

マルチオミックス解析による老化と疾患に関連する  
バイオマーカー分子の探索的研究

(課題番号 23-9)

主任研究者 新飯田俊平

国立長寿医療研究センター研究所 遺伝子蛋白質解析室 室長

本研究では、血液中の生体分子の網羅的解析(オミックス)情報を基に、老化や疾患に関連するバイオマーカー分子を同定することを目的としている。

今年度は、アルツハイマー病(AD)で発現変動する分子探索と、加齢で変化する血中分子の解析を行った。患者および健常者の血漿を材料とした複数のオミックスを実施した。その結果、疾患群で発現が変動する 16 の血中 microRNA のほか、エネルギー代謝・アミノ酸代謝・グルタチオン代謝回路における7つの代謝物が疾患群で変化していることを確認した。本研究の参考とするため、AD モデルマウス脳のオミックス解析を併せて実施した。脳組織の microRNA アレイ解析では、17 の microRNA の変動を確認した。

一方、健常者のオミックス情報を用い、血中 microRNA と代謝物の加齢変動を調べた。その結果、50 代を起点として、15 の microRNA の加齢変動と、男性 14、女性 5 の代謝物の濃度に加齢変動を認めた。

【研究班】

主任研究者	新飯田俊平	国立長寿医療研究センター研究所・室長
分担研究者	渡辺 淳	同所・室長
	滝川 修	同所・室長
	徳田治彦	同病院・部長
	山本誠士	富山大学大学院・助教
	松原悦朗	弘前大学大学院・准教授
	富本秀和	三重大学大学院・教授

A. 研究目的

近年、質量分析装置(MS)などのテクノロジーとバイオインフォマティックスの発達により、創薬・診断薬開発分野では生体内分子の網羅的解析(オミックス)を基盤とした研究開発が主流となっており、発症予測・予後予測が可能な新しいタイプのバイオマーカーが誕生している。われわれは、認知症や関節疾患など、高齢期に発症する疾患の治療標的分子やバイオマーカー候補分子の同定を目指しているが、本研究課題ではアル

ツハイマー病(AD)患者血漿を材料とした多層的オミックスを実施し、発症の予測や診断に利用出来るバイオマーカー分子の探索を行っている。本年度は、おもに臨床試料の収集と試料調整法の確立を主体に研究を行ったが、一部の血漿を用いたオミックスを実施した。また患者脳の確保が困難なことから、ADモデルマウスの脳組織を用いたオミックスを行い参考となるオミックス情報の収集を行った。一方、疾患群の対照として解析した健常群のオミックス情報を二次利用し、血中分子プロファイルの加齢変化を解析し、老化の指標となる分子探索を行った。

## B. 研究方法

### 1) AD 血漿のオミックス

これまでAD群19例、MCI9例、血管性認知症4例の血漿を収集した。対照とした血漿は、人間ドック(長寿ドック)受検者のうち、とくに加療の必要ない健常者から提供されたもので、これまで81例を収集した。今年度はこれらのうち、AD9例(対照群16)のトランスクリプトーム解析、メタボローム解析を実施した。また、3例(対照群3)のプロテーム解析を実施した。

トランスクリプトーム解析として、血中のmicroRNAの発現解析を実施した。解析に用いたチップは、Agilent社のマイクロアレイチップHuman miRNA cer.14。メタボローム解析では、イオン性代謝産物を検出する、キャピラリー電気泳動装置をMSに連結したCE/TOFMSによる分析を行った。プロテオミクスでは、高感度質量分析装置LTQ Orbitrap Velos(Thermo Fisher Scientific社)によるnanoLC/MS分析を実施した。

### 2) ADモデルマウス脳のmicroRNA解析

APPトランスジェニックマウスは、ADのモデルとして利用されている。今年度は、脳内にA $\beta$ の蓄積が見られる17ヶ月齢のAPPマウスと正常マウスの脳(大脳全体)からRNAを抽出し、mouse miRNA microarray kit(Agilent社)による発現解析を行った。

