

日本発 A β 42 サロゲートマーカーの発見と性質 ——アルツハイマー病の発症前診断マーカーへの 応用の可能性——

大河内正康, 田上真次, 柳田寛太, 武田雅俊

Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Masatoshi Takeda

アルツハイマー病は臨床症状が出現したときにはその病理過程はほぼ最終段階に入っていると考えてもよい。最近、発症前のアルツハイマー病が様々に定義されているが、その概念は、まだ脳内に A β 42 やリン酸化タウなどの蓄積が起こっているが、臨床症状のない個人を病前段階として早期治療介入の標的にしたものである。我々はもっと早い段階、すなわち脳内で A β 42 の蓄積が始まっているかどうかを鑑別できる可能性のある新規バイオマーカー候補を脳内に発見し、現在その血液中での測定法の開発を試みている。なぜなら、現在開発中のアルツハイマー病治療薬は脳内での蓄積が起こる前に投与することが最も効果的であると考えられるからである。

<索引用語：アルツハイマー病, 発症前診断, バイオマーカー, APL1 β ペプチド, アミロイド β ペプチド>

はじめに

老化は多細胞生物の逃れられない宿命である。もし、がんや心臓疾患など他の疾患にならなかつた場合、どのくらいの割合の人がアルツハイマー病になるのか、想像の域を超えないが大多数は神経変性を伴う認知症を発症すると考えられる。その中でも最もありふれた老化のパターンをとった場合、その人はアルツハイマー病を発症するだろう。このイメージはアルツハイマー病の発症のバイオマーカーの価値が「誰が発症するか？」ではなく、「誰が何歳くらいで発症するか？」予測可能であるかにかかっていることを理解するのに都合がよい。

アルツハイマー病の発症前診断マーカーは重要である。なぜならアルツハイマー病は、喩えとし

て適切さを欠くかもしれないが、「木造家屋のシロアリ被害」のように、潜行性に進行する特徴をもつからだ。家族が患者の何らかの異変（個体内変化）に気付いた時には、患者脳では病理過程は相当に進行していると考えべきである。ではなぜ最終段階になるまで脳で進行している変化が家族や同僚にさえわからないのか。その大きな原因の1つは生物学的にはヒト脳が大きな代償能力をもつことである。シナプスで間接的に接続される神経回路は電気回路と比較すると極めて可塑性に富む構造であるが、それをしてもカバーできないほどに脳機能が低下してはじめて認知機能低下に関連した症状が出現する。もう1つは、高齢者に対する社会的要請には老化特有の認知機能低下が織り込み済みであることだ。高齢者の多少の認知

著者所属：大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室

本論文は、PCN 誌に掲載された最新の研究論文³⁾を編集委員会の依頼により、著者の1人が日本語で書き改め、その意義と展望などにつき加筆したものである。

機能低下は正常範囲として取り扱われる。

現時点で「アルツハイマー病を治療する」ということは老化の速度を遅らせることといってもよいかも知れない。そのためにはアルツハイマー病の病理過程（アルツハイマー型の老化）を遅らせる薬剤を、その進行の程度が年齢に比して早い患者（または健常者）におそらく継続的に投与することを目標とするのが常識的である。だから、アルツハイマー病根治薬は誰もがそれによって投薬・服薬を納得するような説得力のある早期診断マーカーの開発と2つ揃ってはじめて大きな効果をもつのである。

やや雑駁であるがアルツハイマー病では42アミノ酸残基のアミロイドβ蛋白であるAβ42が凝集を始めることが引き金となり、シナプス障害や老人斑形成が脳内で広く起こる。そしてそれにやや遅れて神経原線維変化を伴う神経細胞死が一部の集団の神経細胞に起こり大脳皮質のカラム構造が崩壊し皮質機能が失われる。したがって、Aβ42がどのようにして産生され、それが調節され、凝集するようになるかを検討することが現時点では根本的といえる。またタウ蛋白は神経細胞死現象に最も直接的に関与しており、その点で極めて重要である。

