

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659450

研究課題名（和文） アルツハイマー病の新たなバイオマーカーの探索

研究課題名（英文） Study for novel biomarkers for Alzheimer' s disease

研究代表者

東海林幹夫（SHOJI MIKIO）

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60171021

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病（AD）や非AD型認知症の簡便で迅速な血液・脳脊髄液バイオマーカー検査法の確立による疾患の早期診断と治療法の開発を進めた。1)血液tau, リン酸化tau (ptau)の存在を同定するために, ヒト中枢性タウ抗体 (tauA/tauB) による免疫沈降法で, Tgtau P301L モデルマウスの脳脊髄液および血液にタウの代謝分画を同定したが, 末梢性および中枢性両者の分画で有り, 中枢性タウ特異分画の確認がさらに必要であった。脳脊髄液および血漿での  $\alpha$ -synuclein 測定の基礎的検討では臨床应用到十分な再現性が得られた。各種認知症疾患と各種非認知症変性疾患 105 例の測定ではAD, 軽度認知障害, 正常対照の順に増加しており, パーキンソンでは低下が見られた。CSF A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, tau および血液 A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 測定値ともAD, 軽度認知障害で相関が見られた。TDP-43 では抗体を作成中し, 高感度ECL測定系の基礎的検討を行っている。脳脊髄液プロテオミックスによって明らかにされた分子量3万以上のADのバイオマーカーとしての28候補は, 特許申請のために, さらにバイオインフォマティクス解析を加えた。

研究成果の概要（英文）：

To facilitate early diagnosis of AD dementia and other non-AD dementias, simple and quick assay of CSF and plasma biomarkers for Alzheimer disease and non-AD dementia were studied and developed. 1) To identify presence of plasma tau and p-tau, anti-human CNS tau antibodies (tauA/tauB) were developed. Western blot analysis of immunoprecipitated samples from CSF and plasma of TgtauP301L mice using tauA/tauB revealed the real presence of metabolized tau fragments from CNS and PNS. Further confirmation of the presence of CNS tau was necessary. Basic evaluation of CSF and plasma  $\alpha$ -synuclein showed adequate reproducibility and sensitivity. Measurements of 105 cases of AD and non-AD dementias showed that increased levels of MCI, and other neurological diseases CSF A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, tau および血液 A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 測定値 in AD, MCI, and controls, but, decreased levels of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson diseases. The levels of CSF A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, tau and plasma A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 were correlated with those levels of  $\alpha$ -synuclein. High sensitive ELISA of TDP-43 are developing. Candidate 28 molecules as Alzheimer disease identified by proteomics analysis of CSF proteins with more than 30,000 kD were further evaluated using bioinformatics data base for patent filing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：神経分子病態学・神経内科学

### 1. 研究開始当初の背景

先進各国とアジア諸国では人口の高齢化とともに認知症が爆発的に増加しており、本邦でも既に300万人を突破し、15年後には400万人と推計されている。根本的な治療法は無く、年間4兆円の国民医療費が消費され、その予防・診断・治療は超高齢化社会の我が国では大きな問題になっている。バイオマーカー研究の分野ではADにおける脳脊髄液(CSF) A $\beta$  42やtauが先行し、アミロイドPET画像とともにAD発症予測の国際共同研究

(Alzheimer Neuroimaging initiative: ADNI)によって、CSF A $\beta$  42が最もエビデンスを有するバイオマーカーであることが判明しつつある。しかし、ADの根本的治療法が未解決であることやアミロイドPETの感度と普及性などには問題があり、CSF検査も煩雑・侵襲的であるため実際の臨床診断には広く利用されていない。また、非AD型認知症や神経変性疾患との鑑別を目的としたバイオマーカーの開発とエビデンスも求められている。このため、ADの早期診断と他の変性疾患の診断にも利用できる簡便で信頼性の高いバイオマーカーの開発が強く求められている。簡便さやスクリーニングの利便性では血液を用いた検査への利用が極めて優れており、本研究では簡便で迅速な血液によるADと神経変性疾患のバイオマーカー検査法の確立、文部科学省知的クラスター創成事業「さっぽろバイオクラスター構想」(第II期, 2007~2009)による臨床プロテオミクス解析によって解明され、特許申請された28のバイオマーカー候補群の検証、弘前大学もの忘れ外来例の前向追跡コホートによるこれらの新たなバイオマーカーの臨床的エビデンスの検証、高感度検査法の開発を行う。

