

大脳白質病変とフレイルに関する観察研究と脂質クオリティの検討（19-32）

主任研究者 小久保 学 国立長寿医療研究センター 循環器内科部（医長）

研究要旨

主として老年期の高血圧患者の大脳白質病変量・認知機能・血圧・フレイルとの関連性を評価し、大脳白質病変の増大とフレイル・認知症の発症について、多角的に検討する。ゲノム解析により、日本人における大脳白質病変のリスク因子を新たに検討する。リピドミクス解析を行い、脂質クオリティに注目した認知症・フレイル・大脳白質病変と関連する新たな病態解析あるいはバイオマーカーのターゲットの発見を目指す。

主任研究者

小久保 学 国立長寿医療研究センター 循環器内科部（医長）

分担研究者

尾崎 浩一 国立長寿医療研究センター

メディカルゲノムセンター 臨床ゲノム解析推進部（部長）

大田 秀隆 秋田大学高齢者医療先端研究センター（センター長）

A. 研究目的

大脳白質病変（WMH）は、加齢現象と考えられていたが、最近では脳卒中発症および認知機能障害発症の高リスク群であり、さらに歩行障害、嚥下障害、排尿障害、行動心理症状など様々な老年期症候群の原因となりうることが明らかになってきた。WMHの最も大きな危険因子は高血圧で、早期からの積極的な血圧管理の重要性が指摘されているが、その管理方法についてはさらなる検討が必要な状況である。また海外においてはWMH関連遺伝子についても報告され、多彩な成因があることが判明しつつある。

我々は今までに、診察室血圧は大脳白質病変体積との相関はなく、夜間平均収縮期血圧が強く大脳白質病変体積の増大と関わっていることを明らかにした。また、すでに高度の大脳白質病変を持つ患者では、過降圧により大脳白質病変体積のさらなる増大をきたしやすいことも明らかにしてきた。このような結果はWMHの老年期症候群を予防するためのターゲットとしていく上で非常に重要であり、継続して行う必要がある。

そこで本研究では、以下の研究を行うことを計画している。

①国立長寿医療研究センターにおける縦断研究により、主として老年期の高血圧患者のWMH体積・認知機能・血圧・フレイルとの関連性を評価し、WMH体積の増大とフレイル

ル・認知症の発症について、多角的に検討する。

②東北メディカルメガバンク (ToMMo) との連携により、すでに蓄積された脳画像データベースおよびメタボローム解析等のデータを利用し、代謝との関連性について検討する。

③当センターバイオバンクに蓄積された症例より、WMH とそれに関連したゲノムについて解析を行い、日本人特有の危険因子をについて検討する。さらにリポドミクス解析により、脂質クオリティに注目した認知症・フレイル・大脳白質病変と関連する新たな病態解析あるいはバイオマーカーのターゲットを見出すことにつなげていく。

## B. 研究方法

### ・国立長寿医療研究センターにおける縦断研究

循環器科では、定期通院している高齢患者を対象として、循環動態（血圧/心機能/血管硬度等）・頭部 MRI データ（大脳白質病変量）・認知機能（MMSE・CDR）に関する縦断的データベースを患者同意下に構築している。フレイルに関する評価を合わせて行い、大脳白質病変・フレイル・血圧との関連について縦断的な解析を行う。

対象者：65 歳から 75 歳までの高血圧治療を継続している患者。

目標症例数：150～200 名。

検討項目：頭部 MRI（大脳白質病変体積・分布）、頸動脈超音波検査（IMT）、ABI、24 時間血圧（ABPM）、血液生化学検査（BNP/HbA1c/cholesterol/Cr/eGFR）、GDS15・MMSE・CDR・高次脳機能検査（TMT・WAIS-R 符号検査・WMS-R 論理記憶 I・II）、握力、歩行速度、基本チェックリスト（体重減少、疲労感、身体活動）等

主要評価項目：大脳白質病変の悪化速度（mL/年）と認知機能（MMSE・CDR）および握力、歩行速度、基本チェックリスト（体重減少、疲労感、身体活動）等

解析方法：大脳白質病変量を自動解析ソフトである SNIPER（Software for Neuro-Image Processing in Experimental Research）を用いて定量的に計測し、数値データ化する。大脳白質病変体積と生理検査結果・血液生化学検査結果・高次脳機能検査・握力・歩行速度・基本チェックリスト（体重減少、疲労感、身体活動）等について統計学的に関連性を解析する。

### ・東北メディカルメガバンク(ToMMo)との連携による横断研究

ToMMo 地域コホートが持つ国内最大規模の脳画像データベースを利用し、大脳白質病変を評価した上で患者基本情報、特に中心血圧、内服している薬剤等の関連について横断的に検討を行う。

