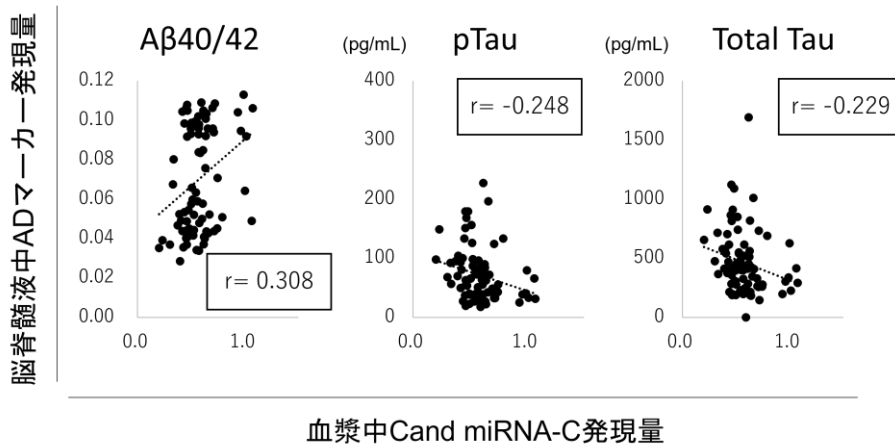
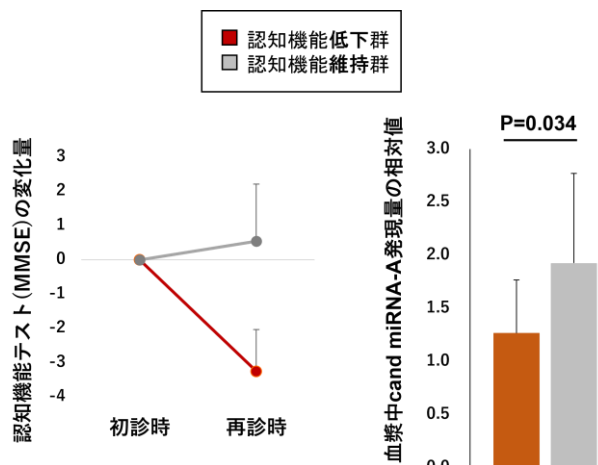


図3. 血漿中cand miRNA-Cと脳脊髄液中ADマーカーの相関

血漿中cand miRNA-Cは脳脊髄液中Aβ42/40比と正の相関、リン酸化タウや総タウと負の相関を示した。このことは、血漿中cand miRNA-Cが低値の場合、アルツハイマー病であると推測できることを示すものである。



**図4. 認知機能の変化と初診時の血漿中Cand miRNA-A発現量**  
 認知機能が低下する群では、初診時の血漿中Cand miRNA-A発現量が低下していた。このことは、血漿中Cand miRNA-Aが未来の認知機能低下を予測できるマーカーとなる可能性を示すものである。

**・血漿中 miRNA により認知機能低下を予測できるかの評価**

さらに、MCI 患者の初診時と 2 回目の受診結果から、認知機能の低下を示した群 12 名と認知機能が維持されていた群 24 名に分け、初診時の血漿中 miRNA 発現量を解析した。その結果、認知機能が低下した群は、認知機能が維持されていた群と比較して初診時の血漿中 Cand miRNA-A が有意に低下していることを見出した(図 4)。

これらの結果は、血漿中 Cand miRNA-A や Cand miRNA-C が、既存の脳脊髄液中 AD マーカーと連動、あるいは独立して認知症診断や予後予測のバイオマーカーとなる可能性を示すものであった。

**4 将来の発展性**

現在、認知症の診断、特にアルツハイマー型認知症を診断するにあたり、保険適用となる唯一の検体は髄液材料である。髄液採取は腰椎穿刺によって実施されるが、侵襲性が高く、被検者の負担が非常に大きいことから、経過観察のために受診毎に実施する検査材料ではない。今回、炎症と関わりのある 3 種類の miRNA を対象とし、脳脊髄液中 AD マーカーと連動する候補として、Cand miRNA-C を同定した。加えて、MCI から認知症に移行するかを評価できるマーカー候補として、Cand miRNA-A を同定した。これらを組み合わせることで、未来の認知機能を予測できるサービスを展開する事業につながる可能性がある。

また、今回候補とした miRNA が概日リズムにどのように作用するか、免疫担当細胞にどのような作用をするかについては今後の課題であり、引き続き検討していく予定である。