### 2. 研究の目的

我が国は超高齢化社会を迎え、認知症の早期診断・治療が急務の課題になっている。本研究はアルツハイマー病(AD)や非AD型認知症の簡便で迅速な血液・脳脊髄液バイオマーカー検査法の確立を目的とし、疾患の早期診断と治療法の開発を目的とする。具体的には①簡便な血液 surrogate (代理) マーカー群を探索し、②ADおよび神経変性疾患で臨床プロテオミクス解析を用いて得られた新たなバイオマーカー群の臨床的意義を検証し、③同時に高感度臨床検査法を開発して、④前向き追跡研究コホートによる臨床的エビデンスの検証を行い、簡便、迅速で現実的に臨床応用可能なバイオマーカーの早期実用化を目的とする。

### 3. 研究の方法

これまで開発した変異ヒトtauを過剰発現するTgTauP301LモデルマウスのCSFと血液を用いて、抗ヒトtau抗体(ビオチン化HT-7, BT-2)と新たに作成したヒト中枢性tauに対する抗体(tau-A, tau-B)を用いて、免疫沈降を行い血液tauの存在を検討した。ヒト血液で同様の方法を用いてtauを同定し、質量分析解析による検証、ELISA測定系を開発する。

$\alpha$ -synuclein, TDP-43のELISAのECL法による高感度測定系による微量測定を開発する。バイオマーカーの臨床的検討は、特にAD, DLB, FTLT-DTPなどの非AD型認知症や神経変性疾患において行う。

脳脊髄液の質量分析によって、分子量3万以上の蛋白は142種類が同定されたが、このうち28のマーカーにADとの相関がみられた。これらの28マーカーについて、認知症例で臨床的検証を行う。これまで測定したCSF A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, tauおよび血液 A $\beta$ 40, A $\beta$ 42測定値との相関統計解析をおこない、臨床的有用性を検証する。

### 4. 研究成果

これまで開発した変異ヒトtauを過剰発現するTgTauP301LモデルマウスのCSFと血液を用いて、抗ヒトtau抗体(ビオチン化HT-7, BT-2)と新たに作成したヒト中枢性tauに対する抗体(tau-A, tau-B)を用いて、免疫沈降を行い血液ヒトtauの存在を同定した。

Tgtau P301Lモデルマウスの脳脊髄液および血液にタウの代謝分画をWestern blotと質量分析によって同定したが、末梢性および中枢性両者の分画で有り、中枢性タウ特異分画の確認がさらに必要であった。マウスCSF, 血液tauのELISAによる測定は可能であった。今後、さらに微量な血液tau分画の検索を行う必要がある。

ヒト血液で同様の方法を用いて中枢性、抹消性tauを同定し、質量分析解析による検証を行い、同様にWestern blotおよび質量分析によって代謝分画を同定したが、上記抗体セットによるECL法による微量ELISA測定系では測定感度が低く、更なる高感度化が必要であった。

$\alpha$ -synuclein, TDP-43のELISAを作成し、ECL法による高感度測定系による微量測定の開発では、バイオマーカーとしての臨床的検討をAD, DLB, FTLT-DTPなどの非AD型認知症や神経変性疾患において行った。脳脊髄液および血液の $\alpha$ -synucleinのELISAによる同定は可能であり、ヒト脳脊髄液および血漿での測定の基礎的検討では臨床応用に十分な再現性が得られた。弘前大学物忘れ外来における各種認知症疾患と各種非認知症

性変性疾患 105 例の測定では AD, 軽度認知障害, 正常対照の順に増加しており, パーキンソンでは低下が見られた. CSF と血漿の比ではさらにこの変化が著明となっている. また, 従来の CSF バイオマーカーである CSF Aβ40, Aβ42, tau および血漿 Aβ40, Aβ 測定値とも AD, 軽度認知障害で相関が見られた.

TDP-43 では抗体を作成中し, 高感度 ECL 測定系の基礎的検討を行っている.

