

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06787

研究課題名(和文) 血液でアルツハイマー病を超早期に診断する

研究課題名(英文) Diagnosis of Alzheimer's disease by plasma

研究代表者

城谷 圭朗 (Shirotani, Keiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：20322696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳特異的な糖鎖を認識するレクチンを用いてアルツハイマー病患者と対照者のiPS細胞由来神経細胞の培養上清中から糖タンパク質を精製し質量分析計で比較したところ、両群間で有意に量が異なる糖タンパク質が20種類以上同定された。その中にエクソソームで発現していることは6個存在した。脳脊髄液を直接電気泳動しウエスタンブロット分析を行った結果バイオマーカー候補2のみ検出することができた。その他5種類については脳脊髄液からS社、F社のエクソソーム精製キットで調製したエクソソームのウエスタンブロット分析を行った。その結果バイオマーカー候補1, 2, 3, 4, 6が検出されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超早期バイオマーカーを同定するため、脳特異的糖鎖を持つタンパク質を精製しアルツハイマー病患者と対照者間比較からバイオマーカー候補を見出した点で新規性がある。またエクソソームに存在する6分子について、脳脊髄液のエクソソームにも確かに存在することが明らかになったため、このことから血液のエクソソームでの検出にも期待が持てる結果となっている。以上の結果は、血液という比較的侵襲性の少ない臨床検体内の脳特異的糖鎖を補足することで、脳の疾患であるアルツハイマー病の診断法を開発し、より多くの一般の方が診断を受けられる可能性を提示したという点で社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：I purified the glycoproteins from culture supernatants of iPS-derived neurons of Alzheimer's patients and controls by lectins which recognize brain-type carbohydrate side chains and subjected them to mass spectrometry. More than twenty glycoproteins were identified with different expression levels between Alzheimer's patients and controls. Among them six glycoproteins were reported to be expressed in exosomes and selected for biomarker candidates. One of the six (candidate 2) was detected by Western blotting method of cerebrospinal fluids (CSF). Five proteins (candidates 1, 2, 3, 4, 5) were detected in exosomes which were purified from CSF by S and F company.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 バイオマーカー 血液 脳脊髄液 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

近年の超高齢化とともに加齢を最大の危険因子とする認知症の患者は増加し続け、2025年には700万人を超えると推計されている(厚生労働省2015年)。よって認知症の約6割を占めるアルツハイマー病(AD; Alzheimer's Disease)は、最も克服すべき疾患の一つである。ADの臨床試験が10年来失敗しているが、その理由として投薬開始時期の問題がある。原因物質であるアミロイドペプチドが脳に蓄積し始めるのは認知機能障害が現れる20年以上前であり、ADを発症し来院する頃には不可逆的な神経細胞死が進行しているため投薬しても手遅れである。よって治療薬開発には神経細胞死が進行する前の超早期の段階(ADの前段階である軽度認知障害かそれよりさらに前の健常者)を感度よく検出する診断法が不可欠である。現在のところ超早期かつ特異的にADを検出できる診断法はA $\beta$ やタウの検出に基づく脳脊髄液か脳画像診断だけである。しかしながら脳脊髄液診断はその採取が侵襲的であること、脳画像診断は高価であることが欠点である。超早期のADを診断するという事は症状がほとんど現れていない人を対象とするので、診断法は簡便かつ安価でなければならない。A $\beta$ やタウの変化が血液で検出できれば非常によい超早期診断法になるがこれまでのところ再現性のある結果は得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究は多くの方が検査を受けられるようにADの超早期血液バイオマーカーを開発する。本診断で陽性の方がより精度の高い脳脊髄液や脳画像診断を受ける動機にするための第一次スクリーニングという位置づけにするため超早期にADを検出することに重きを置く。

本研究の目的は段階的に2つあり、まず(1)AD患者のiPS細胞から超早期バイオマーカー候補を同定する。次に(2)血液から脳由来のエクソソームを精製しその中に存在する超早期診断バイオマーカーを同定する。これら2つのアプローチいずれにも研究代表者が明らかにしてきた「脳特異的な糖鎖」を認識するレクチンを利用することが特徴である。