### 3) 細胞由来のマイクロパーティクルの解析

最近、分泌型microRNAが注目されている。このmicroRNAは、細胞から放出されるExosomeやMicroparticle(MP)などの小包体に包まれ、血漿中に存在すると考えられている。今回われわれは、細胞から放出されるMPが実際にmicroRNAを含んでいるかを確認する目的で、培養血管内皮細胞由来MP(EMP)の検出・定量を実施した。実験に用いた細胞はマウス血管内皮細胞株b.End5細胞。EMP定量にはフローサイトメトリー法を用いた。microRNAの解析は上記同様の方法で行った(分担研究報告書を参照)。

### 4) 血中分子プロファイルからの老化マーカーの探索

材料は、上記研究で解析された健常群の各オミックス情報で、今回は、microRNA解

析情報の一部とメタボロミクス情報を年齢順に並べ、時系列解析を行った。

(倫理面への配慮)

臨床試料の使用に当たっては、国立長寿医療研究センター倫理利益相反委員会の承認を得て実施。被験者の研究への参加は本人の自由な意思によることとし、個人情報厳重に保護されるため、倫理的問題は生じないと考えられた。また、センター外の分担研究については分担研究者の所属する各研究機関の定める倫理委員会の承認を得て実施されている。また動物を用いた研究は、国立長寿医療研究センターの動物実験倫理委員会の承認を経、同センターの動物実験指針に従った。

## C. 結果と考察

### 1. AD 血漿のオミックス解析

これまで疾患群 9 例、対照群 16 例の血中 microRNA プロファイリング解析を実施した。解析の結果、患者群では対照群に比べ 16 個の microRNAs の発現上昇が示された（減少なし）。これらの標的となる mRNA 群を公知のデータベースを用いて検索した結果、神経伝達物質の分解に関わるアセチルコリンエステラーゼ遺伝子、細胞内輸送に参与する SV2A 遺伝子等を標的とする microRNA が含まれており、疾患との関連性が示唆された。

疾患マーカー分子の意義付けには、実際の患部であるヒト脳組織の解析が必要であるが、現実的には脳組織の収集は困難である。そこで今回、AD モデルマウスの脳を用いたオミックス解析を試みた。microRNA 解析の結果、疾患モデルマウスにおいて、野生型マウスより 2 倍以上発現が増減したものは 17 種類で、上昇が 7、減少が 10 であった（分担研究報告書参照）。これらの microRNA には、ヒト血漿で検出されたものと共通する microRNA はなかったが、共通する標的遺伝子をもつ microRNA が存在したことから、モデル動物の検討には一定の意義があると思われる。

血中に存在する分泌型の microRNA の由来を特定することは今後の研究の焦点の一つとされている。われわれは、AD が脳の疾患であることに着目し、脳血管内皮細胞から遊離するマイクロパーティクル (EMP) は、炎症などの刺激で変化するか、*in vitro* で検討を行った。その結果、b.End5 細胞の培養上清から EMP が検出され、それらはサイトカイン等による炎症誘導で有意に増加することが示された。次に、回収した EMP から small RNA を回収し、microRNA の解析を行った結果、70 種類の microRNAs の発現が炎症誘導により変化した（分担研究報告書参照）。このことは、脳に炎症がある場合、血漿中には脳血管内皮細胞から分泌した EMP/microRNA が存在している可能性を示唆しており、脳特異的バイオマーカーの探索に有益な情報と思われた。

血漿メタボロミクスでは、疾患群 9 例、対照群 15 例の分析を修了しているが、定量解析においては同時期に分析した疾患群 9 例、対照群 9 例で比較した。その結果、AD 群において増加する 6 個の代謝物と減少する 1 個の代謝物が示された。個々の代謝物を

みると、エネルギー代謝・アミノ酸代謝・グルタチオン代謝において変動する代謝物が検出されていることがわかった。しかし microRNA 同様、まだ例数が少ないので今後十分な臨床試料の確保と解析を行うことが重要と考えている（分担研究報告書参照）。

