

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590669

研究課題名(和文) 縦断的継続診療によるアルツハイマー病及び軽度認知機能障害病態バイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of plasma biomarker for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment through a longitudinal follow-up study

研究代表者

松本 明(Matsumoto, Akira)

同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員

研究者番号：80181759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：物忘れ外来受診者について、長期間(3年以上)にわたり継続診療し、診断が正常から軽度認知障害(MCI)に変動した例、および更にアルツハイマー病に至った例について臨床情報、画像情報及び血液(血漿)検体を継続的に採取した。

同一被験者由来の異なる採取時期の検体を生化学的精製処理後、質量分析により比較解析した。研究機関内に解析できた他の被験者間も含め検討した結果、6例の正常からMCIへの変動例に共通して同定された血漿ペプチド分子を確認した。立体構造解析から当該分子は補体のエンドペプチダーゼによるC端側消化断片であることが解明され、立体構造を認識するモノクロナル抗体を作製し、診断アッセイ系確立中である。

研究成果の概要(英文)：In order to find biomarker candidates that can discriminate subjects with mild cognitive impairment (MCI) among normal elderly, we have adopted a longitudinal follow-up study of clinical and laboratory information and plasma sampling. Basically, comparative study of plasma samples derived from the same subject but different clinical and laboratory conditions was carried out. Within four years of clinical follow-up, we have identified six cases which developed from normal cognitive condition to MCI.

Using mass-spectrometrical analyses, one peptide candidate was found in plasma samples derived from MCI stage but not from normal stage of the all six cases. The candidate peptide which is uniquely expressed in MCI plasma have been identified as an endoprotease cleavage product of a complement protein expressed in plasma. A novel assay system, employing a monoclonal antibody which recognizes three-dimensional structure of the C-terminal cleavage site is now under progress.

研究分野：病態生化学

キーワード：軽度認知障害 アルツハイマー病 バイオマーカー 縦断的臨床研究 エンドプロテアーゼ 補体 立体構造解析

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病に対する病態治療薬の開発は既に30年もの歳月と莫大な研究開発費を費やし全世界の製薬企業で行われてきているが、研究開始当時(平成23年頃)の時点で近い将来に希望を持ちうる候補薬は存在しなかった。アルツハイマー病(90%以上を占める孤発例)は軽度認知障害という未発症時期(概ね5年程度)を経て発症すると見なされており、発症した患者を対象にするのではなく、軽度認知障害を含む未病期の症例を対象とする研究動向が顕著になってきた。こうした背景を踏まえ、軽度認知障害の時期あるいはそれ以前に正常高齢者中のリスク群を見出すバイオマーカー開発が喫緊の課題であると確認された。

2. 研究の目的

(1) 正常高齢者中から軽度認知障害に移行するリスクを持つ集団を弁別できる病態バイオマーカーを末梢血液に見出し、その分子を同定すること。

(2) 同定されたバイオマーカー候補分子について、臨床検体に対する至適なアッセイ系を確立すること。

(3) 確立されたアッセイ系について、正常例から軽度認知障害を弁別する特異性、感受性を明らかにするとともに、他病態(他の脳変性疾患及び糖尿病)の偽陽性検出の可能性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 縦断的継続診療による有用な検体の採取: 5年間の研究期間中、専門診療施設の物忘れ外来の通院高齢者について、少なくとも3年間の継続診療の過程で軽度認知障害に移行した例について、同意を得て移行前後の血液検体(血漿処理)を研究対象検体とする。