(1)AD患者と対照者のiPS細胞から分化させた神経細胞の培養上清のプロテオミクスによりバイオマーカー候補を同定する。これは研究代表者が発表したオリジナルの方法である(Shirotani et al. J Biochem. 162, 391, 2017)。この培養上清は脳脊髄液や血液などの臨床検体ではないので、生活習慣や加齢の影響を受ける前の超早期に変化するバイオマーカーを発見することができる。これを研究ツールに選定した。一方、これまでに臨床検体を用いたプロテオミクスでは有用なバイオマーカーはほとんど同定されていないが、これは臨床検体では個々の生活習慣や加齢の影響をはじめとして様々な要因によりバイオマーカーの変動の度合いが異なり、AD患者で共通して変化するものを発見することが困難になるためと考えられる。そこでこの欠点を克服するためにもiPS細胞という*in vitro*の研究ツールを用いる。同定したバイオマーカー候補は最終的には臨床検体で評価するが、複数のバイオマーカーを組み合わせることで個人差を克服することができると考えている。またこの実験に用いるiPS細胞は、神経細胞に分化誘導後ADのフェノタイプを再現できたもの(Kondo et al. Cell Stem Cell. 12, 487, 2013)を用いるので、患者脳をよく模倣している系となっている。

(2)着目したエクソソームは脳血管関門を通過すること、エクソソームのタンパク質は血液中のプロテアーゼによる分解をまぬがれていることから、脳のタンパク質を血液で検出することに有利である。エクソソーム表面にも糖鎖が存在しているので、脳特異的な糖鎖を認識するレクチンを用いて脳由来エクソソームを血液から精製する。その中のタンパク質を界面活性剤で抽出し質量分析計で定量的に検出することにより超早期バイオマーカーを同定する。

### 3. 研究の方法

研究代表者らがこれまでに明らかにしてきた脳特異的な糖鎖を持つ糖タンパク質を iPS 細胞由来神経細胞の培養上清中に存在するかをレクチンプロットで調べる。その中からサンプル中の脳特異的な糖鎖を持つ糖タンパク質を効率よく検出するレクチンを決定し、該当タンパク質をアルツハイマー病患者と対照者から精製し、質量分析計で量的に違いのあるものを同定する。それらをバイオマーカー候補とし、脳脊髄液のエクソソームで検出する方法を確立し、最終的に血液のエクソソームから検出し、バイオマーカーとしての妥当性を明らかにする。エクソソームの精製方法が実験の成否を決めると考えられるので、2 者の市販キットによる精製を比較検討する。当初は Goetzl らの方法 (Goetzl et al. *Neurology* 85, 40, 2015) に従い L1CAM の抗体で血液に存在する神経細胞由来のエクソソームを精製することを考えていたが、その後再現性に欠けるという情報を複数の研究者から得られたので断念した。

### 4. 研究成果

#### (1) バイオマーカー候補の同定

iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の培養上清中に脳特異的な糖鎖を持つ糖タンパク質が存在するかどうかを調べるため、研究代表者の過去のデータをもとに (Futakawa et al. *Neurobiology of Aging* 33, 1807, 2012) レクチンプロットを行った。その結果 iPS 細胞由来神経細胞の培養上清には PHA(E) および WGA レクチンと結合する糖タンパク質が存在することが明らかになった。これより iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の培養上清にも脳特異的な糖鎖を持つ糖タンパク質が存在することが示唆された。一方で、脳特異的な糖鎖に結合する UDA レクチンでは培養上清中に結合するタンパク質が検出できなかった。これは UDA レクチンの検出感度の低いためだと思われるので実験ツールから除外した。

次に脳特異的な糖鎖を認識するレクチンを用いてアルツハイマー病患者と対照者の iPS 細胞由来神経細胞の培養上清から糖タンパク質を精製し、トリプシン消化後質量分析計で分析し、存在量を比較することでバイオマーカー候補を抽出した。その結果、両群間で有意に量が異なる糖タンパク質が 20 種類以上同定された。両者の存在量比は 0.25 から 32 であった。さらに絞り込むために、エクソソームで発現していることが少なくとも一つの文献で示されている分子を抽出したところ 6 個が抽出された。過去の報告によると、これらの中には以下のようにアルツハイマー病バイオマーカーとして非常に興味深いものがあった。まずバイオマーカー候補 1 はアストロサイトから分泌される糖タンパク質であり、タウのリン酸化を促進させる。また患者血液で増加することも報告されている。バイオマーカー候補 2 は候補 1 のホモログでありアルツハイマー病脳で多く存在し、記憶障害を誘発するという報告がある。一方でバイオマーカー候補 2 の機能を阻害すると学習能力を回復させるという報告もある。本研究ではアルツハイマー病で増加する可能性が示唆されたので、これまでの報告とも一致する。バイオマーカー候補 3 もアルツハイマー病で増加するという報告や、アミロイド と共局在するという報告がある。バイオマーカー候補 4 はアルツハイマー病との関連性は報告されていないが、増殖因子の一つでありグリア細胞の分化、神経細胞の神経突起伸長に関わる分子であった。バイオマーカー候補 5 もアルツハイマー病との関連性は明らかでないが、がん抑制遺伝子であるので神経細胞やグリア細胞の細胞死を制御し発症と関連があるかもしれない。最後にバイオマーカー候補 6 は鉄輸送タンパク質の一つであり、アルツハイマー病患者で多いという報告と少ないという矛盾する報告があった。