なお、プロテオーム解析については、当センターに新たに導入された高感度質量分析装置による解析を行うため、今年度は試料の前処理法の確立と解析条件の最適化などを検討した。現在、新しく確立した前処理法による予備解析（疾患群 3・対照群 3）を進めている。

## 2. 老化のバイオマーカー分子の探索

これまで 16 例の microRNA 解析を終了したが、50 代は含まれていないので、60 代前半から、同後半～70 代～80 代という流れで加齢変化を調べた。その結果、年代が進むにつれて発現値が徐々に上昇するものが 13、減少するものが 2 存在した。興味深いことに、これらの中には、神経系や循環器系の機能維持、がん・糖尿病の発症に関連するものが含まれており、老化をリスクとする疾患との関連性が深い microRNA 群と考えられた。また、年齢に関係なく一定の発現量を保っている microRNA が 20 存在し、これらが内因性のコントロールマーカーに使える可能性があり、今後検討を加えたい。

一方、メタボロミクスでは 2 回の解析で 15 の試料（50, 60, 70 代各 5 例）を解析した。加齢変動解析については、2 回目の 9 個体（男性 3、女性 6）を対象に行った（分担報告書参照）。男性では加齢で増加する代謝物が 6、減少する代謝物が 8 検出され、女性では増加が 3、減少が 2 であった。これらの中には、microRNA 解析同様、神経細胞の維持機能に関連する代謝物が含まれている。また、タンパク質合成に関連するもの、老化により機能低下が現れやすい、腎機能に関連した代謝物が検出され、今後の解析に注目したい。しかしながらまだ例数が少ないため、男女に共通する代謝物は検出されなかったことなど、検討すべき点が示された。

代謝物の網羅的解析であるメタボロミクスでは、代謝物の血中濃度が正常老化によってどのような変化を示すかという問題に強い関心が持たれている。また、加齢がリスクとなる疾患の代謝物プロファイルの解釈では、代謝物の変化が加齢による変化なのか、病気による変化なのかを把握する必要性があり、今回のようなアプローチは重要な試みと考えられている。

## D. 結論

- 1) AD 患者と健常者血漿の microRNA プロファイリング解析では、疾患群で発現変動を示す microRNA が複数検出された。
- 2) 同様に、メタボローム解析では疾患群で変動する複数の代謝物が確認された。
- 3) AD モデルマウス脳 of microRNA プロファイリング解析では、変動する 17 種類の microRNA が検出された。

- 4) 血中 EMP には microRNA が含まれ、それらは炎症誘導によりプロファイルを変化させた。
- 5) 男女それぞれにおいて、加齢によって変動する代謝物が確認された。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ihara M, Tomimoto H. Lessons from a mouse model characterizing features of vascular cognitive impairment with white matter changes. J Aging Res 2011: 978761, 2011
- 2) Tomimoto H. Subcortical vascular dementia. Neurosci Res. 71:193-199, 2011
- 3) Kageyama S, Yokoo H, Tomita K, Kageyama-Yahara N, Uchimido R, Matsuda N, Yamamoto S, Hattori Y: High glucose-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells involves up-regulation of death receptors. Cardiovasc Diabetol 10: 73, 2011
- 4) Matsui-Hirai H, Hayashi T, Yamamoto S, Ina K, Maeda M, Kotani H, Iguchi A, Ignarro LJ, Hattori Y: Dose-dependent modulatory effects of insulin on glucose-induced endothelial senescence in vitro and in vivo: a relationship between telomeres and nitric oxide. J Pharmacol Exp Ther 337:591-599, 2011
- 5) Takano K, Yamamoto S, Tomita K, Takashina M, Yokoo H, Matsuda N, Takano Y, Hattori Y: Successful treatment of acute lung injury with pitavastatin in septic mice: potential role of glucocorticoid receptor expression in alveolar macrophages. J Pharmacol Exp Ther 336: 381-390, 2011
- 6) Matsuno K, Yamazaki H, Isaka Y, takai K, Unno Y, Ogo N, Ishikawa Y, Fujii S, Takikawa O, Asai A: Novel candesartan derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. Med Chem Comm 3:475-479, 2012
- 7) Nakano S, Takai K, Isaka Y, Takahashi S, Unno Y, Ogo N, Matsuno K, Takikawa O, Asai A: Identification of novel kynurenine production-inhibiting benzenesulfonamide derivatives in cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 419:556-561, 2012
- 8) Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara E: Extracellular and Intraneuronal HMW-AbetaOs Represent a Molecular Basis of Memory Loss in Alzheimer's Disease Model Mouse. Mol Neurodegener 20: 6, 2011
- 9) Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E: The Dissociation of Aβ from Lipoprotein in Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's Disease accelerates Aβ42 assembly. J Neurosci Res 89:815-21, 2011