対象者：正常若年者、健常高齢者（65 歳以上）、高血圧、糖尿病、高脂血症のグループにカテゴライズを行う。

目標症例数：各グループまず 100 名程度。

解析方法：大脳白質病変量を定量的に計測し、内服薬・中心血圧等との関連を検討する。

併せて既にデータのあるメタボローム解析・ゲノム解析等の結果を利用し、大脳白質病変との関連性について解析を行う。

- ・大脳白質病変のゲノム解析

国立長寿医療研究センターメディカルゲノムセンターですでにゲノム解析が行われている患者について大脳白質病変とゲノムとの関連について解析を行う。現時点での目標は、大脳白質病変の計測にかかる時間を鑑みて 500 名程度と考えている。

解析方法：大脳白質病変量を自動解析ソフトである SNIPER (Software for Neuro-Image Processing in Experimental Research) を用いて定量的に計測し、数値データ化する。大脳白質病変体積とすでに行われたゲノム解析の結果及び生理検査結果・血液生化学検査結果・総合機能評価等について統計学的に関連性を横断解析する。頭部 MRI と総合機能評価等が経時的に行われていれば、縦断解析を合わせて行う。

- ・大脳白質病変に関連したリポドミクス解析

上記解析を行った対象者の中から、バイオバンクに保存されている検体血液検体（血漿・血清）0.5ml を利用し秋田大学にてリポドミクス解析を行う。それにより大脳白質病変・フレイルと脂質プロファイルの関連性について検討を行う。

解析方法：リポドミクスについては、ノンターゲット解析法（網羅的な脂質解析）を利用した量的な脂質プロファイルの作成を行うことにより、健常群と疾患群の違いを抽出、次に確定診断・薬剤・そのほかの検査データ（CGA、血液検査、心エコー・ABI などの生理検査等）などを含めた臨床情報との統合を行う。そのうえでインフォマティクスによる構造同定や対象脂質の絞り込みを行う。さらに、上記で特定した対象脂質について、選択性の高い定量的な解析を行う。さらに可能であればゲノム解析との関連性について検討を行う。

（倫理面への配慮）

国立長寿医療研究センター倫理・相反委員会の承認を経て研究を行っており、個人情報の保護等が図られている状態にある。またバイオバンクに収集されている既存の試料・情報を利用するため、研究対象者に新たな負担は生じない。さらに新たに発生する不利益並びに危険性は想定されない。対象者個人に対する直接の利益も想定されない。

## C. 研究結果

- ・国立長寿医療研究センターにおける縦断研究

循環器外来通院中の患者について、フレイル評価等のためロコモ・フレイル外来の受診をすることにより、症例及びデータを収集することを開始した。

2021年2月の時点で68名（女性：32人 vs 男性：36人）受診しており、男女間で年齢に大きな差はないが（女性：76.5±5.9歳 vs 男性：77.3±4.8歳）、男性のほうが身長が高く

(女性：152.1±4.3cm vs 男性：163.8±6.8cm)、体重が重い(女性：52.5±7.3Kg vs 男性：65.2±9.2Kg)傾向にあった。受診時の血圧は同程度(女性：149±15/81±14mmHg vs 男性：145±19/83±13mmHg)、内服薬の数についても同等で(女性：5.0±2.6個 vs 男性：5.0±2.9個)あった。高血圧の割合が同等に多かった(女性：18/32人 vs 男性：20/36)。

基本チェックリストは女性で高い傾向があり(女性：4.3±3.5 vs 男性：3.1±2.5)、基本的ADLを評価するKatz index、バーセルインデックスは同程度、転倒評価では女性のほうが高い傾向であった(女性：7.4±3.0 vs 男性：6.2±2.6)であった。またフレイルインデックス・簡易フレイルインデックスともほぼ同等であったが、ロコモ25では女性のほうが高値(女性：12±11 vs 男性：8±9)の傾向であった。栄養状態・認知機能・老年うつ病スケール(GDS15)は同程度であった。以上まとめると認知機能・ADL・活動度に大きな差はないと思われる一方、女性はロコモの傾向がみられやすいと考えられた。今後は着実に受診の勧奨しデータを蓄積していく予定である。

#### ・東北メディカルメガバンク(ToMMo)との連携による横断研究

現在東北メディカルメガバンク(ToMMo)での共同研究を行うため、申請を行っている。MRI画像の場合、機種依存が大きいため、複数施設での標準化した画像解析が行いにくく、基本的にはToMMoで撮像された画像の解析を中心に行うことになる。方針として、すでに分譲可能な、第1期に撮像された約3000例のMRI画像を対象として進めていくことになった。

そして現在、中心血圧・家庭血圧等のデータがどの程度あるのか突合せを行っており、ゲノムデータは分譲可能な状態であることを確認、メタボロームデータについて確認している最中である。

