

論文の内容の要旨

氏名：溝 井 睦 美

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題目：脳細胞傷害マーカーとしてのアクロレインの有用性に関する研究

近年、日本において高齢化が進み、それに伴い認知症の患者数も増加している。認知症患者数は2010年時点で約200万人といわれ、さらに2020年には325万人に達すると推計されている。認知症の原因となる疾患は、脳血管障害及びアルツハイマー病がその大半である。

認知症の原因疾患のひとつである脳血管障害の脳梗塞は、発症すると身体の麻痺や、言語障害等の後遺症で苦勞することが多く、自覚症状がなく発症する前段階の無症候性脳梗塞 (silent brain infarction: SBI) の段階で発見し、適切な治療を行うことが重要である。脳血管障害は、日本三大生活習慣病の一つであるにもかかわらず信頼性の高いバイオマーカーが存在していなかったが、近年、脳梗塞発症のリスクを評価する技術が開発されている。また、脳血管障害について、細胞内に存在するポリアミン (プトレスシン、スペルミジン、スペルミン) より産生されるアルデヒド基をもつアクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$) に注目した研究を行ってきた。ポリアミンは、細胞内では主としてRNAと結合しタンパク質の合成を促進する機能を持ち、細胞増殖因子として働く。一方、細胞が傷害を受けた際には、ポリアミンはRNAから遊離され、細胞中のポリアミンオキシダーゼ (Polyamine oxidase: PAO) であるスペルミンオキシダーゼ (Spermine oxidase: SMO)、アセチルポリアミンオキシダーゼ (Acetyl polyamine oxidase: AcPAO) により酸化分解されアクロレインと過酸化水素 (H_2O_2) を産生する。

脳梗塞発症時に誘発される細胞傷害は、活性酸素 ($\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2) に起因することが知られているが、アクロレインに着目し検討を行った結果、培養細胞を用いた実験において強い細胞毒性を示すことを明らかにしてきた。また、アクロレインは、タンパク質のリジン残基と反応しタンパク質抱合型アクロレイン (Protein-conjugated acrolein: PC-Acro) を生成する。そこで脳梗塞モデルマウスを用い脳梗塞巣におけるPC-Acroの生成量を測定した。その結果、脳の正常部位に比べ脳梗塞巣においてPC-Acroが有意に多く生成されることを確認した。また、アクロレインは、グルタチオン抱合を受け3-ヒドロキシプロピルメルカプトツール酸 (3-Hydroxypropyl mercapturic acid: 3-HPMA) に代謝され尿中に排泄されることに着目し本研究を行った。脳卒中患者群ならびに健常者群の尿中3-HPMA量を測定し、アクロレイン代謝能と脳卒中の相関について検討した。さらに脳梗塞巣ならびに脳出血巣の大きさと尿中3-HPMA量の相関を検討した。(第一章)

認知症のもう一方の原因疾患であるアルツハイマー病は、進行性の脳疾患である。進行過程において軽度の認知機能低下から段階を経て重度の認知機能低下が認められると自力では日常生活を送れなくなり、介護を必要とする。

認知機能検査はMMSE (Mini-mental state examination) が多く用いられている。MMSEは、簡便な11項目の検査により30点満点で評価する。27~30点は正常、22~26点は軽度認知症の疑いあり、21点以下では認知症の疑いが強いと判定される。また、現在は画像による判定も進歩しており、MRI画像を基に、早期アルツハイマー型認知症診断支援システム (VSRAD) を用いて、Z-Scoreを算出することにより海馬の萎縮度の解析が可能である。早期治療のためにも、認知機能障害の原因疾患がどのようなタイプなのかを認知機能低下が軽度のうちに識別することが必要である。また、MRI画像に加え、さらにfluorodeoxyglucose (FDG) - positron emission tomography (PET) ならびに amyloid PET によりアルツハイマー型認知症に進行する可能性、また、認知症の患者においてはアルツハイマー型認知症か否かの診断が可能になった。しかしながら、これらの検査は、国内において導入している医療施設が少なく、高価である。より多くの方々の軽度認知機能低下症の原因疾患タイプを早期診断するため、より簡便に受けられる検査が必要である。

アルツハイマー病の患者の脳には、老人斑ならびに神経原線維変化がみられることが知られている。老人斑は、アミロイドベータ ($\text{A}\beta$) が蓄積したものである。 $\text{A}\beta$ は、アミノ酸40個からなる $\text{A}\beta_{40}$ と、アミノ酸42個からなる $\text{A}\beta_{42}$ が存在する。また、神経原線維変化は微小管のタウタンパクがリン酸化され遊離し凝集することで形成される。脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) 中の $\text{A}\beta$ ($\text{A}\beta_{40}$ 、 $\text{A}\beta_{42}$)、タウタンパクならびにリン酸化タウタンパクは、アルツハイマー病との関連が注目されている。