アルツハイマー病ではAβ42が蓄積する。その仕組みとしてAβ42の産生が増えるか、分解が遅れるか、あるいは脳内での流れが停滞するかして、その脳内濃度が上昇することと予想される。実際、家族性アルツハイマー病の原因となる常染色体優性の遺伝子変異は、Aβ42の材料となる基質上(βAPP)とAβ42を切り出す酵素(PS/γセクレターゼ)上に存在し、その他には見つからない。それらの変異は(一部の例外を除いて)Aβ42の産生比率(つまり産生Aβ全体に占めるAβ42の割合)を上昇させる性質をもつ。しかし、これらの変異のせいで産生されるAβ42量の絶対値は変異のない細胞で産生されるそれよりも一般的に少ない。これは一見逆説的であるが、変異の作用でAβ産生全体が低下するが、Aβ42の産生はそれほど低下しないのでAβ42の比率が比較的

上昇するのである。野生型の酵素と基質から産生されるAβ42の比率は10%程度である。しかし、例えば20歳代で脳内がAβ42で埋め尽くされるような強くて特殊な病理所見(cotton wool plaquesなど)を呈し、かつ日常生活機能にも20歳前後で重大な障害が出るような激しい病原性変異を発現した細胞ではAβ42産生比率は50%以上と極めて上昇している。一方で上述のようにこの変異のせいでAβ42産生量の絶対値は通常より低下する。このような研究結果の積み重ねから、「Aβの産生量ではなくAβ42という悪玉Aβの産生割合が上昇することが家族性アルツハイマー病の発症に関与している」というコンセンサスが徐々にできつつあると考えている。

逆に、他の遺伝子上の家族性変異が見つからないことを考えると、このAβ42の産生比率の上昇は唯一の単独でアルツハイマー病を引き起こす原因であるようだ。ただし、アルツハイマー病にはApoE4という強いリスクファクターがあり、ApoE4を持つ高齢者の発症の比率は著しく高い。将来的に、現在臨床治験中のdisease-course modifierと呼ばれるアルツハイマー病根治薬が認可されるに際して、その時点で効果的なバイオマーカーがいまだ認められていなければApoE4をもつ高齢者が投与の対象になるかもしれない。

話を少し戻して、Aβ42はこのようにアルツハイマー病にとって極めて重要な物質であるから、バイオマーカーとして最も重要な候補である。しかし、Aβ42を発症前のバイオマーカーとして使用することは、現在積極的にすすめられているが、倫理的に難しい側面がある。まず、Aβ42の材料であるβAPPは全身の臓器で発現されており、Aβも全身で常時産生されている。だから、血液を含む体液中のAβ42が脳由来であるかどうか、あるいは測定した体液中Aβ42の値が脳内でのそれを反映しているか、証明が必要である。脳脊髄液中のAβ42の場合はその必要がないが、髄液は採取に侵襲と手間が大きくスクリーニング用のサンプルとしては不適切である。さらに、たとえ髄液を採取して脳内で産生される新規Aβ42量を類

推しようとしても、アルツハイマー病患者では脳内の老人斑に A β 42 蓄積が起こることに関連して髄液中 A β 42 値はむしろ低下する。さらには、脳内には長年の間に大量の A β 42 が蓄積しており、ある時点で髄液中に捉えることのできた A β 42 がいつ産生されたものかわからない。

だから、当初の目的である「発症のはるか前に蓄積を始めた A β 42 を捉えて病理の進行を推測するバイオマーカー」として、A β 42 は論理的でない（発症前にも脳内にすでに A β 42 蓄積がある時期には、それに関連して髄液中 A β 42 量や A β 42 比率は低下する。だから逆説的にその低下をバイオマーカーとしようとする考え方もある。しかし、本稿ではアミロイドイメージングなどの画像解析ではまだ蓄積が明らかになる以前の、本来バイオマーカーがその役割を発揮すべき時点での A β 42 の効果について述べている）。我々はこれが A β 42 の持つ物理化学的な性質である凝集しやすさのせいであると考え、A β 42 と同じ仕組みで産生される別の物質を脳内に探索しようと考えた²⁾。なぜなら、A β 42 の産生される仕組みが「アルツハイマー病発症に専用のもので、他の蛋白の分解に使われていない」と考える方が直感的に不自然だし、もし A β 42 産生と同じようなことが他の基質で行われているならば必ずや脳内にそれが未知のペプチドとして存在しているに違いないと考えたからである。我々はそれを A β -like peptide と仮に名付け 2000 年末ころから探索を始めた（図 1A）²⁾。もしそれが見つかれば、リアルタイムでの脳内での A β 42 産生が推定できる可能性があると考えられたからだ。