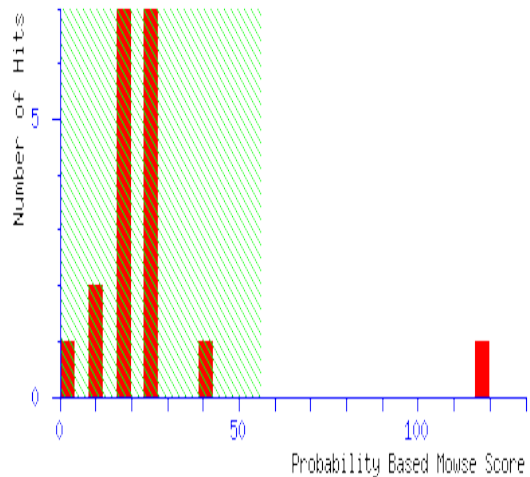
(2) 血漿検体からのマーカー候補分子の探索・同定: 軽度認知障害への明確な移行例6例について、病態時期に応じて採取した血漿検体(総数19検体)を研究対象とした。血漿を生化学的前処理の後、質量分析ペプチドプロファイリングを行った。その結果6例の病態移行に共通して関連するペプチドが確認された。さらにこれを対象として4重極質量分析機により同定した。

4. 研究成果

同定されたペプチドは血清中の補体分子の特定のエンドペプチダーゼによる消化断片であることが配列決定により予測され、コン

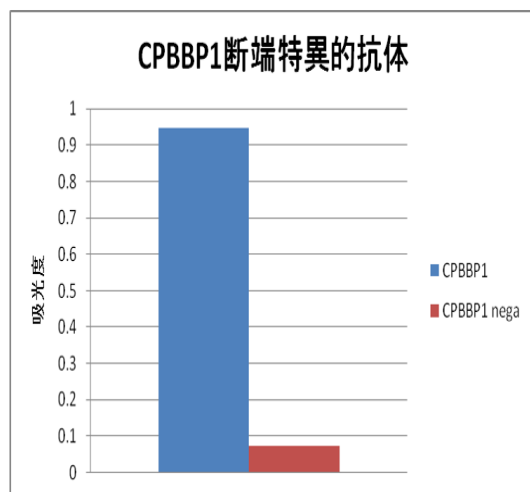
ピュータ上の立体構造解析で確認された。

(図1 質量分析によるPSD同定の1例)



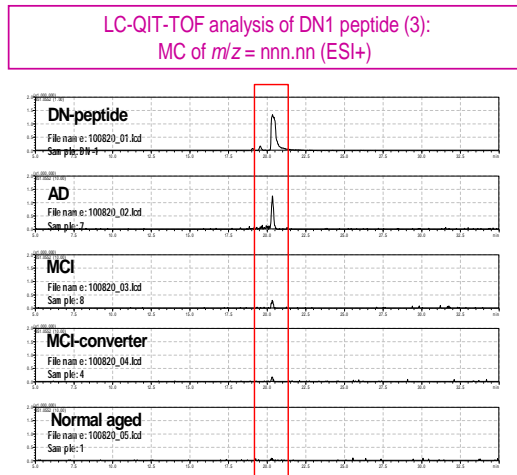
当該エンドプロテアーゼについても、血液中酵素中から95%の確率で推定されている。本ペプチドを検出するにあたって抗体作成を企図したが、一次構造エピトープに対する抗体は血液中に豊富に存在する当該補体分子のため検出は困難で、本ペプチドのC端断端の立体構造を特異的に認識する抗体が最も相応しいと判断した。ラット脾臓細胞(Bリンパ球)を用いたポリクロナル抗体作成系により、下図の様に当該ペプチドのC端断端を認識するが、C端断端から隣接ペプチドのアミノ酸を付加したペプチドは認識しない、ことを条件としてスクリーニングを行った。

(図2 C端断端特異抗体の比活性検出に用いた抗原の1例 青色: 特異抗原、赤色: 対照抗原)