- 10) Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita, K, Nakamura H, Nakashima M: Complete Pulp Regeneration After Pulpectomy by Transplantation of CD105(+) Stem Cells with Stromal Cell-Derived Factor-1. *Tissue Eng Part A*, 17: 1911-20, 2011
- 11) Nakamura H, Kawagishi H, Watanabe A, Sugimoto K, Maruyama M, Sugimoto M: Cooperative role of the RNA-binding proteins Hzf and HuR in p53 activation. *Mol Cell Biol* 31: 1997-2009, 2011
- 12) Kato K, Otsuka T, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, Tokuda H. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol Med Rep* 4:297-300, 2011
- 13) Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Natsume H, Otsuka T, Kozawa O. Enhancement of basic fibroblast growth factor-stimulated VEGF synthesis by Wnt3a in osteoblasts. *Intern. J Mol Med* 27:859-864, 2011
- 14) Kato K, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Natsume H, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O, Otsuka T. Regulation by heat shock protein 27 of osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Endocrinology* 152:1872-1882, 2011
- 15) Natsume H, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Yamakawa K, Otsuka T, Kozawa O. Wnt3a up-regulates transforming growth factor- $\beta$ -stimulated VEGF synthesis in osteoblasts. *Cell Biochem Funct* 29:371-377, 2011
- 16) Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. Wnt3a regulates tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated interleukin-6 release in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol* 331:66-72, 2011
- 17) Kato K, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. Role of heat shock protein 27 in transforming growth factor- $\beta$ -stimulated vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. *Int J Mol Med* 27:423-428, 2011
- 18) Kato K, Otsuka T, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, Tokuda H. Rho-kinase regulates thrombin-stimulated interleukin-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts. *Int J Mol Med* 28:653-658, 2011
- 19) Kato K, Tokuda H, Mizutani J, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, Otsuka T. Role of HSP27 in tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Int J Mol Med* 28:887-893, 2011

## 2. 学会発表

- 1) Yamamoto S, Azuma E, Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Miyazaki K, Dohmoto M, Muramatsu M, Niida S, Hattori Y: Endothelial microparticles behave as a bioactive carrier