現在、PET や CSF 中 A β 42/total-tau/p-tau などを使用して脳内にどれほど A β 42 が蓄積しているかを測定し、発症前診断に役立てようとしている。A β -like peptide をバイオマーカーとして同定し、測定すればそのさらに前段階である A β 42 産生の増大を捉えられる可能性があると考えたわけだ（図 1A）。

I. 研究の経過（方法、結果と考察）

我々はまず、A β を β APP から最終的に切り出す γ セクレターゼに注目し、その最も生理的に重要な基質である Notch-1 受容体²⁾から A β -like peptide が産生されていないか検討した。Notch-1 を人工的に改変して γ セクレターゼによる分解を受けるか細胞レベルで検討したところ案の定 Notch-1 由来の A β -like peptide (N β と名付けた) が分泌されているらしいことがわかった^{1,2)}。都合の良い誤算は、その N β にも長さの長い分子種と短い分子種が存在し、家族性アルツハイマー病を発症するような γ セクレターゼ（正確にはプレセニリン）の変異をもつ細胞では長さの長い N β 25 の産生比率が大きくなることがわかったことだ^{1,2)}。詳しい理由はわからないが、A β 42 の産生比率の増大するとき、N β 25 の産生比率も増大した。これは話がうまい。N β 25 は A β 42 のサロゲートマーカーになるかもしれないと当時考えた。

そこで、生体内で N β を探索することにした。最初にきちんと捉えることができたのはマウス型の N β であつたので、マウスの様々な臓器を調べた。Notch シグナルが形態発生に必須であることから、マウスの胎児も様々な方法で検討した。同時にヒト型 N β 抗体を作製し、ヒトの髄液や脳などの臓器あるいはヒト由来の培養細胞系で N β を同定しようと試みた。しかし、3年以上様々な努力を重ねたにもかかわらず N β は生体内で見つからなかった。今では、その理由を以下のように考えている。N β は恒常的に体中の細胞で産生されている A β とは異なり、シグナル伝達に関連して分泌されるため、その分泌量は少量で厳密に制御されている。だから生理的な N β の産生・分泌を捉えることはほとんどの方法で測定下限以下となるため難しい。そうは言ってもなかなか諦めきれず N β を極少量生体内に発現させ続けるとどうなるか、あるいは妊娠マウスに投与すると発達の障害が起きないかなど、細々と検討を続けているのが現状である。

