

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460200

研究課題名(和文)アルツハイマー病の個別化医療を目指したサブグループ特異的なバイオマーカーの同定

研究課題名(英文)Study on biomarkers of Alzheimer's disease for personalized medicine

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) のサブタイプ特異的バイオマーカーを同定するため、細胞内または細胞外にアミロイドを蓄積するAD患者由来のiPS細胞を神経細胞に分化誘導しその培養上清を網羅的・定量的に解析した。その結果細胞内型AD、細胞外型AD、そして両ADのバイオマーカー候補をそれぞれ複数個同定した。multiplexed-MRM (multiple reaction monitoring)法でiPS細胞由来神経細胞の培養上清の候補タンパク質を定量した結果、現在までのところ3種類の候補タンパク質がLC-MSMS解析と一致する結果が得られた。

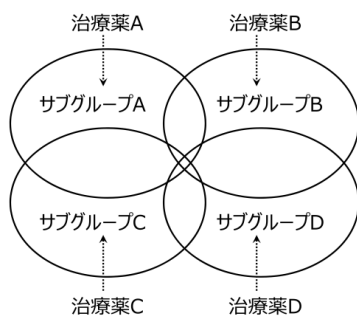
研究成果の概要(英文)：To identify the subtype-specific biomarkers of Alzheimer's disease (AD), iPS cells, which are derived from AD patients who showed accumulation of amyloid beta peptide inside or outside of neurons (intracellular and extracellular AD subtype, respectively), were differentiated into neurons and the culture media were purified and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSMS) for comprehensive and quantitative analysis. We selected several biomarker candidates for intracellular, extracellular and common AD. We next quantitated the levels of the candidates in the culture media by multiplexed-MRM (multiple reaction monitoring) method and have confirmed three candidates show the same change as analyzed by LC-MSMS.

研究分野：神経疾患の生化学

キーワード：アルツハイマー病 バイオマーカー iPS細胞 プロテオミクス 質量分析

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化にともない加齢を危険因子とする認知症の患者は増加し続け、国内で450万人を超えている(厚生省推計2012年)。その約7割を占めるのがアルツハイマー病(AD; Alzheimer's Disease)であり、医療および介護にかかる経済的・心理的負担を考慮すると現在最も克服すべき疾患の一つである。ADの原因物質であるアミロイドペプチド(A β)を標的とした治療が10年以上前から行われているが、未だに根本治療(疾患修飾)薬は認可されていない。その理由の一つとしてA β が脳で蓄積するメカニズムは患者ごとに異なっているにもかかわらず、画一的に治療薬が用いられていることがあげられる。真に根本治療薬を開発するには個々の患者のA β 蓄積のメカニズムを明らかにし、それに応じて効果的な治療薬を選択する個別化医療の考え方が必要である。具体的には下の概念図のように、ADが発症メカニズムなどによりサブグループA~Dに分類される場合には、それぞれのサブグループに最適な治療薬A~Dを選択する必要がある。



概念図 アルツハイマー病患者の発症メカニズムに基づいた分類(サブグループA~D)と治療薬の選択

一方、ヒトiPS細胞の技術開発により個々の患者の遺伝的背景を持った神経細胞を実験室で研究できるようになった。我々の研究グループはiPS細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、これまで一括りにされていた孤発性ADの中に新たなサブグループ、すなわち従来から考えられていた細胞外にA β を蓄積するタイプ(細胞外型)に加えて、細胞内にA β を蓄積するサブ

グループ(細胞内型)が存在することを初めて明らかにした(Kondoら Cell Stem Cell 12, 487, 2013)。さらに細胞内型ADにはDHA(ドコサヘキサエン酸)が治療薬として有効である可能性を示した。これまでの治療薬は細胞外のA β を標的としていたが、我々の発見はいまだに治療が成功していない理由を説明できる可能性がある。以上の研究成果を生かして、細胞内型ADを正確に診断し、DHAなどを治療薬に用いることによりADの個別化医療が可能になると考えた。

2. 研究の目的

最近の我々および他の研究成果から、iPS細胞由来神経細胞の培養上清には脳脊髄液に存在するタンパク質が分泌されていることが明らかになっているので、iPS細胞由来神経細胞の培養上清から脳脊髄液バイオマーカーを同定することを考えた。また我々の先行研究により、細胞内型ADの神経細胞では、対照者に比べて糖転移酵素の量が変化していることがわかっている。その糖転移酵素がタンパク質に付加する糖鎖を持つタンパク質を精製し、細胞内型ADと対照者または細胞外型ADとの網羅的定量的比較解析をし、バイオマーカー候補を同定する。その後は実際に患者の脳脊髄液で変化しているかを調べる。

