

# 尿中エクソソームタンパク測定による認知障害早期診断法開発

長井 篤

島根大学医学部 内科学第三

## 【研究の背景】

当研究室では、これまで脳ドックデータベースを使用して、AI による分析手法で軽度認知障害の人が 3 年後に認知症に進行する確率を MRI で測定する方法を確立し、認知症リスクを予知するシステムを脳ドックで使用している。一方、動物実験でアミロイド前駆体タンパクを強発現する AD モデルマウス(J20)を用いて対照マウスと比較し、iTRAQ-based MALDI TOF MS/MS(飛行時間型質量分析)法で J20 に特有の脳由来尿中エクソソームタンパクを 117 種同定し、パスウェイ解析で特に違いの強く相互作用の強いタンパクとして、ヒト AD でも重要とされるクラスτεリン、アポリポタンパク E、ネプリライシン、アンギオテンシン変換酵素などの増加が確認された。一方、当施設での脳ドックでは、脂質の LC-MS 解析や唾液採取による口腔内細菌分析方法を確立して認知症や血管障害との関連性を分析している。

## 【目 的】

脳ドックの AI 解析技術を応用して、脳ドック検体を用いて、ヒト認知症や脳血管疾患との関連性を検証する。ヒト AD 患者の尿中エクソソームを分析し、早期診断のバイオマーカーを確立することを目的として検証する。

## 【方 法】

申請者らが確立した認知症予知システムでは、頭部 MRI で大脳皮質を 246 箇所に分けて詳細な脳萎縮の分析が可能である。脳ドック受検者の尿中エクソソームで AD と関連が想定されるタンパクを測定し、脳体積変化、および認知症リスクとの関連性を検証する。また、フォローアップ検査による経時的認知機能低下との関連性を分析し、認知症早期診断のバイオマーカーによる診断システムを開発する。次に、脳ドック検体のうち、唾液を用いた検討を行った。脳小血管病に関連する無症候性脳病変と口腔内細菌叢との関連がないか検討した。2020 年 10 月から 2021 年 3 月に脳ドックを受診した 223 名のうち臨床データが得られた 140 名(男性:85 名、女性:55 名、平均年齢 64.5±11.8 歳)を対象とした。無症候性脳病変の有無については、無症候性脳梗塞(SBI)、脳室周囲白質病変(PVH)2 度以上、深部皮質下白質病変(DSWMH)2 以上、および微小出血(CMBs)いずれかを有する群を無症候性脳病変有り群(asymptomatic brain lesions: ABL)とし、それ以外の noBL 群と比較して口腔内細菌との関連を検討した。口腔内細菌は、唾液から細菌 DNA を抽出し次世代シーケンサーで網羅的に同定し、一部の歯周病菌については特異的なプライマーを用いて PCR 法で同定した。平均存在率が 1%以上であった 14 菌属を解析の対象とした。

## 【結 果】

今回 iTRAQ-based MALDI TOF MS/MS(飛行時間型質量分析)法を用いてエクソソーム解析を行う予定であったが、測定機器が故障しており、検討ができなかった。そこで、右図にあるような動物モデルで異常が想定される因子について ELISA 測定での検証を行う

パスウェイ	脳由来エクソソーム	
	タンパク名	変化量*
脂質代謝経路	酸性セラミダーゼ	1.4315
	ガラクトセラミダーゼC	0.9068
	ヘキシサミダーゼC	1.4841
Aβ代謝経路	アンギオテンシン変換酵素 (ACE)	1.5142
	アポリポタンパクE	1.2285
	クラスタリン	1.2243
	ネプリライシン	1.629