これらのことから、認知機能障害、脳血管障害ならびにアルツハイマー病と、血漿中 PC - Acro、 $A\beta_{40}$ 、および $A\beta_{42}$ 量を測定し、バイオマーカーとしての有用性を検討した。(第二章)

さらに、軽度認知症ならびにアルツハイマー病患者の CSF 中 PC - Acro、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、総タウタンパク、リン酸化タウタンパクを測定し、認知機能障害との相関を評価した。さらに画像診断により求められる Z-Score との相関を評価し、脳委縮度との相関を検討した。また、アルツハイマー病患者の脳組織ならびに疾患対照群(脳卒中患者ならびに心不全患者)の脳組織を用い、関連が知られている $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ と PC - Acro を測定した。さらに、免疫染色により脳組織中のアクロレインの蓄積を評価し、アクロレインのアルツハイマー病への関与を評価した。(第三章)

【結果と考察】

脳卒中患者の尿中アクロレイン代謝物の減少について

健常者群ならびに脳卒中患者群の尿検体について、尿中 3 - HPMA ならびにクレアチニン量を測定した。尿中 3 - HPMA 量をクレアチニン量により補正した値を算出した。また、健常者群 90 名ならびに脳卒中患者群 78 名の対象者の年齢を示した。その結果、3 - HPMA 量、クレアチニン量ならびにクレアチニン補正した 3 - HPMA 量で、脳卒中者群において健常者群に比べ有意な減少が認められた。特に、クレアチニン補正した 3 - HPMA 量の中央値は、健常者の $2.83 \mu\text{mol/g Cre}$ に比べ、脳卒中患者群では $1.5 \mu\text{mol/g Cre}$ と顕著な減少が認められた ($p < 0.0001$)。(Fig. 1A)

また、本研究対象者のうち年齢 60 ~ 79 歳の対象者を抽出し、健常者群の 32 名ならびに脳卒中患者群の 44 名について統計解析した結果、3 - HPMA 量、クレアチニン量ならびにクレアチニン補正した 3 - HPMA 量 ($p = 0.0029$) で、脳卒中患者群において健常者群に比べ有意な減少が認められた。(Fig. 1B) このことから、尿中 3-HPMA 量を測定することは脳卒中の有用なバイオマーカーとなることが明らかとなった¹⁾。(第一章)