3. 研究の方法

(1) iPS細胞由来神経細胞の培養上清の調製

用いたiPS細胞のクローン(Kondoら2013)は、A β が神経細胞内に蓄積するAPP-E693変異を持つ家族性AD(familial AD; FAD)の3クローン(APP1E111, APP1E211, APP1E311)とA β が神経細胞外に蓄積するAPP-V717L変異を持つFADの2クローン(APP2E22, APP2E26)を用いた。さらに孤発性AD(sporadic AD; SAD)患者の細胞内型1クローン(AD8K213)と細胞

外型 1 クローン (AD3E211)を用いた。対照者は 3 クローン (N116213, N117322, 409B2) を用いた。iPS 細胞を神経細胞に分化させ、2 日間培養後、その培養上清を実験に用いた。

(2) iPS 細胞の培養上清のバイオマーカー候補タンパク質の精製と質量分析

抗 BSA 抗体による BSA の除去

iPS 細胞由来神経細胞の培養上清 (150 μ L) 中の BSA を抗 BSA 抗体カラムで除去し、トリプシン消化後 LC-MSMS (液体クロマトグラフィータンデム型質量分析) で分析し、細胞内型 AD、細胞外型 AD、対照者間で差のある分子を抽出した。

レクチンカラムによる精製

iPS 細胞由来神経細胞の培養上清 2 mL を 3 種類のレクチンカラムに順次アプライし溶出した。3 つのカラムの溶出タンパク質をひとまとめにし、トリプシン消化後 LCMSMS で分析した。

(3) multiplexed-multiple reaction monitoring (MRM) 法によるタンパク質の定量

iPS 細胞由来神経細胞の培養上清をトリプシン処理し、方法 で同定した 18 種類のバイオマーカー候補タンパク質のペプチド断片の同位体と混合し、LC-MS を行った。

4. 研究成果

(1) BSA 除去によるバイオマーカーの探索

iPS 細胞由来神経細胞の培地には BSA が大量に存在するため、抗 BSA 抗体で培養上清中の BSA を除去後、トリプシン消化し LC-MSMS で網羅的定量的な分析を行った。その結果計 19 種類 (細胞内型 AD バイオマーカー候補タンパク質を 9 種類、細胞外型 AD バイオマーカー候補タンパク質を 2 種類、全 AD のバイオマーカー候補タンパク質を 8 種類) を同定した

(Table 1)。候補タンパク質の増減の倍率は 0.04 倍から 23.1 倍となった。

Table 1. BSA の除去による AD サブグループのバイオマーカー候補タンパク質

iPS 細胞由来神経細胞の培養上清から BSA を除去したサンプルを LC-MSMS 分析し、バイオマーカー候補タンパク質を選出した。表内の倍率は対照者と比較した各サブタイプの AD 患者の増減倍率を示す。

バイオマーカーのサブタイプ	タンパク質	倍率
細胞内型 AD	Protein A	$\times 0.44$
細胞内型 AD	Protein B	$\times 1.18$
細胞内型 AD	Protein C	$\times 2.89$
細胞内型 AD	Protein D	$\times 12.1$
細胞内型 AD	Protein E	$\times 12.5$
細胞内型 AD	Protein F	$\times 23.1$
細胞内型 AD	Protein G	$\times 15.1$
細胞内型 AD	Protein H	$\times 2.97$
細胞内型 AD	Protein I	$\times 0.04$
細胞外型 AD	Protein J	$\times 0.45$
細胞外型 AD	Protein K	$\times 2.88$
全 AD	Protein L	$\times 3.45$
全 AD	Protein M	$\times 1.87$
全 AD	Protein N	$\times 0.45$
全 AD	Protein O	$\times 0.26$
全 AD	Protein P	$\times 7.00$
全 AD	Protein Q	$\times 4.94$
全 AD	Protein R	$\times 0.20$
全 AD	Protein S	$\times 5.80$

上記の結果を確認するため、multiplexed-MRM 法で候補タンパク質の定量を試みた。まず、LC-MSMS で同定されたバイオマーカー候補タンパク質のペプチドフラグメントと同じアミノ酸配列の同位体ペプチドを合成した。次に各 iPS 細胞由来神経細胞の培養上清 (細胞内型 AD (n=4)、細胞外型 AD (n=1)、対照者 (n=3)) をトリプシン消化し、作製した同位体ペプチドと混合し multiplexed-MRM 法を行った。その結果、Protein J、M、O は LC-MSMS 分析で得られた結果と増減が一致した。Protein J は細胞外型 AD のバイオマーカー候補であり、protein M と O は全 AD のバイオマーカー候補である。Protein J、M、O の LC-MSMS 分析では対象者に比べて 0.45 倍、1.87 倍、0.26 倍であった (Table 1) のに対して、multiplexed-MRM 法ではそれぞれ 0.49 倍、1.31 倍、0.83 倍であった。