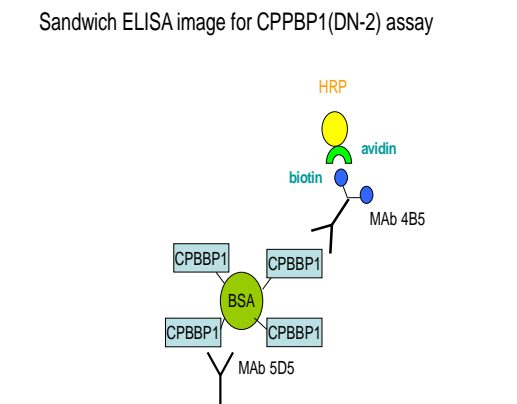
2回に亘り作成したモノクロナル抗体クロ

ーン総計 370 クローンを上記 2 種抗原でその差異の大きいものをスクリーニングし 7 クローンを選択した。これら検出抗体を使用したアッセイ系を構築し、血漿検体（正常者、軽度認知障害例、アルツハイマー病例、（図 3 4 重極質量分析器による血漿検体免疫沈降物の直接同定解析の 1 例 AD：アルツハイマー病、MCI：軽度認知障害）

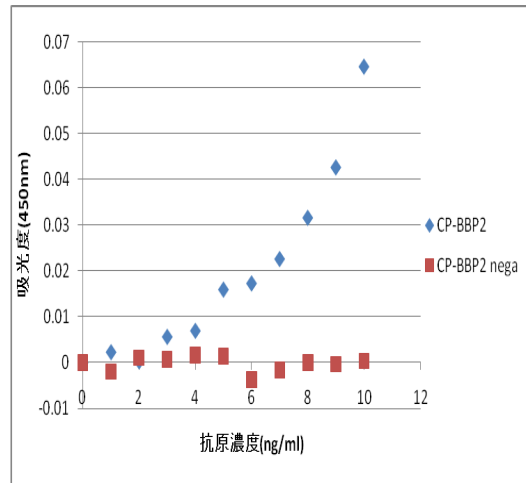


これら以外の病態例（レヴィー小体症、前頭側頭型認知症、ダウン症、他の脳変性疾患）糖尿病例 由来についても検討を加えた。解析の結果、正常時期から軽度認知障害時期を弁別でき、且つ上記他病態に交差反応しないクローンを選択した。すべての条件を満たす 2 クローンについてアッセイ系を構築し、開発のに使用した 6 例以外の検体について現在検討中である。

（図 4 当該モノクローナル抗体を利用したアッセイ系: サンドウィッチ ELISA の概念図）



（図 5 特異性・感受性ともに満足したモノクローナル抗体を用いたアッセイ系による血漿検体定量解析の一例 青色：軽度認知障害例、赤色：正常例）



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Synaptotagmin 1 synthesis induced by synaptic plasticity in mouse hippocampus through activation of nicotinic acetylcholine receptors. Takaaki Nishimoto, Akira Matsumoto et al. *Neuroscience Letters*, 489, 25-29, 2011

査読 有

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 第 39 回 日本神経科学会総会, 2016

Streptozotocin induces neurite outgrowth via regulation of PI3K-Akt-GSK3 β signaling pathway in Neuro2a cells. Takaaki Nishimoto, Akira Matsumoto, Hachiro Sugimoto

(2) 1st International Congress on Traditional Medicine, 2012

Early intervention trial of a novel herbal supplement formula for mild cognitive impairment utilizing potential blood biomarker. Akira Matsumoto.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：病態マーカー・治療薬となるペプチド、並びにその使用

発明者：松本 明

権利者：同上

種類：物質特許
番号：特願 2011-091528
出願年月日：
国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）

名称：神経保護作用を有するペプチド及びこれを含む薬剤
発明者：松本 明
権利者：同上
種類：物質特許・用途特許
番号：特許第 5 7 7 5 3 5 6 号
取得年月日：平成 2 7 年 7 月 1 0 日
国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 明 (MATSUMOTO, Akira)
同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員
研究者番号：80181759

(2)研究分担者

武地 一 (TAKECHI, Hajime)
京都大学・医学部・講師
研究者番号：10314197