## (2) エクソソームの解析

一方で、バイオマーカーを血液のエクソソームで検出する系を確立するための第一歩として、脳脊髄液のエクソソームの解析を行った。具体的には脳脊髄液のエクソソームに脳特異的糖鎖を持つトランスフェリン(Tf-1)が存在しているかを調べた。脳脊髄液から2社のエクソソーム精製キットを用いてエクソソームを精製し、まず精製したエクソソーム画分が確かにエクソソームを含むかどうかについてエクソソームマーカー抗体でウエスタンブロット分析した。すると、2社間で程度の差はあったが、エクソソームマーカーであるCD81が存在していたのでエクソソームが精製されていることがわかった。次に脳特異的糖鎖を持つTf-1の存在をウエスタンブロットで調べた結果、F社のキットに比べてS社のキットで精製したエクソソームにより多量のTf-1が存在した。以後S社のキットを主に使うが、比較のためF社のキットも用いてエクソソームの解析を行った。

## (3) 候補タンパク質の解析

次に脳脊髄液中に、(1)で同定した脳特異的糖鎖を持つバイオマーカー候補を検出することができるかを検討した。もっとも簡便な方法として、脳脊髄液を直接電気泳動しウエスタンブロット分析を行った。その結果バイオマーカー候補2は脳脊髄液のウエスタンブロット分析で予想される分子量に検出できた(図1)。その他5種類のタンパク質を検出するには濃縮が必要であると考えた。

候補タンパク質はエクソソームに発現するという条件で抽出したものであるため、脳脊髄液からS社、F社のエクソソーム精製キットで調製したエクソソームのウエスタンブロット分析を行った。すると、S社のエクソソーム精製キットで精製した脳脊髄液内にバイオマーカー候補1, 2, 3, 4, 6が検出されることが分かった(図2)。また、F社のエクソソーム精製キットで精製した脳脊髄液内にはバイオマーカー候補6のみが検出できたが、S社のキットで精製したエクソソームより多くの候補6が含まれていた(図2)。このことはバイオマーカー候補分子によっては存在するエクソソームの質が異なることを示唆している。