(2) レクチンによるバイオマーカーの探索

細胞内型 FAD の患者は、O 型糖鎖の最初の N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) を付加する酵素 GalNAc-T1 (polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1) の発現が上昇していることを我々が明らかにしている。そこで、細胞内型 AD 患者の iPS 細胞由来神経細胞培養上清中の O 型糖タンパク質の糖鎖の量に変化があると考え、O 型糖鎖を認識する 3 種類のレクチン (MAH: シアル酸に選択的に結合、WGA: 二量体または三量体の N-アセチルグルコサミンに選択的に結合、PNA: ガラクトシル -1,3-N-アセチルガラクトサミンに選択的に結合) を固相化したカラムで O 型糖タンパク質を精製した。次にそれぞれの溶出画分をまとめ、濃縮後トリプシン消化し、LC-MSMS 解析を行い、細胞内型候補タンパク質を 31 種類同定した (Table 2)。候補タンパク質の増減の倍率は 0.25 倍から 31.52 倍となった (Table 2)。

Table 2. レクチンカラムでの精製による細胞内型 AD サブグループのバイオマーカー候補タンパク質

細胞内型 AD の iPS 細胞由来神経細胞の培養上清からレクチンカラムで精製したサンプルを LC-MSMS 分析し、バイオマーカー候補タンパク質を選出した。

タンパク質	倍率
Protein T	× 31.52
Protein U	× 20.01
Protein V	× 21.57
Protein W	× 10.23
Protein X	× 6.99
Protein Y	× 6.65
Protein Z	× 6.61
Protein a	× 6.02
Protein b	× 5.65
Protein c	× 5.16
Protein d	× 4.40
Protein e	× 4.19
Protein f	× 3.70
Protein g	× 3.62
Protein h	× 3.46
Protein i	× 3.38

Protein j	× 2.88
Protein k	× 2.70
Protein l	× 2.69
Protein m	× 2.35
Protein n	× 2.09
Protein o	× 1.95
Protein p	× 1.45
Protein q	× 0.47
Protein r	× 0.45
Protein s	× 0.44
Protein t	× 0.35
Protein u	× 0.33
Protein v	× 0.27
Protein w	× 0.27
Protein x	× 0.25

考察

(1) iPS 細胞由来神経細胞の培養上清から BSA を除去したサンプルの網羅的定量的解析により、19 個の AD バイオマーカー候補が得られた。そのうち multiplexed-MRM 法で再現できたものは 3 個 (Protein J, M, O) であった。Protein J と M は糖タンパク質の修飾酵素である。AD 発症と糖化はこれまでに因果関係が示唆されているので、バイオマーカーとしての有用性を分析するとともに、AD 発症との関連性を解析することは興味深い。Protein J は、細胞外型 AD で減少していたがこれまでに AD との関連は報告されていない。Protein M は AD 全体で上昇していたが、AD との関連は報告されていない。Protein O は血中の輸送タンパク質であり、全 AD で減少していた。この結果は、AD 患者の CSF で Protein O が減少するという先行研究と一致した。しかしながら BSA を除去する方法では細胞内型 AD のバイオマーカー候補が得られなかったため、レクチンによる糖タンパク質の精製を行った。

(2) レクチンにより糖タンパク質を精製したサンプルの網羅的定量的解析により、細胞内型 AD 患者のバイオマーカー候補タンパク質を 31 種類同定した。この中でこれまでに AD での変化が報告されているものは、Protein T, Z, s, v の 4 つであった。Protein T は増殖因子関連タンパク質、Protein Z はタンパク質の翻訳後修飾酵素、

Protein s は血中の輸送タンパク質、Protein v はミトコンドリアの酵素であった。Protein T や Z は AD で増加しているという報告があり、本研究と一致している。ただしそれら先行研究では AD 患者を細胞内型、細胞外型で区別していないが、本研究のように細胞内型に限定すれば対照者との差はより大きくなる可能性が考えられる。一方 Protein s はこれまでに AD 患者で増加しているという報告と、減少しているという相反する報告がある。これらの報告でも細胞内型、外型を区別していないが、本研究のように区別すると再現性のあるバイオマーカーになるかもしれない。Protein v は既報では AD で増加するが、本研究では逆に減少した。これもやはり患者を細胞内型に限定すればより再現性のあるバイオマーカーが得られるかもしれない。この 4 つ以外のタンパク質はこれまでに AD のバイオマーカーとして報告されていないので新規バイオマーカーになる可能性がある。また細胞内型 AD のバイオマーカーはこれまでに報告されていないので本研究により同定されれば世界初ということになる。今後 multiplexed-MRM 法を用いて、レクチンによる精製で候補に挙げた 31 種類のタンパク質が細胞内型 AD 患者の iPS 細胞由来神経細胞の培養上清で同じ増減を示すのかを確認して候補を絞り込んでいく予定である。