画像部門と、検診データ、ゲノム・メタボロームデータそれぞれ管理している部門が異なるためいろいろな段取りが必要な状況である。

#### ・大脳白質病変のゲノム解析

WMHと関連したゲノム解析としてゲノムワイド関連解析(GWAS)による質的量的座位の探索を行った。今年度さらに新たなWMHサンプルを追加し対象数は1,179例を用いた。民族特異的一塩基多型(SNP)アレイにより得られた全ゲノムジェノタイプデータとWMH量の線形回帰によるゲノムワイド関連解析(GWAS)では、現時点でGWAS有意性を示す可能性が高い新規座位群を第3染色体上をはじめとして計16座位を同定した。

#### ・大脳白質病変に関連したリポドミクス解析

リポドミクス解析については、大脳白質病変体積の大きい群(Upper)：19検体、大脳白質病変体積の小さい群(Lower)：10検体について解析を行った。今回の解析では、検体からの脂質抽出はなるべくバイアスをかけないためにメタノール溶媒のみのワンステップ抽

出方法で行い、検体間や測定時間によって結果にばらつきが生じないように QC(Quality check)を行った。その結果、以前の結果と相違しないことを確認し、この抽出液を高分解能を有するオービートラップ型質量分析装置、Q Exactive Plus で包括的な LC-MS, LC-MS/MS 分析を実施した。検出した数万種の代謝産物のうち差分解析等が可能な Compound Discoverer ソフトウェアを用いてピークピッキングを実施し、ピーク強度、ピーク形状、データポイント、S/N 比などを指標とし精度の良いおよそ 3,500 ピークまで候補バイオマーカー絞り込むことができた。しかしながら、このデータをもとに主成分解析、クラスター解析を実施したが、Upper 群と Lower 群で大きな有意差を示すことができず、さらにクラスター分析を行っても、傾向としても明確な特徴づけまでには至らなかった。現在、脂質同定検索ソフトウェアである Lipid Search を用い、脂質分子にターゲットを絞り解析を行っているところである。

#### D. 考察と結論

男性と女性を比較した場合、認知機能・ADL・活動度に大きな差はないと思われる一方、女性はロコモの傾向がみられやすいと考えられた。今後は着実に受診の勧奨しデータベースを充実させるとともに、疾患・薬剤等の関りを評価していく。

引き続き ToMMo と連携をとり、データの解析を行うための基盤の構築を進める。

ゲノム解析については、現時点では一つの集団の結果であり、今後、今回のサンプルとは異なる再検証用の症例を～1,000 例程度解析することにより上記結果が真の関連であるかを見極める必要がある。その後、遺伝子ベースでの関連解析による更なる関連遺伝子の同定、遺伝子発現 QTL (eQTL) や遺伝子パスウェイ解析による関連バリエーション群のアノテーション、ポリジェニックリスクスコアの産出等を行うことを考慮する。

パイロット・スタディとして行った範囲内では、現在のところ大脳白質病変と関連した代謝産物を明らかにすることができなかった。主成分分析やヒートマップ解析を行っても、残念ながら Upper 群と Lower 群では有意な差を示す物質は同定されず、機能的な傾向も示されていない。以降の結果は、メタボローム解析の結果であるが、今後、リポドミクス解析を追加することにより脂質成分に焦点を絞り、Lipid Search を用いたさらに詳細な脂質分子に関する解析を継続していく予定である。

#### E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表：

1. Peak Work Rate during Exercise Could Detect Frailty Status in Elderly Patients with Stable Heart Failure. Kawashima K, Hirashiki A, Nomoto K, **Kokubo M**, Shimizu A, Sakurai T, Kondo I, Washimi Y, Arai H, Toba K, Murohara T. Int Heart J. 2019 Nov 30;60(6):1366-1372.

2. 橋本駿，平敷安希博，川村皓生，植田郁恵，佐藤健二，佐竹昭介，川島一博，野本憲一郎，**小久保学**，清水敦哉，近藤和泉 「高齢心不全患者のフレイル評価における基本チェックリスト下位項目と心不全の予後予測指標の関連」 心臓リハビリテーション (JJCR) 26 (3・4) : 341-348, 2020

2. 学会発表：

1. Genome-Wide Association Study identifies two novel chromosome loci associated with Cerebral White Matter Hyperintensities volume in Japanese population.

**M. Kokubo**, K. Ozaki, H. Nakanishi, H. Ohta, A. Shimizu, H. Arai, T. Sakurai. Alzheimer's Association International Conference (AAIC)2020 (Poster #41342)

2. Hirashiki A, Kawashima K, Nomoto K, **Kokubo M**, Shimizu A, Arai.H. Exercise capacity is negatively associated with cerebral white matter hyperintensity in elderly patients with heart failure. ESC Web Site/ Congresses Heart Failure 2019 - 6th World Congress on Acute Heart Failure (2019年5月, Athens, Greece) Moderated Poster Presentation

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