候補タンパク質2

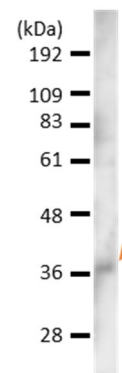


図1 脳脊髄液を直接電気泳動し、候補タンパク質2の抗体でウエスタン分析を行った。

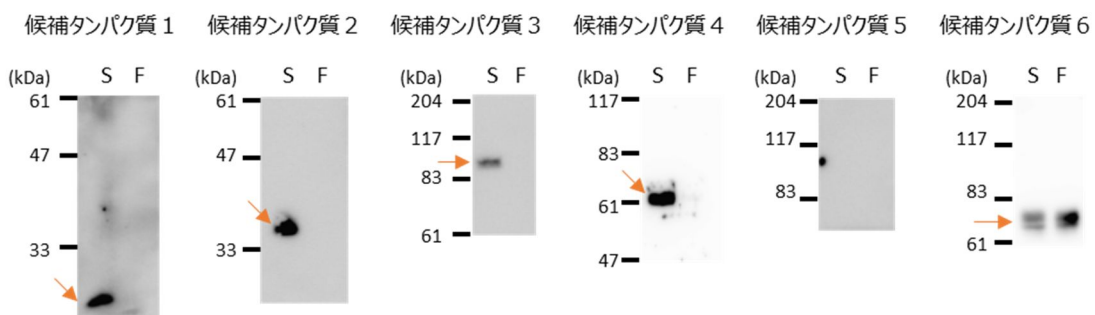


図2 脳脊髄液からS社(S)またはF社(F)のエクソソーム精製キットで精製したエクソソームを各種抗体でウエスタン分析を行った。

今後は脳脊髄液のエクソソームを用いて候補分子5以外のバイオマーカー候補の量を調べアルツハイマー病群と対照群で差異があるかを明らかにする。差があるものについて血液中のエクソソームでも検出できるかを調べて、血液バイオマーカーとしての有用性を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keiro Shirotnani, Yuma Hori, Ryohei Yoshizaki, Eri Higuchi, Marco Colonna, Takashi Saito, Shoko Hashimoto, Takashi Saito, Takaomi C Saïdo, Nobuhisa Iwata	4. 巻 9
2. 論文標題 Aminophospholipids Are Signal-Transducing TREM2 Ligands on Apoptotic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43535-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Daisuke Hatta, Keiro Shirotnani, Yuma Hori, Naohiro Kurotaki, Nobuhisa Iwata	4. 巻 34
2. 論文標題 Activity-dependent Cleavage of Dyskinesia-Related Proline-Rich Transmembrane Protein 2 (PRRT2) by Calpain in Mouse Primary Cortical Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 180-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902148R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 城谷圭朗、岩田修永	4. 巻 37
2. 論文標題 アミロイド 起源	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CLINICAL NEUROSCIENCE	6. 最初と最後の頁 56-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 ミクログリアに発現する危険因子 TREM2 の機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 ミクログリアに発現する神経変性疾患危険因子 TREM2 の機能解析
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田千晴、於久祐己、堀祐真、長井京介、増田豪、大槻純男、長田重一、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 ミクログリアの細胞表面に発現するアルツハイマー病危険因子CD33のリガンドの同定
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 脇田直樹、城谷圭朗、長田重一、Marco Colonna、橋本翔子、斉藤貴志、西道隆臣、岩田修永
2. 発表標題 ミクログリアに発現する神経変性疾患の危険因子TREM2受容体のリガンドの同定
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八田大典、堀祐真、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 痙攣性疾患関連分子PRRT2の神経活動依存的なカルパインによる切断
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田健太郎、八田大典、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 細胞内ドパミン取込みにおけるジスキネジア関連因子PRRT2の機能解析
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城谷圭朗、長田重一、Marco Colonna、斉藤 隆、橋本翔子、斉藤貴志、西道隆臣、岩田修永
2. 発表標題 死細胞およびマウス大脳皮質に発現するTREM2リガンド
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城谷圭朗、長田重一、マルココロナ、斉藤隆、橋本翔子、斉藤貴志、西道隆臣、岩田修永
2. 発表標題 アミノリン脂質は死細胞上のTREM2リガンドである
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田修永、池水文香、渡辺かおり、堀 祐真、地内友香、太田遼佑、Asmaa Said Ali Yassen、Hao Qian、城谷圭朗、田中 隆
2. 発表標題 脂溶性カテキン誘導体によるA seeding抑制作用の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八田大典、永井大己、永田健太郎、地内友香、堀 祐真、渡辺かおり、木下 晃、吉浦孝一郎、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子PRRT2のシナプス調節における役割
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田修永、斉藤 隆、長田重一、Marco Colonna、城谷圭朗
2. 発表標題 死細胞上のアミノリン脂質はミクログリア受容体TREM2からシグナルを伝達する
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池水文香、渡辺かおり、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 脂溶性カテキン誘導体によるA $\beta$ 凝集 (seeding) 抑制作用
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田遼佑、地内友香、沖田啓、渡辺かおり、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 mRNA 5' -UTR構造の違いに基づく組織特異的ネプリライシンの発現機構の解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 八田大典、堀 祐真、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 てんかん及びジスキネジア関連因子PRRT2のカルパインによる神経活動依存的な切断
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田健太郎、八田大典、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 てんかん及びジスキネジア関連因子PRRT2 の細胞内ドパミン取り込みに対する機能解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城谷 圭朗、長田 重一、Marco Colonna、岩田 修永
2. 発表標題 アルツハイマー病危険因子TREM2のリガンドおよびシグナル伝達機構の解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatta D, Shirovani K, Nagata K, Hori Y, Kurotaki N, Iwata N
2. 発表標題 Activity-dependent cleavage of dyskinesia-related proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2) by calpain in mouse primary cortical neurons
3. 学会等名 The 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagata K, Hatta D, Kurotaki N, Shirohani K, Iwata N
2. 発表標題 Regulation of dopamine transporter activity by a dyskinesia-related molecule PRRT2
3. 学会等名 The 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大槻 純男  (Ohtsuki Sumio)  (60323036)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授    (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------