しかし、A β のようなペプチドの分泌が起こっていること、またその中に A β 42 と並行してその

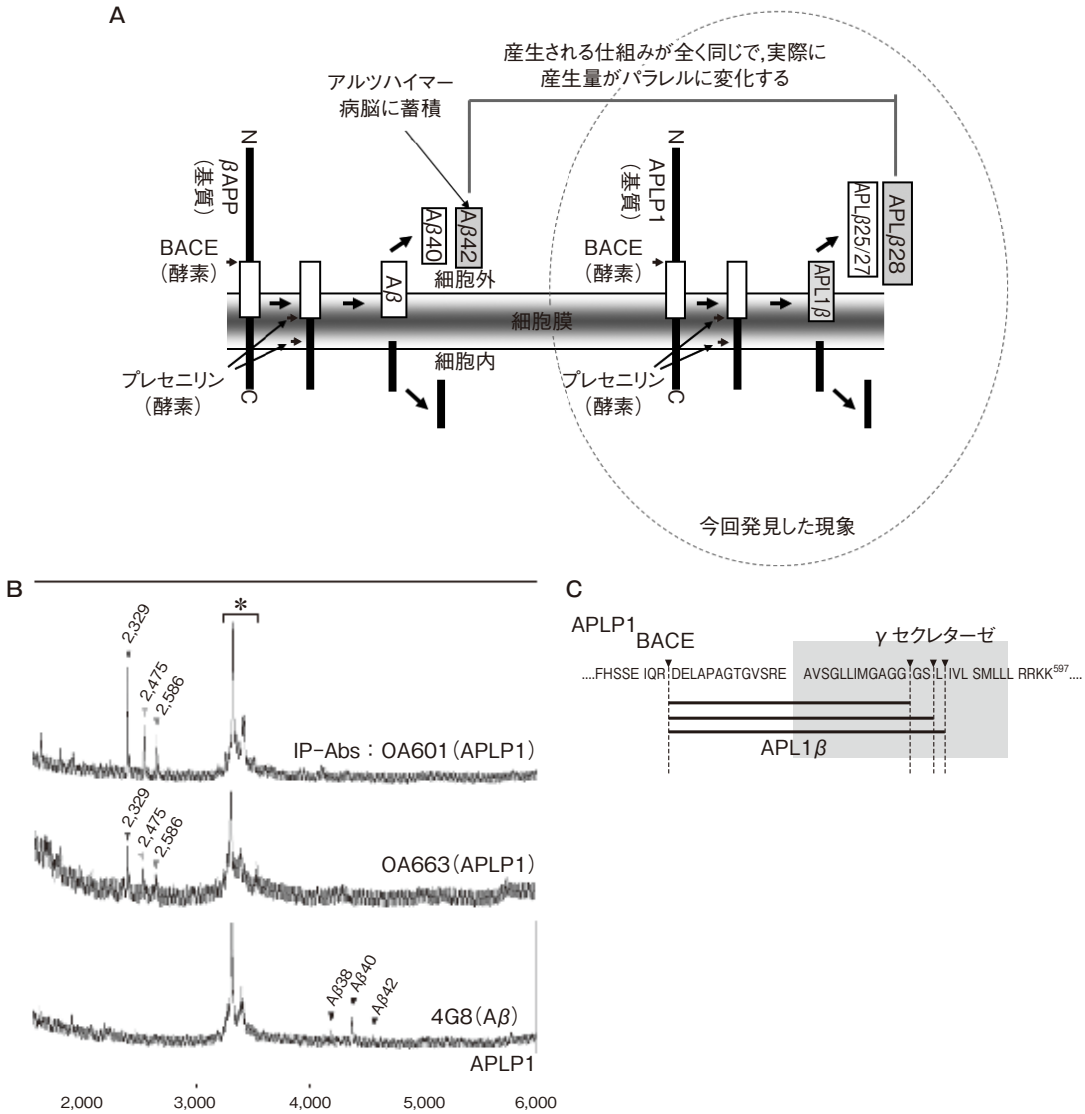


図 1

A : Aβ-like peptide とはどのようなものか、 APLP1 由来の APLβ を例にした模式図。
 B : CSF を APLP1 の膜近傍に対する抗血清と反応させたものを直接 MALDI-TOF 型質量分析にかけると新規脳内ペプチドである APLβ が見つかった。
 C : 抗原部位が膜に接続する細胞外部分と決まっているので、質量分析で分子量が決まるとペプチド配列も自ずと決まる。

産生割合の増減が起こるペプチドが存在することは予想通りであったことに注目した。そしてγセクレターゼの基質と報告されている蛋白質に対する Aβ-like peptide の抗体を手当たり次第作製し、その中に生体中に存在するペプチドがないか

調べていくことにした。Nβを探している間に Aβ-like peptide に対する抗体の作製法にコツを見出して、実際にペプチドが存在すれば免疫沈降後に MALDI-TOF/MS 解析すれば、その存在と配列を決定できるのではないかと考えた。また膜

蛋白の膜貫通部分はアミノ酸配列上疎水性アミノ酸が20残基程度連続することからコンピューターで簡単に予測できる。だから A β -like peptide はその膜貫通部分の外側 10-20 アミノ酸残基部分のペプチドを抗原とすればよいので、抗原の選択にも迷いの余地はほとんどない。最初は、cDNA を他の研究室から分けてもらい、それを恒常的に発現させた培養細胞系を作製し、その培養上清を作製抗体で免疫沈降し質量分析で解析した。すると、ほぼ全ての抗体が期待通り、発現させた受容体由来の細胞外に分泌された A β -like peptide を認識した。10以上の基質について検討したが、残念ながらどの A β -like peptide もヒト脳脊髄液中には見つからなかった。その時になってはじめて、培養細胞から新規 A β -like peptide をどんどん発見同定しても、それが肝腎のヒト CSF 中に見つからなければ我々の目的のためには何の意味もないことに気付いた。

そこで、我々は培養細胞で産生される A β -like peptide を認識する過程を省略し、その当時わかっていたほぼ全ての γ セクレターゼの基質由来の A β -like peptide に対する抗体を作製し、ヒト髄液を直接免疫沈降後 MALDI-TOF/MS の解析で検討した。その結果、 β APP の類縁蛋白である APLP1 由来の A β -like peptide が髄液中に同定できた⁴⁾(図 1B)。本来 APLP1 および APLP2 は β APP と相補的な作用が報告されているから最初に検討すべき基質である。しかし、それを後回しにしたのは後から考えると大失策であった。事の本質と明確な目的をしっかりと見据えることなしに、我々は生理的作用が明確で重要な基質の解析を優先していたのである。

APL1 β (APLP1 由来の A β -like peptide) が見つかる後は一本道であった。免疫沈降後 MALDI-TOF/MS 法の良いところは、分子量とピークの高さが同時に得られるため、抗体の認識部位を考慮すれば質量分析後に認識したペプチドの配列と比較的量がほぼ決定できることである(図 1C)。標的とするペプチドの配列が明らかになれば、そのほとんどは分子量が 4,000 以下であ

るので、LC/MS/MS で正確な定量が可能であるし、ELISA 法による簡易定量法の開発にもりやすい。実際、我々が普段使用しているやや古い型式の LC/MS/MS とプロテオーム専門の研究室のもつ最新式の LC/MS/MS そして IBL 社と共同開発した APL1 β ELISA の3つの方法で、ヒト脳脊髄液中の APL1 β 各分子種に関してほぼ同じ定量結果を得ている(未発表データ)。

APL1 β の場合、検討の結果、長さの長い APL1 β 28 分子種が A β 42 のサロゲートマーカーとなることが明らかになった。具体的には、①A β 42 の産生比率を上昇させる家族性アルツハイマー病を引き起こす変異型プレセニリンを発現している細胞から分泌される APL1 β 各分子種の産生比率を測定した(図 2A)。さらに、②A β 42 の産生比率を上昇させるインバース γ セクレターゼ修飾薬添加時に分泌される APL1 β 各分子種の産生比率を測定した(図 2B)。その結果、A β 42 の産生の割合が増加する条件では、並行していつも APL1 β 28 の産生の割合が増加することが明らかになったのである。

誤解を招かないよう付け加えると、ここで「比較的比率」としているのは、一般的に「濃度」あるいは「量」と記すべき値を、臨床サンプルから測定した数値を症例間で比較するための標準化を行っていることを示している。具体的には A β の場合は A β 全体量中に占める割合で標準化することが適切であると広く考えられている。同様に APL1 β 28 の場合も CSF 中の全ての APL1 β 分子種の絶対量を測定し APL1 β 28 の占める割合で標準化している。

さらに、日本全国の6施設の御協力をいただき、PS1 に家族性アルツハイマー病の原因となる変異を持つ8患者(年齢や病気の進行度など背景は全く異なる)の脳脊髄液の供与を受け、その中に含まれる A β と APL1 β の量を測定した(図 3)。上記のようにこれらの患者の髄液中の A β 42 の割合は、その変異を培養細胞に発現させたときの効果とは異なり、低下する傾向があった(図 3A)。ところが、髄液中の APL1 β 28 の割合はその変異の

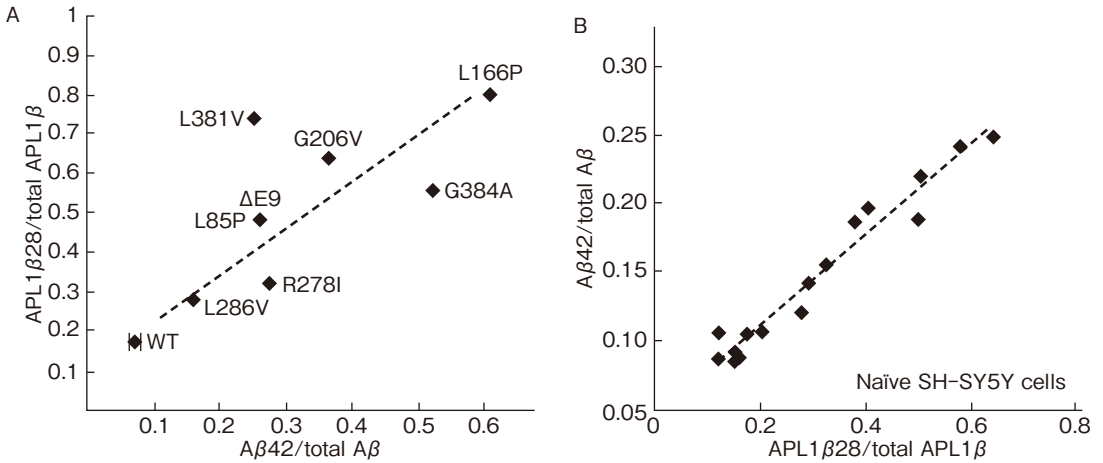


図 2

- A : 病期も年齢も性別も異なる FAD 患者髄液中の Aβ42 の比率および絶対量 (図示省略) は押し並べて著しく低下していた (図 3A 参照). しかし, その変異を発現させた細胞では, Aβ42 の産生割合が著しく上昇し, それと並行して APL1β28 の割合 (全ての APL1β 分子種の量に比較した) もまた著しく増加していた (培養細胞での結果).
- B : iGSM 薬剤の作用により Aβ42 の産生比率が微妙に上昇するとき, APL1β28 の産生比率も感度よく微妙に上昇する (培養細胞での結果).

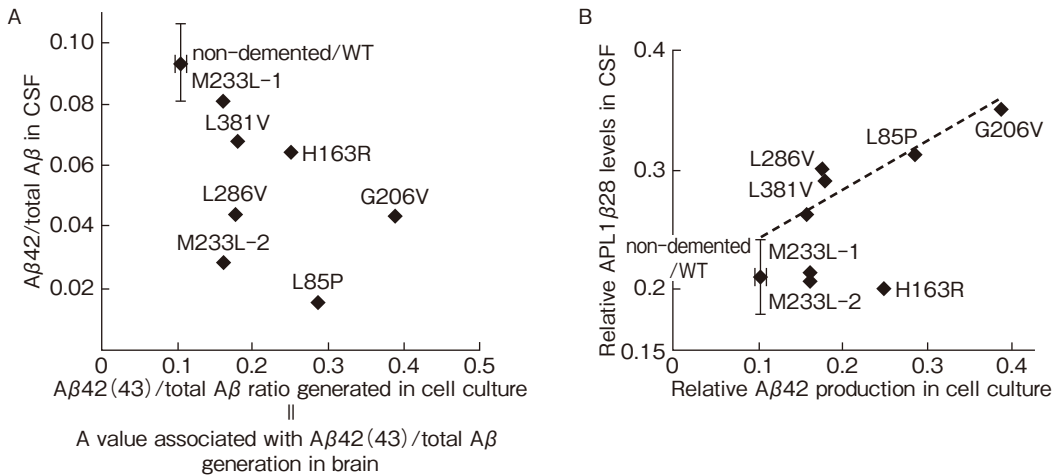


図 3

- A : 家族性アルツハイマー病で CSF 中の Aβ42 濃度の Aβ 全体濃度に対する比較的比率は低下する. これは病原性変異をもった培養細胞が産生する Aβ で Aβ42 比率が上昇するのと逆である (CSF での結果).
- B : 家族性アルツハイマー病で CSF 中の APL1β28 濃度の APL1β 全体濃度に対する比較的比率は, その変異をもった培養細胞から分泌される Aβ 中の Aβ42 比率と同じように上昇する (CSF での結果).

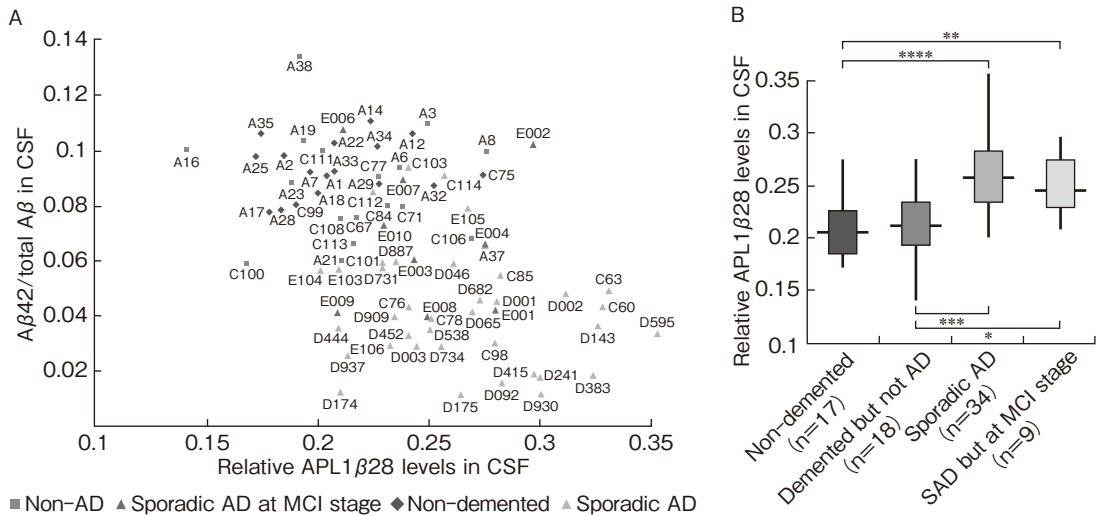


図 4

A：200 例以上の CSF サンプルについて検討したところ、孤発性 AD 患者 CSF 中の APL1β28 比率は健常高齢者に比較して上昇していた (CSF での結果)。
 B：MCI レベルで採取した CSF のうち AD にコンバートした症例では、MCI 時点ですでに APL1β28 比率の上昇が認められていた (CSF での結果)。

培養細胞での効果とほぼ並行して変化した (図 3B)。つまり、APL1β28 の産生比率はこれらの患者脳で上昇していることが示された。これらの実験結果から我々は「Aβ42 の産生比率はこれらの変異をもつ患者脳で培養細胞での結果と同じように増大しているが、髄液中にはその傾向が現れずむしろ Aβ42 の蓄積しやすい性質が関係して低下しているのではないか」と考えた。Aβ42 の産生比率が家族性アルツハイマー病脳で上昇している可能性がサロゲートマーカーを用いてはじめて示唆されたわけである⁴⁾。

アルツハイマー病では必ず Aβ42 が脳内に蓄積しているから、その蓄積の前に Aβ42 の産生の増大が一般的に起こっていると考えるのが自然である。そのことはおそらく全ての研究者が一度は考えたのではないかと思う。しかし、その可能性を実際に検討する適切な方法が今までなかったのである。そこで我々は APL1β28 の髄液中での割合について孤発性アルツハイマー病患者、MCI 時点のアルツハイマー病患者、その他の神経変性疾患

患者、神経変性疾患でない患者について検討した (図 4A)。すると重要なことに病原性変異のない孤発性アルツハイマー病患者脳でも MCI 症状を呈したときにはすでに APL1β28 比率が上昇していることが明らかになった (図 4B)。この結果は、Aβ42 産生比率が一般の孤発性アルツハイマー病患者でも発症前から増大していることを間接的ではあるが強く示唆している点で極めて重要である。この考え方では家族性アルツハイマー病の起こる仕組みと孤発性アルツハイマー病の起こる仕組みを统一的に理解できることが特徴である。同時に髄液中の APL1β28 比率はアルツハイマー病の病理過程を反映した発症前バイオマーカーの候補となる。

おわりに

—今後の展望—

我々は現在、血液中の APL1β の各分子種の測定と APL1β28 の比率が潜在的に進行するアルツハイマー病のバイオマーカーとなるかどうかを検

討している。具体的には医薬基盤研究所・朝長毅先生と協力して最新型の LC/MS/MS 型質量分析器を用いて、血液中の amol レベルの極微量の APL1 β の測定と APL1 β 28 比率の計算値から、いかに早期にアルツハイマー病の発症を予測できるか検討している。一日も早く認知症、特にアルツハイマー病が家族が病院に連れてきてはじめて疑われる病気ではなく、糖尿病のように実際に臓器に不可逆的な機能障害が出るずっと以前に健康診断などで診断し治療介入できるようにしたいと考えている。

本研究は大阪大学病院倫理委員会による正式な審査を経て承認を得たうえで実施した (承認番号 7139, 7176 及び 7212)。本研究は基盤(C), 先端脳 A03 班, 保健医療分野における基礎研究推進事業・医薬基盤研究所 (05-26), 脳科学研究推進プログラム・課題 F の資金を利用して実施した。

文 献

- 1) Okochi, M., Fukumori, A., Jiang, J., et al.: Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling. *J Biol Chem*, 281 ; 7890-7898, 2006
- 2) Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., et al.: Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J*, 21 ; 5408-5416, 2002
- 3) Takeda, M., Tanaka, T., Okochi, M.: Editorial : New drugs for Alzheimer's disease in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci*, 65 ; 399-404, 2011
- 4) Yanagida, K., Okochi, M., Tagami, S., et al.: The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol Med*, 1 ; 223-235, 2009