(3) 本研究では 2 つの異なる方法でバイオマーカー候補を複数同定したが、得られた候補タンパク質は 1 つを除いてオーバーラップはなかった。よってこの 2 つの方法により相補的に幅広くバイオマーカー候補が得られることがわかった。以上の成果を踏まえて、今後は AD の脳脊髄液や血液でこれらのバイオマーカー候補が変化しているか、細胞内と細胞外型を鑑別するバイオマーカーになるかを明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Shirotani K, Asai M, Iwata N

Paradigm shift from diagnosing patients based on common symptoms to categorizing patients into subtypes with different pathogenic mechanisms to guide treatment for Alzheimer's disease

J Biochem 2017;161 (6):463-470 (査読あり)

<https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/jb/mvx015>

(2) Kawakubo T, Mori R, Shirotani K, Iwata N, and Asai M

Neprilysin is suppressed by dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A (DYRK1A) in Down-syndrome-derived fibroblasts

Biol Pharm Bull 2017;40 (3):327-333 (査読あり)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/40/3/40_b16-00825/_article

(3) Asai M, Kinjo A, Kimura S, Mori R, Kawakubo T, Shirotani K, Yagishita S, Maruyama K, and Iwata N

Perturbed calcineurin-NFAT signaling is associated with the development of Alzheimer's disease

Biol Pharm Bull 2016;39 (10):1646-1652 (査読あり)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/39/10/39_b16-00350/_article

[学会発表] (計 6 件)

(1) 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎県長崎市、ブリックホール、2017 年 3 月 15 日 ~ 17 日)

岩田 修永, 松尾 和哉, 大槻 純男, 浅井 将, 近藤 孝之, 井上 治久, 城谷 圭朗

患者由来 iPS 細胞を利用したアルツハイマー病のサブタイプ特異的バイオマーカーの探索 (#2-P-2; p. 284)

(2) 第 33 回日本薬学会九州支部大会 (鹿児島)

県鹿児島市、鹿児島大学、2016年12月3日・4日)

松尾 和哉、大槻 純男、浅井 将、城谷 圭朗、近藤 孝之、井上 治久、岩田 修永
アルツハイマー病サブグループのバイオマーカーの探索 (#1-C-10; 要旨 p. 50)

(3) 第 35 回日本認知症学会学術集会(東京都千代田区、東京国際フォーラム、2016年12月1日~3日)

岩田 修永、松尾 和哉、大槻 純男、浅井 将、近藤 孝之、井上 治久、城谷 圭朗
患者由来 iPS 細胞を利用したアルツハイマー病のバイオマーカーの探索 (#124; 要旨 p. 143)

(4) 第 89 回日本生化学会大会(宮城県仙台市、東北大学、2016年9月25日~27日)

松尾 和哉、吉崎 涼平、大槻 純男、浅井 将、城谷 圭朗、近藤 孝之、井上 治久、岩田 修永
アルツハイマー病サブグループのバイオマーカーの探索 (#2P-354; p. 170)

(5) The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences(大阪府吹田市、武田薬品研修所 Japan, January 21 ~ 22 2016)
Matsuo K, Ohtsuki S, Asai M, Shirotani K, Kondo T, Inoue H, and Iwata N

Development of biomarkers specific for Alzheimer's disease subgroups (#Poster 069; Abstract p. 136)

(6) 平成 27 年度日本生化学会九州支部例会(福岡県福岡市、九州大学、2015年5月16日・17日)

松尾 和哉、大槻 純男、浅井 将、城谷 圭朗、近藤 孝之、井上 治久、岩田 修永
疾患 iPS 細胞を用いたアルツハイマー病サブタイプ特異的バイオマーカーの探索 (#B21; 要旨 p. 59)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/biotech/index-j.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

大槻 純男(OHTSUKI, Sumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 60323036

(3)連携研究者

岩田 修永(IWATA, Nobuhisa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号: 70246213

荒井 啓行(ARAI, Hiroyuki)

東北大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 30261613

浦上 克哉(URAKAMI, Katsuya)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 30213507

橋本 康弘(HASHIMOTO, Yasuhiro)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80164797