プロテオミクスによって CSF の質量分析によって, 分子量 3 万以上の蛋白は 142 種類が同定されたが, このうち 28 のマーカーで既に報告されているもの以外の分子に関して, さらに質量分析を行い, バイオインフォマティクス解析を加えて, 特許申請を行った

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Morihata T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim JW, Ki CS, Won HH, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I; Alzheimer Disease Genetics Consortium, St George-Hyslop P, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenberg GD, Farrer LA, Kuwano R. SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One*. 2013;8(4):e58618. doi: 10.1371/journal.pone.0058618. (査読有り)

(2) Takamura A, Sato Y, Watabe D, Okamoto Y, Nakata T, Kawarabayashi T, Oddo S, Laferla FM, Shoji M, Matsubara E. Sortilin is required for toxic action of Aβ oligomers (AβOs): Extracellular AβOs trigger apoptosis, and intraneuronal AβOs impair degradation pathways. *Life Sci*. 2012 10;91(23-24):1177-86. doi: 10.1016/j.lfs.2012.04.038. (査読有り)

(3) Shoji M. Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Clinical Molecular and Genetic Studies on Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Sci*. 2012. [Epub ahead of print] (査読有り)

(4) Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y; the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Altered γ-secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*. 2012 . 4(4):344-52. doi: 10.1002/emmm.201200214. (査読有り)

(5) Abe K, Ikeda Y, Kurata T, Ohta Y, Manabe Y, Okamoto M, Takamatsu K, Ohta T, Takao Y, Shiro Y, Shoji M, Kamiya T, Kobayashi H, Koizumi A. Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation Asidan. *Eur J Neurol*. 2012. 19(8):1070-8. doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03669.x. (査読有り)

(6) Shoji M. Biomarkers of the dementia. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;564321. doi: 10.4061/2011/564321. (査読有り)

(7) Watanabe M, Adachi Y, Jackson M, Yamamoto-Watanabe Y, Wakasaya Y, Shirahama I, Takamura A, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M. An unusual case of elderly-onset cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) with multiple cerebrovascular risk factors. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2012. 21(2):143-5. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis. (査読有り)

(8) Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Urisu T, Yamamoto N, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara E. Extracellular and intraneuronal HMW-AβOs represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. *Mol Neurodegener*. 2011. 6(1):20. doi: 10.1186/1750-1326-6-20. (査読あり)

(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. Dissociation of β-amyloid from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates β-amyloid-42 assembly. *J Neurosci Res*. 2011. 89(6):815-21. doi: 10.1002/jnr.22615. (査読有り)

(10) Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura

A, Kurata T, Murakami T, Abe K, Yamada K, Wakabayashi K, Sasaki A, Westaway D, Hyslop PS, Matsubara E, Shoji M. Factors responsible for neurofibrillary tangles and neuronal cell losses in tauopathy. J Neurosci Res. 2011. 89(4):576-84. doi: 10.1002/jnr.22572. (査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

1. Kawarabayashi T, Nakata T, Wakasaya Y, Matsubara E, Shoji M, Aβ oligomers in lipid rafts impair signal transduction pathways in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 2012, the Society for Neuroscience, 42th Annual Meeting, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
2. 東海林幹夫, 第 3 回日本血管性認知症研究会シンポジウム「認知症の画像・バイオマーカー」, 東京ステーションコンファランス, 2012, 9 月 8 日
3. 東海林幹夫, ホットトピックス H(2)-1, アルツハイマー病の新しい診断基準. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年, 5 月 24 日, 東京
4. 東海林幹夫, アルツハイマー病のバイオマーカー, 日本認知症予防医学会, ランチョンセミナー, 鳥取大学米子キャンパス. 2012 年 4 月 8 日
5. 東海林幹夫, アルツハイマー病, 第 1 回認知症研修会 in 米子, ランチョンセミナー, 2012 年 4 月 7 日
6. 東海林幹夫, アルツハイマー病: 新しい薬物療法の進歩. 第 29 回 日本神経治療学会ランチョンセミナー. 2011 年 11 月 18 日, 福井フェニックスプラザ
7. 東海林幹夫, 認知症の画像診断, 第 27 回診療放射線技師総合学術大会ランチョンセミナー, 青森文化会館, 2011 年 9 月 18 日
8. 東海林幹夫, 認知症と薬物療法の進歩. 第 20 回日本意識障害学会, ランチョンセミナー. 弘前ベストウエスタンホテル. 2011 年 9 月 3 日
9. 松原悦朗, 仲田崇, 中畑直子, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 東海林幹夫, リポ蛋白が Aβ 重合化の制御因子である. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム, 2012 年 5 月 23 日