\*コントロールを1として増減を評価

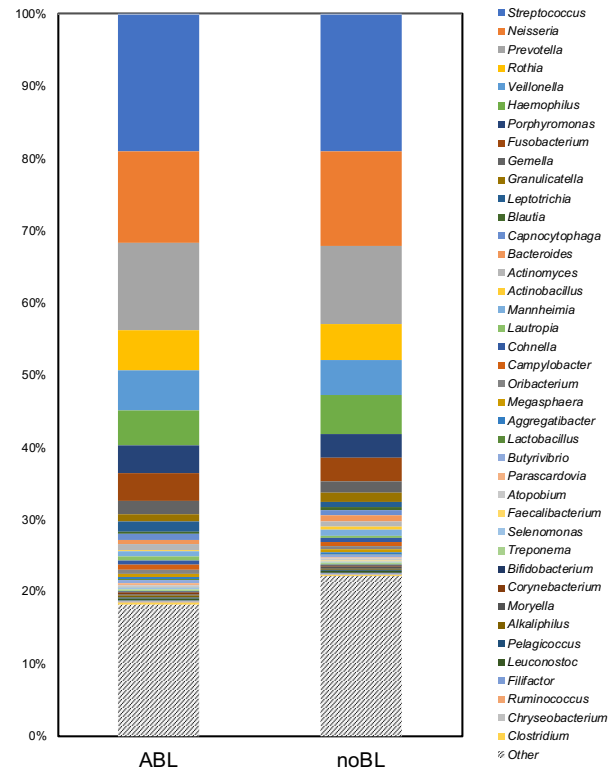
べく臨床検体を収集した。

口腔内細菌叢の研究では、研究対象の 50.7%に無症候性脳病変を認めた。単変量解析による群間比較の結果、Leptotrichia 属 ( $p = 0.007$ , Cohen's  $d = -0.461$ ) および Fusobacterium 属 ( $p = 0.013$ , Cohen's  $d = -0.424$ )は無症候性脳病変の存在と有意に関連していた。単変量解析で同定された 2 菌属および年齢と性別を説明変数としてロジスティック回帰分析を行った結果、Fusobacterium が有意に無症候性脳病変の存在と関連していた。 ( $p = 0.027$ , Odds ratio = 1.277: 図 1)。Fusobacterium 属の中でも特に *Fusobacterium* species, *F. nucleatum*, *F. naviforme*, *F. canifelinum* と ABL との関連性が有意に認められた。

### 【考 察】

ヒト臨床検体を用いてエクソソーム抽出方法の確立を行った。ELISA の測定も行えるため、順次検体を準備して測定を解析を行う予定である。

脳ドック受診者において無症候性脳病変と唾液中の Fusobacterium 属との関連が初めて確認された。



### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

ヒト検体を用いた尿エクソソーム解析は行われておらず、初めての試みであるが、今後実用化に向けて測定系を確立していくことで、実臨床での測定や臨床応用が可能と考える。脳動脈硬化進展や脳小血管病による脳機能低下などに、口腔内細菌叢が関与する可能性があり、口腔内の衛生管理により脳梗塞の発症率の低減も期待される。今後のさらなる検討が必要である。

### 【参考・引用文献】

- 1) Kato Y, Takamura M, Wada K, Usuda H, Abe S, Mitaki S, Nagai A: Fusobacterium in oral bacterial flora relates with asymptomatic brain lesions. Heliyon 10:e39277, 2024.
- 2) Omori N, Ikawa F, Chiku M, Kitamura N, Tomimoto H, Aoyama A, Shuhei Y, Nagai A. Dose-dependent Effect of Current Smoking on Enlarged Perivascular Space Identified on Brain MRI. Cerebrovasc Dis. 30:1-15, 2024
- 3) Zhang Y, Sheikh AM, Tabassum S, Iwasa K, Shibly AZ, Zhou X, Wang R, Bhuiya J, Abdullah FB, Yano S, Aoki Y, Nagai A. Effect of high-fat diet on cerebral pathological changes of cerebral small vessel disease in SHR/SP rats. Geroscience 2024. doi:10.1007/s11357-024-01074-7
- 4) Haque MA, Omori N, Sheikh AM, Yano S, Osago H, Mitaki S, Azad AK, Sakai H, Michikawa M, Nagai A: Analysis of the time-dependent changes of phospholipids in the brain regions of a mouse model of Alzheimer's disease. Brain Research, 1800, 148197, 2023
- 5) Abe S, Onoda K, Takamura M, Nitta E, Nagai A, Yamaguchi S: Altered feedback-related negativity in mild cognitive impairment, Brain Sciences, 13, 2023
- 6) Bhuiya J, Notsu Y, Kobayashi H, Shibly AZ, Sheikh AM, Okazaki R, Yamaguchi K, Nagai A, Nabika T, Abe T, Yamasaki M, Isomura M, Yano S: Neither trimethylamine-n-oxide nor trimethyllysine is associated with atherosclerosis: a cross-sectional study in older Japanese adults. Nutrients, 15, 2023

- 7) 高村真広, 長井 篤:(クリニカルトピックス)認知症発症を予測する AI 画像診断技術を拡張する試み. BIO Clinica (通巻 508 号), Vol 38, 2023, 62-65
- 8) 長井 篤:(私の Vision と経営戦略)3年後の AD 発症確率を数値化 認知症にならない未来をつくる. Vision と戦略 2023 年 8 月号(通巻 234 号), Vol 20, 2023, 2-5
- 9) Iwasa K, Onoda K, Takamura M, Takayoshi H, Mitaki S, Yamaguchi S, Nagai A:Development of a stroke risk score with MRI asymptomatic brain lesions attributes to evaluate prognostic vascular events. Journal of the Neurological Sciences, Vol 448, 2023, doi: 10.1016/j.jns.2023.120642