

アルツハイマー病患者iPS細胞を駆使した 診断法開発と多施設前向き調査

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科
准教授 城谷 圭朗

(共同研究者)

熊本大学	教授 大槻 純男
福島県立医科大学	教授 橋本 康弘
東北大学	教授 荒井 啓行
東北大学	准教授 古川 勝敏
鳥取大学	教授 浦上 克哉
鳥取大学	准教授 谷口 美也子
長崎大学	大学院生 松尾 和哉

はじめに

アルツハイマー病 (AD; Alzheimer's disease) の患者数は国内で300万人超と言われており、医療費削減やQOL向上の観点から根本治療薬の開発は急務である。私たちの研究グループはアルツハイマー病患者のiPS細胞を神経細胞に分化させた研究により、従来考えられていた細胞外にアミロイド β ($A\beta$) タンパクが蓄積する患者 (細胞外型AD) に加えて、神経細胞内に $A\beta$ オリゴマーが蓄積するサブタイプ (細胞内型AD) の存在を明らかにした (Kondoら 2013, Cell Stem Cell)。そして後者にはドコサヘキサエン酸 (DHA) が病態緩和に有効であることを示した。これよりADの根本治療薬の開発には、患者が細胞内型か細胞外型のどちらのタイプであるかを診断したうえで薬剤を選択する個別化医療の必要性が示唆された。しかしながらアルツハイマー病患者がどちらのサブタイプであるかを診断する方法は現在のところない。そこで本研究では申請者が行ってきたiPS細胞研究とバイオマーカー研究を融合させ、アルツハイマー病患者が細胞内型と細胞外型のどちらのサブタイプであるかを区別するバイオマーカーを同定し、それらが実際にADサブタイプの臨床診断に有効であることを臨床検体で評価することを目的とした。

本研究の方法 (図1) を以下に概説する。iPS細胞から分化させた神経細胞のDNAマイクロアレイ解析の結果から、細胞内型ADでは対照者に比べて糖鎖修飾に関わるいくつかの遺伝子が有意に変化していることがわかった (Kondoら 2013, Cell Stem Cell)。よって細胞内型ADのiPS細胞由来神経細胞の培養上清には健常者とは糖鎖構造が異なる分泌タンパク質があると推定された。一方、iPS細胞由来神経細胞の培養上清には、脳脊髄液中の分泌タン

パク質が存在することが報告されている (Israel ら 2012、Shi ら 2012)。以上のことより、本研究ではDNA マイクロアレイ解析をもとに変化の予想される糖鎖を認識するレクチンを用いて、対照者と細胞内型および細胞外型AD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、比較することにより、細胞内型および細胞外型ADサブタイプ特異的な脳脊髄液バイオマーカーを同定する。その後同定したバイオマーカー候補が実際のアルツハイマー病患者の脳脊髄液で変化しているかを調べ、サブグループ特異的なADバイオマーカーを同定する。さらに同定したバイオマーカーが早期診断マーカーになるかどうかを、脳脊髄液を採取したADの前段階である軽度認知障害者や健常者の脳脊髄液を用いた多施設前向き調査 (東北大学、福島県立医科大学、鳥取大学) により明らかにする。

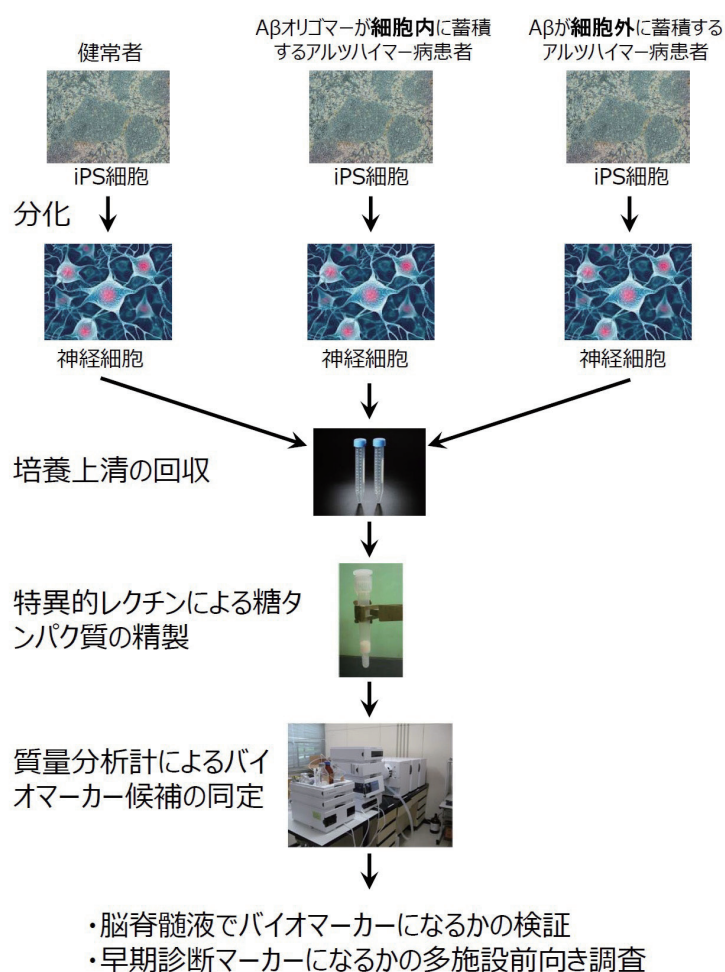


図1 実験全体の手順

結 果

【レクチンによる糖タンパク質の精製 I】

まず対照者3クローン、細胞内型AD患者4クローン、細胞外型AD患者3クローンのiPS細胞を神経細胞に分化させ、培養上清を回収した。次に培養上清から3種類のレクチンアガロースにより糖タンパク質の精製を行った。ところがレクチンアガロースで精製したサンプルを電気泳動後銀染色すると、いずれも66 kDaのBSAが主成分として検出された。これは神経細胞の培地中に含まれる大量のBSAがレクチンアガロースに非特異的に吸着されたことによるものと考えられた。この大量のBSAを含むサンプルを質量分析計で分析した場合には、ほとんどがBSAのピークとして検出され真のバイオマーカータンパク質が検出されないことが考えられた。

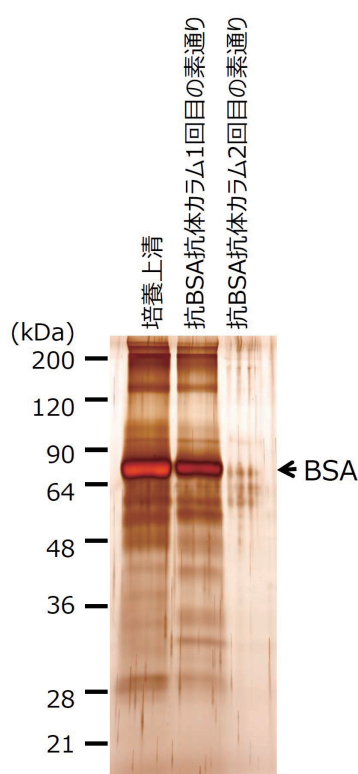


図2 iPS細胞由来神経の培養上清からのBSA除去

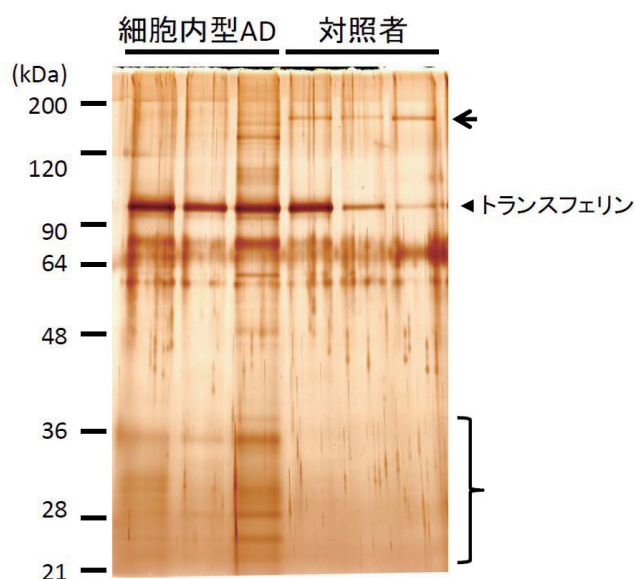


図3 細胞内型の家族性アルツハイマー病患者もしくは対照者のiPS細胞から分化させた神経細胞の培養上清からBSAを除去したサンプル(180 ng)をアクリルアミド電気泳動後銀染色した。200 kDa付近の矢印のバンドと38 kDa以下のラダーバンドは細胞内型ADと対照者間で量が異なるバンドである。矢頭のバンドは分子量からは培地に含まれるトランスフェリンである。

【培養上清のBSA除去とバイオマーカー候補の同定】

この時点で方法を修正し、まず回収した培養上清からBSAを除去することを行った。方法は抗BSA抗体 (Bethyl社A10-113) をDynabeads Protein G (Life technologies社10004D) に結合させたのち両者をクロスリンクしたものと培養上清を混合し4度で4時間のインキュベーションを2回行い、抗BSA抗体に吸着されないタンパク質を含む素通り画分を回収し、Vivaspin 500 (GE Healthcare社28-9322-18) で濃縮した。その一部を電気泳動後銀染色すると、BSAがほとんどなくなっていることが分かった (図2 レーン3)。次にこの方法を用いてフェノタイプ (酸化ストレス、ERストレス、細胞の脆弱性など (Kondo ら2013、Cell Stem Cell)) が強く表れる細胞内型の家族性アルツハイマー病患者と対照者のiPS細胞それぞれ3クローンの神経細胞の培養上清からBSA除去操作を行った。その結果表1のよう6つのサンプルが最終的に得られた。いずれも質量分析を行うには量的に十分であった。

各サンプルの180 ng分をSDS電気泳動後銀染色しタンパク質バンドのパターンを比較した (図3)。その結果両群間で量的に差のあるタンパク質がいくつか検出された。例えば36 kDa以下のバンドは対照者3クローンに比べて細胞内型アルツハイマー病患者3クローンで増加しており、また200 kDa付近のバンドは細胞内型アルツハイマー病患者3クローンで減少していた。そこでBSAを除去したサンプルをトリプシン消化後液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC-MS/MS) で定量的・網羅的解析を行った。t-testによる統計解析の結果59

	容量 (μL)	濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	タンパク量 (μg)
細胞内型家族性 ADクローン1	13.5	0.898	12.1
細胞内型家族性 ADクローン2	12.7	1.42	18.0
細胞内型家族性 ADクローン3	12.5	2.43	30.3
対照者クローン1	14.0	1.43	20.2
対照者クローン2	14.5	0.778	11.3
対照者クローン3	15.3	0.846	12.9

表1 各iPS細胞から分化させた神経細胞の培養上清を回収し、抗BSA抗体でBSA除去したサンプル

	容量 (μL)	濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	タンパク量 (μg)
細胞内型孤発性 ADクローン1	15.9	1.00	15.9
細胞外型家族性 ADクローン1	11.1	0.555	6.16
細胞外型家族性 ADクローン2	12.5	0.449	5.61
細胞外型孤発性 ADクローン1	15.2	0.927	14.1

表2 各iPS細胞から分化させた神経細胞の培養上清を回収し、抗BSA抗体でBSA除去したサンプル

個のタンパク質が2群間で有意差 ($p < 0.05$) のあるものとして同定された。同定されたタンパク質はカテプシンなどのプロテアーゼが7個、プロテアーゼ阻害分子、糖転移酵素が各5個、異性化酵素、細胞接着分子、酸化還元酵素が各3個、その他となった。以上により培養上清中のBSAを除去するという1ステップの精製でバイオマーカー候補を同定することができた。

次に上記と同じ方法で、細胞内型孤発性アルツハイマー病患者1クローン、細胞外型家族性アルツハイマー病患者2クローン、細胞外型孤発性アルツハイマー病患者1クロンの神経細胞の培養上清からBSAを除去した結果、表2のサンプルが得られた。このサンプルを上記と同様の方法で定量的・網羅的解析を行った。そして表1と表2の計10個のサンプルのデータを総合して統計解析を行った。

まず細胞内型家族性アルツハイマー病患者と対照者間で有意に量に変化していた59個のタンパク質のうち、細胞内型孤発性アルツハイマー病患者でも同様に変化している分子が2つ（タンパク質Aは減少、タンパク質Bは増加）あった。一方、細胞外型家族性アルツハイマー病と対照者間で有意差 ($p < 0.05$) のあるものが11個あったが、そのうち細胞外型孤発性アルツハイマー病患者でも同様に変化している分子が3つ（タンパク質Cは減少、タンパク質DとEは増加）あった。

【レクチンによる糖タンパク質の精製Ⅱ】

レクチンによる糖タンパク質の精製法の改良を行った。【レクチンによる糖タンパク質の精製Ⅰ】において、BSAが非特異的に3種類のレクチンアガロースに結合したが、これはBSAがレクチンに結合したわけではなく、アガロースに直接結合した可能性を考え、アガロースの代わりに非特異的吸着が少ないマグネットビーズを使用する系を試した。方法は、ビオチン化したレクチンをStreptavidin Magnetic Beads (PIERCE社88816) に結合させたのち両者をクロスリンクし糖タンパク質の精製を行った。最初は予試験のためレクチンの一つであるMAHをマグネットビーズにクロスリンクさせたものを用いた。培養上清をMAHマグネッ

トビーズとインキュベーション後洗浄し、酸性バッファーで溶出したものを電気泳動後銀染色した(図4)。その結果溶出画分にBSAの混入はほとんどみられず、36 kDa付近にいくつかのMAH反応性の特異的なバンド(矢印)が検出された。よってマグネットビーズにはBSAの非特異的に吸着が非常に少ないため培養上清からの糖タンパク質の精製に有効であることがわかった。

考 察

【培養上清のBSA除去とバイオマーカー候補の同定】の項では、最終的に細胞内型アルツハイマー病患者の脳脊髄液バイオマーカー候補を2個、細胞外型アルツハイマー病患者の脳脊髄液バイオマーカー候補を3個同定した。この5つの分子について分子量とこれまでの報告を表3にまとめた。細胞内型アルツハイマー病のバイオマーカー候補としてタンパク質Aが減少、タンパク質Bが増加する分子として抽出されたが、これまでの報告でも同方向の変化がある分子として報告されていた。ただしこれまでの報告はアルツハイマー病患者をひとくくりにして対照者と比較しているのに対して、本研究は細胞内型アルツハイマー病と対照者を比較している点で異なっている。よって今後細胞内型アルツハイマー病患者と対照者の脳脊髄液でタンパク質AやBを比較すると、これまでに報告されているデータより感度や特異度が優れている可能性が考えられた。一方、細胞外型アルツハイマー病のバイオマーカーとしてタンパク質Cが減少、タンパク質DとEが増加する分子として抽出されたが、タンパク質CとDについてはこれまでに報告がないので新規のバイオマーカーになる可能性がある。またタンパク質Eはこれまでの報告ではアルツハイマー病患者で減少したが、本研究では増加していた点で異なっていた。

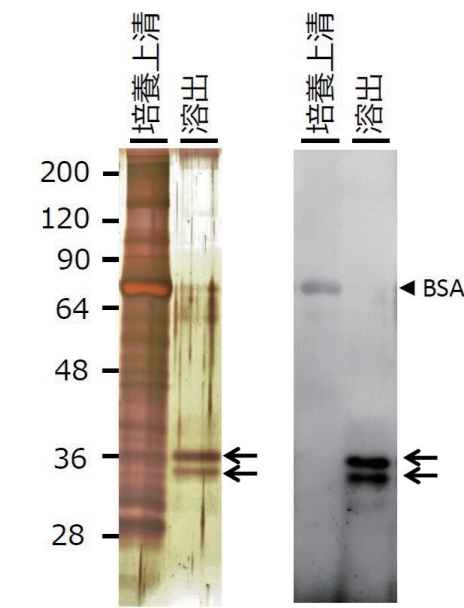


図4 iPS細胞由来神経細胞の培養上清をMAHマグネットビーズにアプライし溶出した画分を銀染色した(左図)。右図は同サンプルをPVDF膜にブロット後MAHレクチンで染色した。

	タンパク質	分子量 (kDa)	本研究での変化	これまでの報告での変化
細胞内型バイオマーカー候補	A	40	細胞内型ADで減少	ADで減少
	B	200	細胞内型ADで増加	ADで増加
細胞外型バイオマーカー候補	C	50	細胞外型ADで減少	報告なし
	D	20	細胞外型ADで増加	報告なし
	E	80	細胞外型ADで増加	ADで減少

表3 本研究で同定したバイオマーカー候補の分子量と増減およびこれまでの報告によるAD患者脳脊髄液での増減

この理由を考察すると、これまでの報告ではアルツハイマー病患者をひとくくりにして対照者と比較しているが、本研究は細胞外型アルツハイマー病と対照者を比較していることが考えられる。よってタンパク質Eは細胞外型アルツハイマー病の新規バイオマーカーになる可能性がある。今後はこれら5つのタンパク質が患者の脳脊髄液で変化しているかを検証する。

【レクチンによる糖タンパク質の精製Ⅰ】の項では、iPS細胞から神経細胞に分化させた細胞の培養上清からレクチンアガロースを用いて糖タンパク質を精製した。ところが培地成分のBSAが非特異的にレクチンアガロースに結合した。3種類のレクチンアガロースいずれを用いた場合でもBSAの結合がみられたので、おそらくアガロースにBSAが非特異的に結合していると考えられた。そこで【レクチンによる糖タンパク質の精製Ⅱ】の項では、MAHレクチンをマグネットビーズに結合させたものを用いて培養上清から糖タンパク質の精製を行った。するとBSAはMAHレクチンマグネットビーズにはほとんど結合せず、MAH反応性の糖タンパク質が精製された。以上の検討より今後はその他のレクチンについてもマグネットビーズに結合させ、糖タンパク質の精製を行い、質量分析計による網羅的・定量的解析によりバイオマーカー候補タンパク質を同定する。

要 約

細胞内型アルツハイマー病患者、細胞外型アルツハイマー患者、および対照者のiPS細胞を神経細胞に分化させ、その培養上清から脳脊髄液バイオマーカー候補の同定を行った。培養上清に大量に含まれるBSAを抗BSA抗体で除去し、トリプシン消化後のペプチド断片を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法で定量的・網羅的解析を行った。その結果、細胞内型アルツハイマー病患者のバイオマーカー候補として2個、細胞外型アルツハイマー病患者のバイオマーカー候補として3個のタンパク質が抽出された。これらがアルツハイマー病のサブタイプ特異的なバイオマーカーになることが示唆された。

文 献

1. 森田 知樹, 渡辺 かおり, 浅井 将, 岩田 修永, 城谷 圭朗, オートファジーと認知症、印刷中、2015
2. 浅井 将, 城谷 圭朗, 近藤 孝之, 井上 治久, 岩田 修永: アルツハイマー病における個別化医療の可能性—孤発性及び家族性アルツハイマー病患者由来のiPS細胞を用いたアルツハイマー病の病態解析. 日薬雑誌 (Folia Pharmacol. Jpn) 2014 vol.143, 23-26