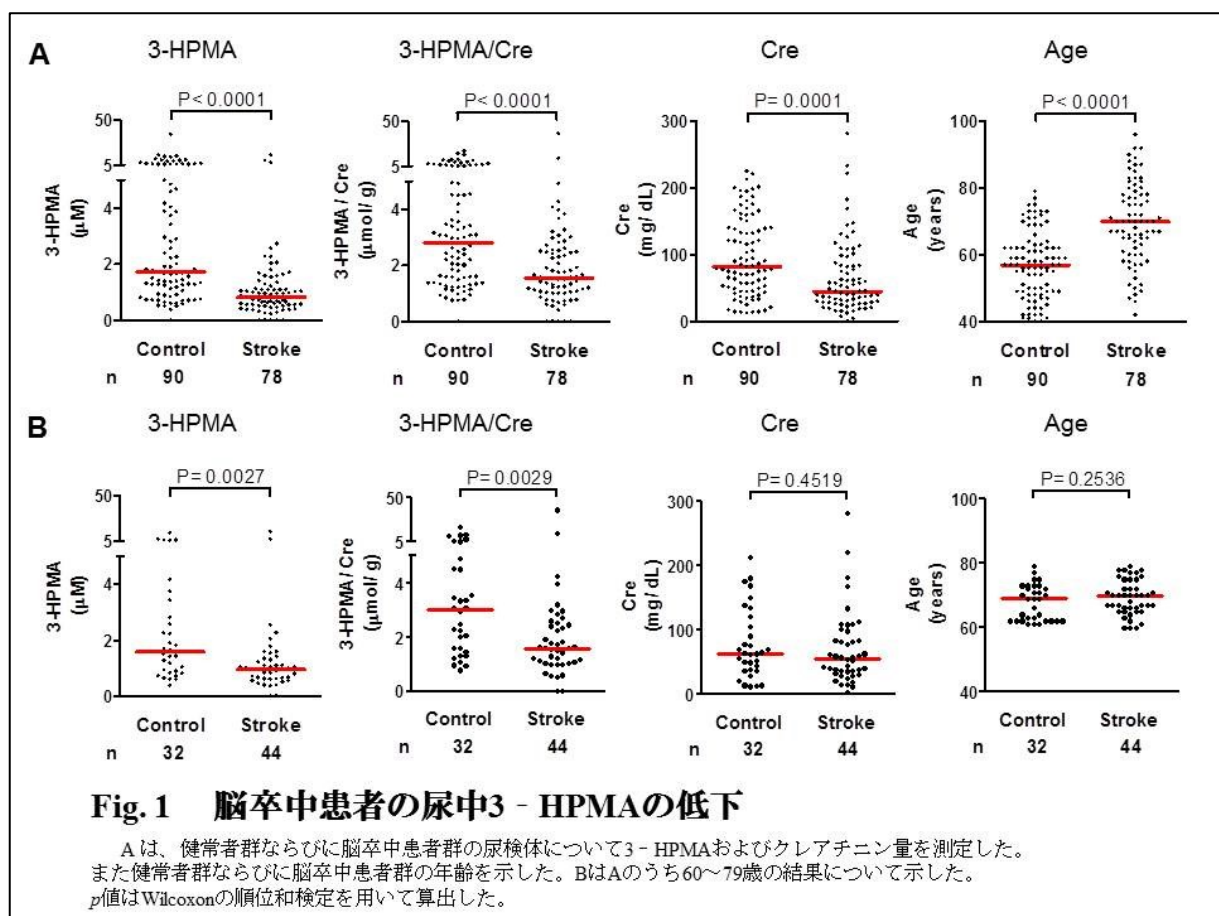


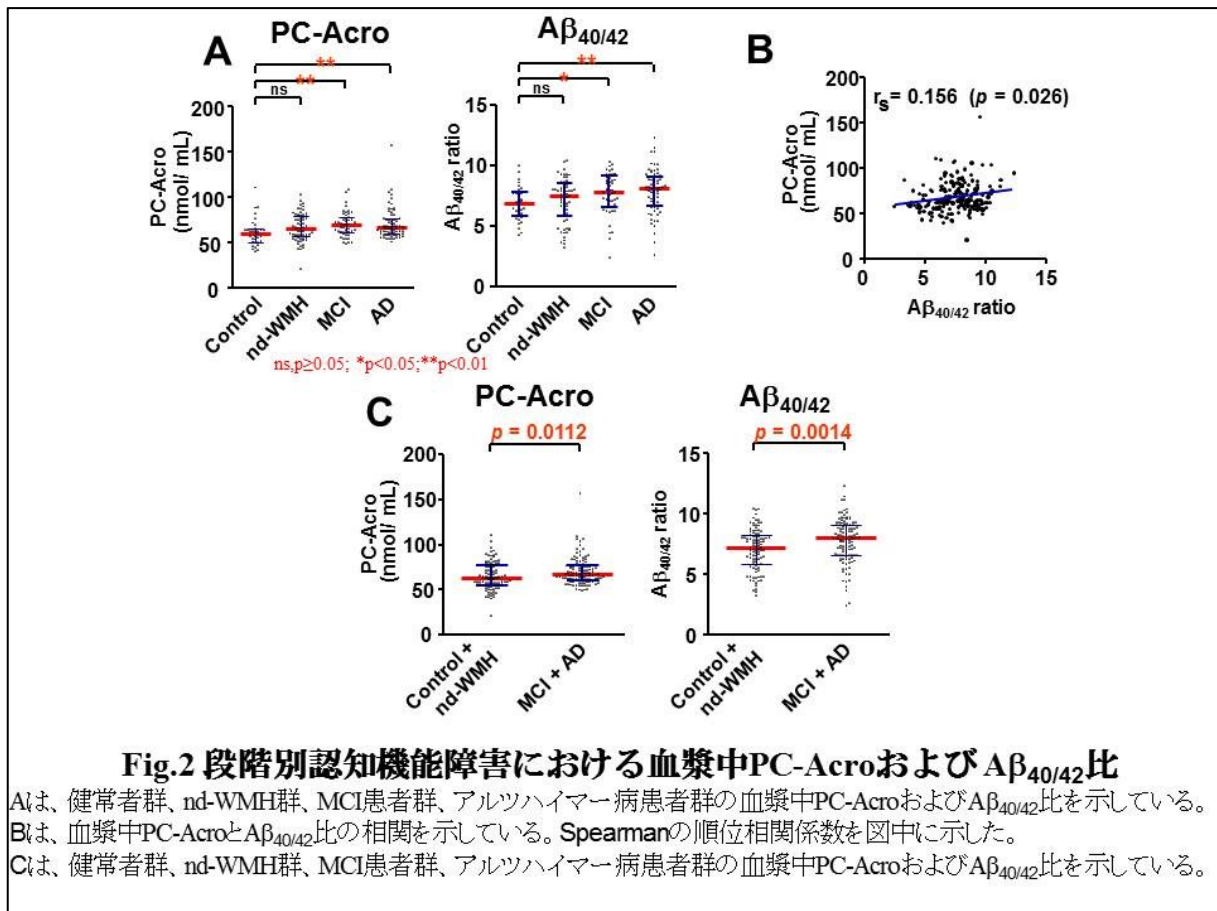
Fig. 1 脳卒中患者の尿中3 - HPMAの低下

Aは、健常者群ならびに脳卒中患者群の尿検体について3 - HPMAおよびクレアチニン量を測定した。また健常者群ならびに脳卒中患者群の年齢を示した。BはAのうち60~79歳の結果について示した。 p 値はWilcoxonの順位和検定を用いて算出した。

認知機能障害の血漿中 PC - Acro ならびに $A\beta_{40/42}$ 比について

健常者群、認知機能障害を有さない大脳白質病変患者 (nd-WMH) 群 WMH、軽度認知障害 (MCI) 群およびアルツハイマー病患者群の血漿検体を用い PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比を測定し認知機能障害との相関を検討した。その結果、PC - Acro ならびに $A\beta_{40/42}$ 比が MCI 患者群ならびにアルツハイマー病患者群で健常者群に比べ有意に上昇していた。(Fig. 2A) また、 $A\beta_{40/42}$ 比、PC - Acro 量の増加には相関関係が認められた (Fig. 2 B)。さらに、認知機能障害と PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比の相関を評価するため認知機能障害のない群 (健常者群+nd - WMH 群)、ならびに認知機能障害を有する群 (MCI 患者群+アルツハイマー病患者群) に分類し評価した。その結果、PC - Acro は、認知機能障害のない群の中央値 63.4 nmol/mL に対し、認知機能障害を有する群では、中央値 67.9 nmol/mL、 $p=0.0112$ となり、 $A\beta_{40/42}$ 比は、認知機能障害のない群の中央値 7.3 に対し、認知機能障害を有する群では、中央値 8.0、 $p=0.0014$ と共に有意な増加が確認された。(Fig. 2C)

これらのことから、血漿中 PC - Acro、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 量は認知機能障害の有用な指標となることが示唆された²⁾。(第二章)



MCI およびアルツハイマー病患者の CSF 中 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ について