10. 松原悦朗, 高村歩美, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 東海林幹夫, アルツハイマー病と軽度認知障害の発症予測スクリーニングマーカーの検証. 第 52 回日本神経学会学術大会 名古屋, 2011 年 5 月 20 日
11. 瓦林毅, 仲田崇, 若佐谷保仁, 松原悦朗, 東海林幹夫, Aβ Oligomer は lipid raft の信号伝達系を障害する. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム, 2012 年 5 月 25 日
12. 瓦林毅, 若佐谷保仁, 松原悦朗, 東海林幹夫, Aβ oligomer は lipid rafts で tau 蓄積を促進する. 第 52 回日本神経学会学術大会 名古屋, 2011 年 5 月 20 日
13. 仲田崇, 瓦林毅, 若佐谷保仁, 松原悦朗, 東海林幹夫, 動物モデルを用いた脳アミロイド β 蛋白の伝播性の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム, 2012 年 5 月 25 日
14. 若佐谷保仁, 瓦林毅, 松原悦朗, 東海林幹夫, DNA microarray による神経原線維変化の形成および神経細胞死に関与する因子の解析. 第 52 回日本神経学会学術大会 名古屋, 2011 年 5 月 19 日

[図書] (計 11 件)

1. 東海林幹夫, CQ V-2 Alzheimer 病(AD)の診断基準は?; CQ V-3 Alzheimer 病(AD)の画像診断基準は?; Alzheimer 病(AD)のバイオマーカーにはどのようなものがあるか; 認知症疾患治療ガイドライン 2010. コンパクト版 2012: 日本神経学会監修, 「認知症疾患治療ガイドライン」作成合同委員会編集. 医学書院, 2012, 130-136
2. 東海林幹夫, Alzheimer 病(AD)の診断基準が新しく改定された画像診断における特徴的所見を教えてください. 診断する上での注意点はありますか? 認知症診療 Q&A92 中外医学社, 2012, 32-34, 40-423.
3. 東海林幹夫, 薬物治療. 認知症: 神経心理学的アプローチ. 辻省次, 河村満編 中山書店 2012, 352-360
4. 東海林幹夫, アミロイドーシスへの濾過医を深めるための用語集. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業, アミロイドーシスに関する調査研究班 (安東由起夫班長編) 2012 年 10 月
5. 東海林幹夫: Part3, アルツハイマー病. 別

冊 NHK きょうの健康「認知症」NHK 出版,  
2012, 38-44

6. 東海林幹夫, I. 症候と鑑別診断, 知的  
機能障害と認知症, 今日の神経治療指針 第  
2 版 (水澤英洋編), 医学書院, 東京, 2012,  
8-16

7. 東海林幹夫, アミロイドーシス診療のす  
べてーガイドラインー完全詳解ー. 6 脳ア  
ミロイドーシス (1) アルツハイマー病. 別  
冊・医学のあゆみ (山田正仁編) 医歯薬出版  
社, 2011, 108-130

8. 東海林幹夫: 脳アミロイドーシスに対す  
る AB 免疫療法. アミロイドーシス  
uptodate, 別冊・医学のあゆみ (山田正仁編)  
医歯薬出版株式会社, 2011, 33-40

9. 東海林幹夫: 第 16 章, 脳卒中による認知  
症, 脳卒中の内科的治療. 弘前大学出版会「脳  
を知る」シリーズ, 第 1 巻「脳卒中を知る」  
佐藤敬, 若林孝一編 弘前大学出版会, 2011,  
70-74

10. 東海林幹夫, 認知症臨床研究の動向と展  
望. 日本臨床増刊号 認知症学 (上)ーその  
解明と治療の最新知見ー, 日本臨床社 2011,  
15-21

11. 東海林幹夫, MCI とその概念, 4)  
conversion と reversion. 日本臨床増刊号 認  
知症学 (下)ーその解明と治療の最新知見ー,  
日本臨床社 2011, 486-492

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 神経変性疾患検査用バイオマーカーと  
その利用法

発明者: 東海林幹夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-2178

出願年月日: 2012 年 11 月 14 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.h-shinnai.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東海林幹夫 (SHOJI MIKIO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 60171021

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松原悦朗 (MATSUBARA ETSURO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・

准教授

研究者番号: 70219468

瓦林毅 (KAWARABAYASHI TAKESHI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90186156

若佐谷保仁 (WAKASAYA YASUHITO)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10598725