- in the cellular interaction. The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization/The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, December 8-10, 2011 (Tokyo, Japan)
- 2) Yamamoto S, Azuma E, Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Miyazaki K, Dohmoto M, Muramatsu M, Niida S, Hattori Y: Elucidation of the nature of the endothelial microparticles. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13~16日(横浜)
  - 3) Azuma E, Yamamoto S, Hattori Y, Muramatsu M, Niida S: Analysis of the multifunctional macrophages in mouse angiogenesis model. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13~16日(横浜)
  - 4) 山本誠土, 東英梨月, 柳橋努, 生谷尚士, 長井良憲, 高津聖志, 宮崎賢治, 堂本光子, 村松昌, 新飯田俊平, 服部裕一: Endothelial microparticles (EMP)の生物活性の解析. 第21回日本循環薬理学会 2011年12月2日(岡山)
  - 5) Takikawa O, Niida S, Soga T: Detection of urine, blood, and brain biomarkers for Alzheimer's disease by capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE-MS)-based metabolomic analysis. Seventh International Conference of the Metabolomics Society. June, 2011 (Cairns, Australia)
  - 6) Okuno A, Zhang G, Yokoi H, Takikawa O: Astrocytes but not neurons are responsible for the hippocampal increase of amyloid  $\beta$  peptide induced by neurotoxin quinolinic acid. AAIC 2011. July, 2011 (Paris, France)
  - 7) 滝川修, 新飯田俊平, 曾我朋義: CE/MS メタボロミクスによるアルツハイマー病の尿、血液及び脳バイオマーカーの検出. 第6回メタボロームシンポジウム, 平成23年10月13日(大阪)
  - 8) 滝川修: アルツハイマー病根本治療薬の開発を目指して. 第47回シグナル伝達医学グローバル COE 学術講演会. 2011年8月12日(神戸)
  - 9) 松原 悦朗: アルツハイマー病モデルマウスに対するメラトニンの効果, 第11回日本抗加齢医学会分科会共催シンポジウム(脳の老化とメラトニン), 2011(京都)
  - 10) 松原 悦朗: 抗体医療開発の現状, 第48回日本老年医学会学術集会 Aging Science Forum「アルツハイマー病研究の up-to-date」 2011年(東京)
  - 11) Muramatsu M, Moriwaki S, Gong JS, Yamamoto S, Watanabe A, Tokuda H, Takikawa O, Motoyama N, Niida S. Circulating microRNA expression in the aging, Sixteenth Annual Meeting of The RNA Society RAN 2011, 2011年6月 (Kyoto)
  - 12) 今林貴代美, 庵原耕一郎, 渡邊 淳, 石坂亮, 中村洋, 中島美砂子: 歯髄組織再生における vimentin の作用. 第134回日本歯科保存学会 2011年度春季学術大会 2011年6月(東京)
  - 13) Zou K, Liu J, Watanabe A, Liu S, Tanabe C, Maeda T, Oba R, Michikawa M, Komano H. Two active domains of ACE are essential for Abeta43-converting activity, ISN-ESN, 2011年8月 (Athens, Greece)
  - 14) 國本正子, 高橋慶吉, 足立香代, 松崎三記子, 武田和也, 脇田英明, Rajesh N Kalaria, 丸

- 山和佳子, 渡邊 淳. 変異型 Notch3 ノックインマウスを用いた慢性ストレス暴露による CADASIL モデルマウスの構築”, 第 35 回日本神経科学大会 2011 年 9 月(横浜)
- 15) Liu, J., Liu, S., Watanabe, A., Tanabe, C., Maeda, T., Michikawa, M., Zou, K., Komano, H. Abeta43-converting activity requires two active domains of ACE. 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月(京都)
- 16) 平本正樹, 宇田川陽秀, 渡邊 淳, 上番増喬, 川口美穂, 南茂隆生, 西村渉, 安田和基. KCNQ1 遺伝子イントロンにおける 2 型糖尿病感受性 SNP の機能解析. 日本人類遺伝学会 第 56 回大会 2011 年 11 月(千葉)
- 17) Adachi K, Kunimoto S, Takeda K, Ohtani T, Watanabe A, Takikawa O, Maruyama W, Wakita H. Development of prophylaxis and therapy for vascular dementia by anti-E-selectin antibody using the mouse model, Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011, 2011 年 11 月 17-18 日(豊橋)
- 18) 渡邊 淳, 足立香代, 新飯田俊平, 丸山和佳子, 脇田英明. 血管性認知症モデル動物のプロテオーム解析. 第 30 回日本認知症学会, 2011 年 11 月(東京)
- 19) 徳田治彦, 原田敦, 細井孝之, 新飯田俊平. 骨芽細胞における塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)産生制御機構—Rho-kinase の役割. 第 53 回日本老年医学会学術集会 2011 年6月(東京)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし