

## 輝け次代の担い手たち

# リキッドバイオプシーによる神経変性疾患バイオマーカー開発

池中 建介

大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

## はじめに

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症といった神経変性疾患は、緩徐進行性に特定の部位の神経脱落と、その部位の障害に由来する神経徴候を呈する疾患の総称である。長らく原因は不明であったが、一部の家族性神経変性疾患患者の分子遺伝学的な解析や免疫組織学的手法の発展により、神経変性疾患はそれぞれ特定の蛋白質の凝集・蓄積により起こされることが明らかになり<sup>1,2,3)</sup>、プロテオノパチーという概念が今では広く認知されている。その後、生前の臨床像と剖検の病理学的な比較検討が進み、臨床的診断基準が確立されてきた。しかしながら、未だに確定診断は死後の病理組織による確認を要し、生前の診断の確度は十分ではない。

実はこの点が癌を始めとする生検が可能な疾患と、中枢神経の変性疾患の大きな違いであり、侵襲性や合併症の問題から脳や脊髄の生検がほぼ不可能である。これは治療方法がない時代においては大きな問題ではなかったが、凝集蛋白質の除去や神経保護薬など様々な疾患修飾療法が開発されてきている現在では極めて重要な点である。超早期の治療が治療薬開発のカギとなっており、臨床症状が十分に進行して初めて確定できる臨床診断では治療開始が遅すぎる可能性がある。

より早期の診断のために、場合によっては発症前の診断を可能にするための技術として脳内の病理病態を反映するバイオマーカーの開発、中でも生体試料から凝集蛋白質の検出技術「リキッドバイオプシー」の開発が近年大きな高まりを見せている。その中で見えてきた新しい病態解明の可能

性、今後の治療の可能性などについて、我々の最新の研究結果を交えて、特にパーキンソン病に焦点を当てて概説する。

## パーキンソン病とは

パーキンソン病 (PD) は緩徐進行性の神経変性疾患で、安静時振戦・筋強剛・無動・姿勢反射障害などの運動徴候を主徴とする。近年では、運動障害に追加して、認知機能障害・嗅覚障害・自律神経障害といった、非運動障害の重要性が広く認知されるようになってきた。PDの病理学的特徴は、中脳黒質のドパミン産生ニューロンなど様々な神経細胞において観察されるレビー小体と呼ばれる蛋白質凝集物の封入体の形成であり、その主要構成成分が $\alpha$ シヌクレイン ( $\alpha$ Syn) であることが知られている<sup>4,5)</sup>。図1に一般的なPDの病理的・臨床的経過をまとめた。 $\alpha$ Synの蓄積から始まり、徐々に神経細胞の脱落が起こり、まず非運動症状が出現したのちに運動障害が出現する(図1) PDの主な臨床診断は、運動障害に着目したものが主体となっており、運動症状がある程度進んで初めて臨床的に診断される。一方で、神経細胞に着目すると、運動機能障害の出現時にはすでに30~80%の中脳黒質細胞の脱落が認められるという報告もある<sup>6)</sup>。 $\alpha$ Syn凝集阻害薬などの疾患修飾療法の開発には、運動症状発症前に病態を捉えて治療を開始する事が望ましいことがわかる。そのためには現状の診断基準による運動症状出現前の前駆症状期 (prodromal PD) または発症前期 (preclinical PD) を捉える必要がある。それを可能にするために各種バイオマーカーの開発が必須で

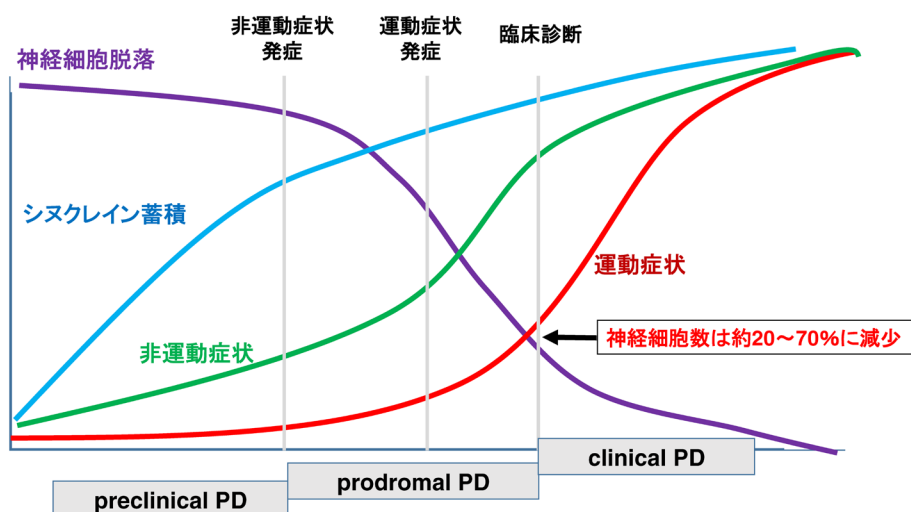


図1 発症前から見たパーキンソン病 (PD) の経過。PD は運動症状が発症する約10年前から非運動症状が出現するといわれている (緑線)。さらに前から神経細胞の脱落 (紫線) やシヌクレインの蓄積が始まっていると推測されている (青線)。発症時には中脳黒質の神経細胞数は約20~70% の量にまで減少しているという報告がある

あり、また運動症状発症前にいかにして患者を見つけれられるかがカギになる。

#### PD の発症を予測する臨床的マーカー

どのようにして prodromal PD の患者を捉えるかが課題となると前述したが、健康診断ベースでのスクリーニングは安価で簡便で高い感度を持つ検査が要求され、現状ではそれを満たすバイオマーカーは存在しない。しかし、これまでのパーキンソン病の横断的な研究から、運動症状が出現する時期 (中脳黒質—線条体系の障害を受ける時期) より以前に、PD 患者はいくつの特徴的な臨床像を高頻度に呈することがわかってきた<sup>7)</sup>。特に特徴的な症状としては、レム睡眠行動異常症、嗅覚障害、便秘、泌尿器障害 (排尿障害、インポテンツ) などがあげられる。運動症状がない患者で、これらの前駆症状診断基準を用いると、80% の確度で将来のPDを診断できる。下記に、代表的なレム睡眠行動異常症と、嗅覚障害についてさらに概説する。

#### 〈レム睡眠行動異常症 (RBD)〉

通常レム睡眠時には全身の骨格筋の緊張が低下しているが、何らかの原因で筋緊張の抑制が障害されるために、夢で見たことをそのまま行動に移してしまう疾患である。RBD はパーキンソン病やその他の $\alpha$ Syn が蓄積する疾患において高頻度に認められる。PD では33~60% 程度の患者にRBDが認められると報告されている<sup>8)</sup>。またRBDはprodromal PDにおいても高頻度に認められることが知られており、PDの早期診断マーカーとして期待されている。RBDの診断後の縦断的追跡調査では、10年間で80% 程度の患者がパーキンソン病等を発症すると報告されている<sup>9)</sup>。現在、国立精神・神経医療研究センターや我々阪大神経内科など国内5施設において、RBD患者を追跡調査することで、パーキンソン病の発症前マーカーの探索を行うプロジェクト、J-PPMI (Japan-Parkinson's Progressive Markers Initiative) を展開している。

#### 〈嗅覚障害〉

PDでは病早期、または発症前から嗅覚低下がみられることが多い。嗅覚障害が早期から起こることは、Braakらの横断的な病理学的解析によ

り、PDの中枢初期病変は嗅球あるいは迷走神経背側核からはじまるという報告にも裏付けされている<sup>10)</sup>。MSAやPSPなどでは障害されにくい、鑑別診断に有用である。

また、近年PDにおける重度嗅覚低下が後の認知症発症の予測になりうる事が報告された<sup>11)</sup>。つまり、PDがさらに進行して、認知症を合併するかどうかを予測できる臨床マーカーといえる。これをうけて2013年からDonepezil Application for Severe Hyposmic Parkinson Disease (DASH-PD)研究が始まっている。この研究は認知機能障害がなく重度嗅覚障害を有するPD患者を、ドネペジル投与群とプラセボ投与群の2群に分けて将来の認知症発症予防が可能かどうかを調べている。

## 生化学的バイオマーカー

前述の臨床的マーカーの活用により、将来的にPDを発症する人を絞り込むことができ、期待値を上げたうえで生化学的に $\alpha$ Synの検出、モニタリングをしていくことが可能となる。これまで $\alpha$ Syn量を推測する確立された生化学的バイオマーカーは存在しないが、現在 $\alpha$ Syn蓄積を検出するバイオマーカー開発は世界的に活発に行われている。代表的な方法は、ELISA法と、アミロイド蛋白質増幅法の二種類がある。

京都府立医科大学の徳田らは、 $\alpha$ SynのELISA開発を進めてきており、 $\alpha$ Synオリゴマーを特異的に検出するsingle-antibody sandwich ELISA法を用

いてPD患者では髄液中の正常な $\alpha$ Synは低下し、 $\alpha$ Syn凝集体が増加する事を見出した<sup>12)</sup>。さらに最近では、より高感度に髄液中の $\alpha$ Synを検出するRT-QuIC法が開発されており、中枢神経系における $\alpha$ Synを定量評価する方法が開発され注目されている<sup>13)</sup>。我々の研究室においても、RT-QuICをベースに超音波を用いた新しい髄液中シヌクレイン凝集体検出装置、HANABI (HAndai Amyloid Burst Inducer)を開発している。次項以降にアミロイド蛋白質増幅、検出の手法と、PD患者における結果を概説していきたい。

## アミロイド蛋白質増幅法

プリオン蛋白質や $\alpha$ Synなどアミロイド原生蛋白質は、異常なクロス $\beta$ シート構造を特徴とするフィブリルを形成する。その大きな特徴として、正常型構造を有する蛋白質分子を自身と同じ異常型クロス $\beta$ シート構造に変換する蛋白質間の構造伝播がある(図2)。この蛋白質間構造伝播は、異常蛋白質が細胞から細胞に移動することで、細胞間伝播につながり、神経変性疾患の進行を規定している。

アミロイド蛋白質増幅法は、この構造伝播の性質を利用した微量アミロイド蛋白質の検出法で、これまでPMCA法、RT-QuIC法、そして我々のHANABI法が開発されてきた<sup>14)</sup>。どの方法においても、正常なシヌクレイン(大腸菌由来のリコンビナント蛋白質)に異常蛋白質を含む試料(患者

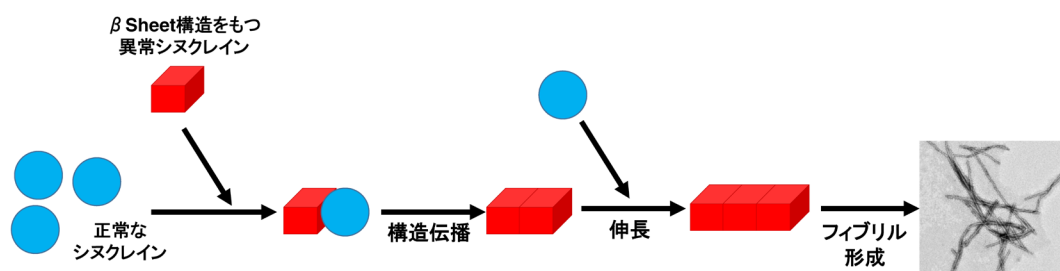


図2 蛋白質間の構造伝播。正常なシヌクレインは特定の構造を持たない。そこに $\beta$ シート構造を持つ異常なシヌクレインを混ぜると、正常シヌクレインの構造を変換し $\beta$ シート構造を持たせる。さらに正常なシヌクレインを巻き込み、線維状のフィブリルを形成する

脊髄液などを添加し、刺激を加えて反応促進することで異常蛋白質を検出できるレベルまで増幅する(図3)。PMCA 法と HANABI 法は超音波を用いて刺激し、RT-QuIC 法は攪拌を用いる。検出は PMCA 法はプロテアーゼ K 耐性で評価し、RT-QuIC 法と HANABI 法はアミロイド線維に結合し蛍光を発するチオフラビン T (ThT) を用いる(図4)。

## HANABI を用いた $\alpha$ Syn 凝集体の検出

特に RT-QuIC 法と HANABI 法においては、ThT の蛍光変化を追跡することができ、正常シヌクレインの構造が変換されていく速度を定量評価できる。元の試料に含まれる異常シヌクレインが多ければ凝集過程は早くなることから、試料中の凝集

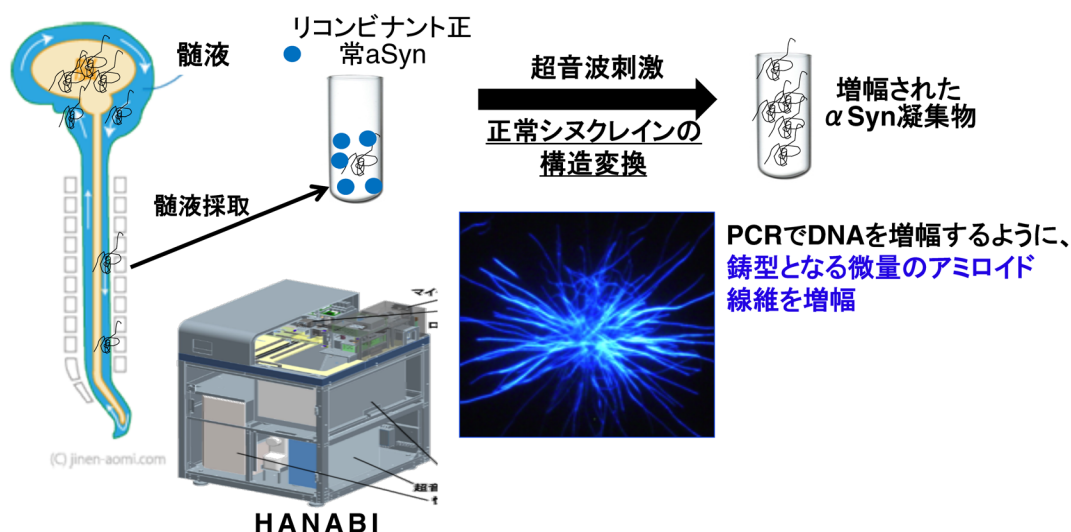


図3 髄液からのアミロイド増幅法。PD患者に蓄積するシヌクレインは、脳神経細胞内から髄液にごく少量漏れ出ることが推測されている。少量の髄液にリコンビナント正常シヌクレインを混合し、HANABIによって超音波刺激をすると、正常シヌクレインの構造変換が起こり髄液中のシヌクレイン凝集物が増幅される

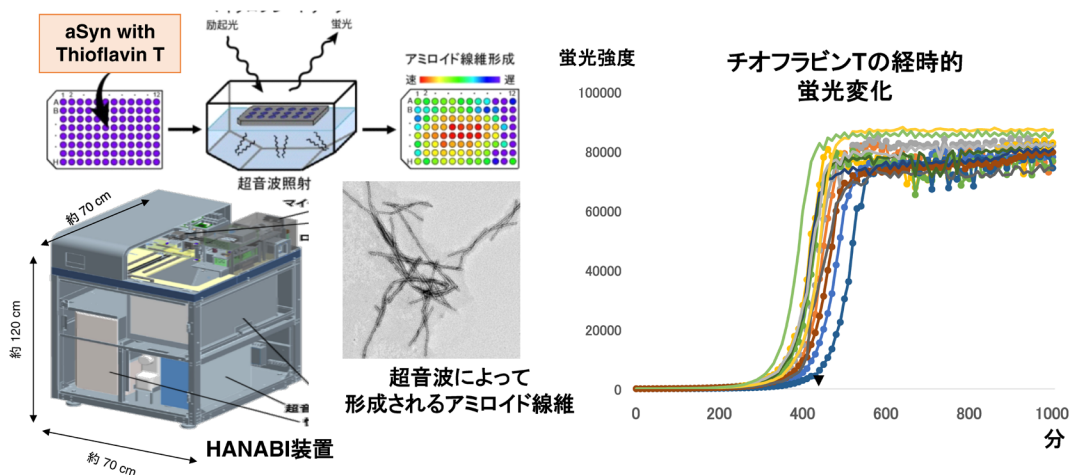


図4 HANABIによる凝集過程のモニタリング。図3の反応にチオフラビン T (ThT) を加えておくことで、正常シヌクレインの構造変換の過程を ThT 蛍光強度によりモニタリングできる。HANABI を用いると約10 時間で反応が完了した

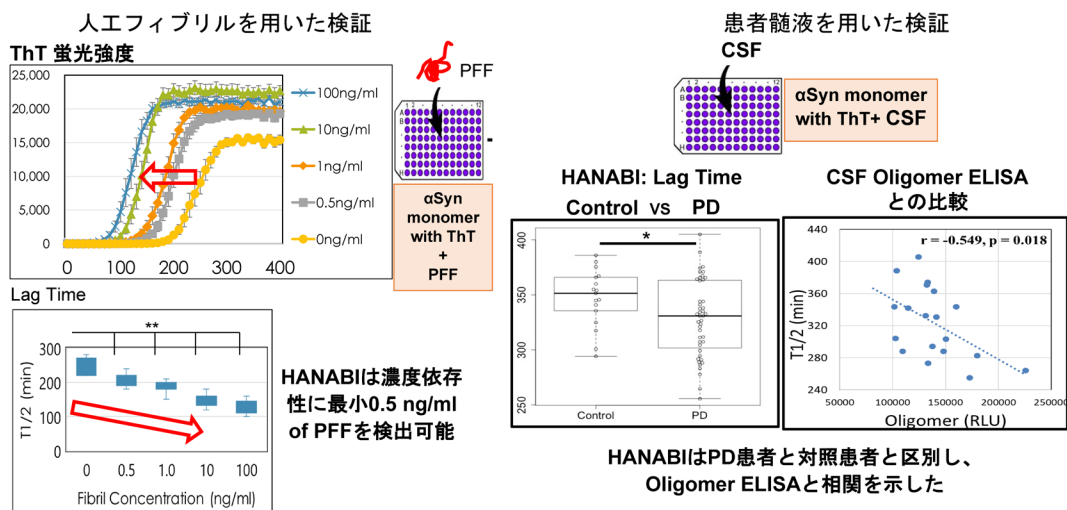


図5 HANABIを用いた凝集体検出と患者検体での検証。人工的に作成したシヌクレインフィブリルを濃度を変えて混注し、HANABIでの経時的なThT蛍光強度変化を観察した。また、同様に患者髄液を混注しThT蛍光強度の変化をみた。また、その変化の速さ(Lag Time)をELISA法で測定したシヌクレインオリゴマー濃度と比較した

量の評価をすることができる。例えば、人工的に作成した $\alpha$ Synフィブリルを添加することで、濃度依存性に凝集を加速することができ、凝集曲線のT(1/2)時間を測り定量評価できる(図5)。この系を用いて、我々は、培養細胞において細胞内に $\alpha$ Synの凝集体ができる系を用いて、細胞内から細胞外に放出される $\alpha$ Syn凝集体の評価に成功した。

#### 患者における $\alpha$ Syn凝集体の評価

まず我々は、PD患者と対照患者を比較して、PD患者髄液は有意に反応を促進することを示した(図5)。さらにPD患者においては、京都府立医大徳田らによるオリゴマーELISAによる $\alpha$ Syn凝集体定量法との比較検討をしたところ、優位な相関を示した(図5)。さらに、様々な臨床スコアや画像検査との相関を調べたところ、心臓交感神経の脱落を評価するMIBG心筋シンチグラフィーの結果と相関を示した。これまでの病理学的な解析結果から、PD患者における心臓交感神経の脱落は、心臓交感神経節における $\alpha$ Synの凝集蓄積が原因であることが知られており、同時に脳内の $\alpha$ Syn病理と非常に関連が深いことが知られて

いる<sup>15)</sup>。つまり、HANABIによる髄液 $\alpha$ Synの凝集体の量的な評価は、脳内の $\alpha$ Syn変化を見ている可能性があることを間接的に証明したことになる、意義が深い。

#### HANABIを用いたリキッドバイオプシーの可能性

最初に述べたように、神経変性疾患患者において脳から生検をすることは不可能である。しかし、脳内で蓄積している蛋白質を髄液中から検出できる可能性が示されてきている。それを用いることで病態の解明につながる可能性がある。

例えば、 $\alpha$ Synが蓄積する疾患はPD以外にもグリア細胞に主に蓄積し、小脳失調や自律神経失調など多様な症状を呈して急速に進行する多系統萎縮症(MSA)という疾患がある。その違いを規定するものはなにか、長年の大きな疑問であるが、その違いが凝集体の構造の違い(構造多型)に起因する可能性が示唆されている。つまり $\alpha$ Synの凝集の過程において異なる構造の凝集体ができ、その構造によって毒性、細胞選択性、ひいては症状を変えるという仮説である<sup>16, 17, 18)</sup>。この仮説を検証する際にHANABIを始めとしたアミロイド蛋

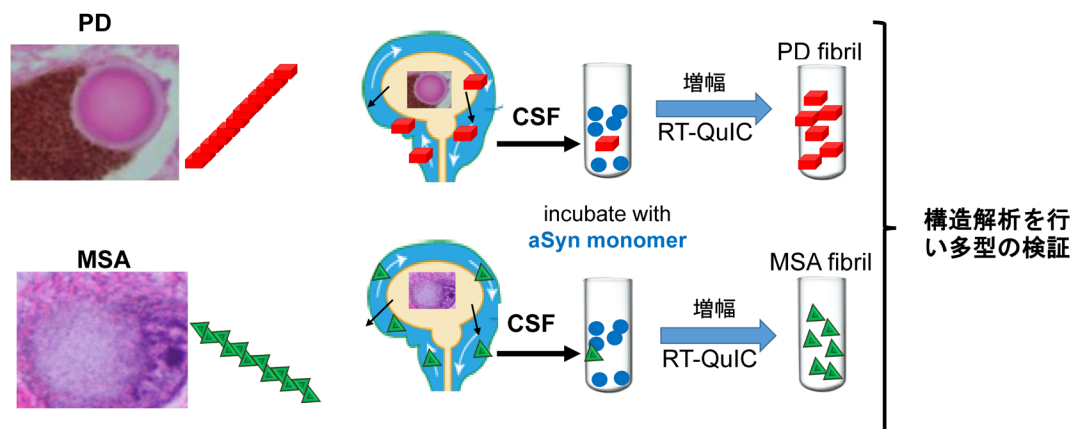


図6 パーキンソン病 (PD) と多系統萎縮症 (MSA) の  $\alpha$  シヌクレイン凝集体は異なる構造か。PD と MSA の病態の違いを蓄積する  $\alpha$  シヌクレインの構造多型で説明できるかを検証する作業仮説。HANABI を用いて脳内の  $\alpha$  シヌクレインを髄液から構造を保ったまま増幅する。そのフィブリルの構造解析を行い PD と MSA の違いを検証可能である

白質増幅法が有用である。つまり、PD 患者、MSA 患者の髄液を HANABI などを用いて構造を保持したまま特異的に増幅し、その高次構造を解析することで脳内に蓄積している  $\alpha$  Syn 凝集物の性質の違いを再現する試みである (図6)。