アルツハイマー病患者の脳組織において、PC - Acro、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ が前頭葉ならびに側頭部に有意に蓄積していることが明らか²⁾になっており、PC - Acro、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ とアルツハイマー病の関連について注目されている。また、これまで血漿中のバイオマーカー ($A\beta_{40/42}$ 、PC - Acro) では MCI とアルツハイマー病患者の区別ができなかった²⁾為、CSF 検体について PC - Acro、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ を測定し、MCI およびアルツハイマー病との相関について検討を行った。CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、PC - Acro、総タウタンパク、リン酸化タウタンパクを測定した結果、タウタンパクならびにリン酸化タウタンパクについては MCI ならびにアルツハイマー患者群の差は認められなかった。

さらに、 $A\beta_{42}$ 、PC - Acro および $A\beta_{42}/PC - Acro$ についても両群の差は認められなかったが、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、については、MCI 患者群ではアルツハイマー病患者群に比べ有意に高値であった。各々の p 値は $A\beta_{40}$ ($p=0.0026$)、 $A\beta_{40/42}$ ($p=0.0210$)、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ ($p=0.0015$) であった (Fig.3)。

このことから、MCI 患者群とアルツハイマー病患者群の識別を行うためには $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ が重要であることが明らかとなった。また $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ と脳萎縮度の Z - Score と認知機能検査の MMSE との関連を検討した。Z - Score の増加に伴い、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ が低下することが認められた。さらに MMSE と CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ 値の変化について検討したところ、MMSE の低下に伴い $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ の値も低下することが明らかとなり、PC - Acro は脳卒中のみならず脳萎縮度ならびに認知機能障害との相関があり、指標となりうる可能性が示唆された。

さらに、CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{40/42}$ を注視することで、MCI ならびにアルツハイマー病を識別し、認知機能障害の原因疾患を早期の段階で推察できる可能性があることが示唆された³⁾。