## 最後に

今後の神経変性疾患のバイオマーカーの大きな潮流は、このように凝集している蛋白質の量的な評価と、質的な評価を実現することで、これまで死後脳でしか評価ができなかった凝集蛋白質の評価を生前に可能にすることである。くしくもそれは、癌領域において注目を集めるリキッドバイオプシーとしての意義と極めて似ていて、これまでバイオプシーができないことで研究の進展に壁のあった神経変性疾患においても大きなブレイクスルーとなる。今後このバイオマーカーが様々な角度から臨床的意義、病理との比較検討が進められていき、さらに新薬開発の治験デザインに組み込まれていくことで、世界的に難航している神経変性疾患の根本的な治療法開発の大きな推進力になると信じて開発を進めている。

## 謝 辞

HANABI の開発におきまして、多くのご支援とご指導を頂きました大阪大学蛋白質研究所後藤祐児教授、およびその研究室の皆様にご感謝いたします。さらにこのような執筆の機会をいただきました澤本和延教授および神経化学会の編集部の皆様にご感謝申し上げます。また、本稿は極めて臨時的な内容で、皆様に興味を持って読んでいただけるか心配しながら執筆いたしました。最後までお読みくださいました皆様に深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62

- (1993).
- 2) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534), 754–760 (1995).
  - 3) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047 (1997).
  - 4) Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–840 (1997).
  - 5) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*, 4(2), 160–164 (2002).
  - 6) Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114(Pt 5), 2283–2301 (1991).
  - 7) Berg D, Postuma RB, Adler CH, Bloem BR, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday G, Joseph L, Lang AE, Liepelt-Scarfone I, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M, Deuschl G. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30(12), 1600–1611 (2015).
  - 8) Boeve BF, Silber MH, Saper CB, Ferman TJ, Dickson DW, Parisi JE, Benarroch EE, Ahlskog JE, Smith GE, Caselli RC, Tippman-Peikert M, Olson EJ, Lin SC, Young T, Wszolek Z, Schenck CH, Mahowald MW, Castillo PR, Del Tredici K, Braak H. Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain*, 130(Pt 11), 2770–2788 (2007).
  - 9) Iranzo A, Tolosa E, Gelpi E, Molinuevo JL, Valldeoriola F, Serradell M, Sanchez-Valle R, Vilaseca I, Lomeña F, Vilas D, Lladó A, Gaig C, Santamaria J. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: An observational cohort study. *Lancet Neurol*, 12(5), 443–453 (2013).
  - 10) Braak E, Sandmann-Keil D, Rüb U, Gai WP, de Vos RA, Steur EN, Arai K, Braak H. alpha-synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. *Acta Neuropathol*, 101(3), 195–201 (2001).
  - 11) Baba T, Kikuchi A, Hirayama K, Nishio Y, Hosokai Y, Kanno S, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M, Suzuki K, Takahashi S, Fukuda H, Aoki M, Itoyama Y, Mori E, Takeda A. Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: A 3 year longitudinal study. *Brain*, 135(Pt 1), 161–169 (2012).
  - 12) Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology*, 75(20), 1766–1772 (2010).
  - 13) Shah Nawaz M, Tokuda T, Waragai M, Mendez N, Ishii R, Trenkwalder C, Mollenhauer B, Soto C. Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of alpha-Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol*, 74(2), 163–172 (2017).
  - 14) Parnetti L, Gaetani L, Eusebi P, Paciotti S, Hansson O, El-Agnaf O, Mollenhauer B, Blennow K, Calabresi P. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, (2019).
  - 15) Orimo S, Amino T, Itoh Y, Takahashi A, Kojo T, Uchiyama T, Tsuchiya K, Mori F, Wakabayashi K, Takahashi H. Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. *Acta Neuropathol*, 109(6), 583–588 (2005).
  - 16) Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, Madiona K, Olieric V, Böckmann A,

- Meier BH, Melki R. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun*, 4(1), 2575 (2013).
- 17) Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Van den Haute C, Melki R, Baekelandt V. alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*, 522(7556), 340–344 (2015).
- 18) Peelaerts W, Bousset L, Baekelandt V, Melki R.  $\alpha$ -Synuclein strains and seeding in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy: Similarities and differences. *Cell Tissue Res*, 373(1), 195–212 (2018).