

フロチリン定量による新たなアルツハイマー病血液診断法の開発とその分子メカニズムの解明

名古屋市立大学大学院 医学研究科
研究員 中村 知寿

(共同研究者)

名古屋市立大学大学院 医学研究科 教授 道川 誠

はじめに

日本は世界最高水準の高齢化率となっている。高齢者人口の増加に伴い、活躍を続ける高齢者が増える一方で、認知症患者も増加している。認知症患者数は、2025年に65歳以上の5人に1人、約700万人に達すると予測されている。認知症の中で最も多く、60%以上を占めるのがアルツハイマー病（AD）である。ADの発症機序には、さまざまな説があるが、アミロイドβ（Aβ）と呼ばれるペプチドが脳に蓄積することが原因である「アミロイドカスケード仮説」が広く支持されている。脳内では発症の約20年前からAβの沈着がはじまり、神経原線維変化へと経過する。しかし、発症後の治療介入により認知機能を改善させることは困難であり、発症前あるいは早期段階での治療介入が必要と考えられつつある。ADの診断には、PET検査や脳脊髄液（CSF）検査が用いられているが、PET検査は実施可能な施設が限られ、かつ検査が高額であり、またCSFは採取の侵襲のため、一般外来において検査を実施することは困難である。AD研究が進むなかで、早期診断の必要性が高まっているが、非侵襲的で低コストのバイオマーカーは確立されていない。最も身近なサンプルは血液であり、血液バイオマーカーとしていくつかの報告⁽¹⁾があるが、手法の複雑さや高感度な解析装置が必要などの課題があり実用化には至っていない。抗Aβ抗体アデュカヌマブが米国FDAで承認され、本邦においても承認審査中である。このことはADの早期診断の意義が今までとは異なる次元で高まることを示唆している。これまでに、我々はAD患者の血中フロチリンタンパクが顕著に低下し、診断マーカーになり得ることを見出した⁽²⁾。しかし、なぜ脳内事象であるADの分子病態が血中マーカーの変化として現れるかは未だに不明である。そこで血中フロチリンレベル変化の分子メカニズムについて本研究で検証した。

結 果

血中フロチリンレベルと認知機能障害および脳内Aβの沈着との関係を、家族性ADの遺伝子変異を持つADモデルマウス⁽³⁾（2、6、9、12ヶ月齢）を使用して検討した。さらに、血液脳関門（BBB）に着目して、in vitro BBBモデルを構築し、BBBにおいてAβがフロチ

リンレベルに影響を与えるかを検証した。以下にこれらの結果を示す。

1. 認知機能障害と血中フロチリンレベルの関係

ADモデルマウスに対して新規物体認識試験及およびステップスルー型受動回避試験を行った。新規物体認識試験では4ヶ月齢以降で、ステップスルー型受動回避試験では6ヶ月齢以降で認知機能に有意な低下が認められた。

また、血中フロチリンレベルをウエスタンブロットで解析した。ADモデルマウスにおいて血中フロチリンレベルは年齢依存的に低下する可能性が示された。

2. A β が血管内皮細胞におけるフロチリン分泌に与える影響

まず、BBBの主要構成細胞の一つである血管内皮細胞に対するA β の影響を検討した。transwell上面に血管内皮細胞を播種し、dish側の培地にA β を添加した。その後、transwell側の培地を回収し、ウエスタンブロットでフロチリンレベルの変化を確認した。培地中のフロチリンレベルに変化はなく、dish側に添加したA β は直接的にtranswell側のフロチリンレベルに影響を及ぼさない可能性が示唆された。

3. A β がin vitro BBBモデルにおけるフロチリン分泌に与える影響

BBBは血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを主要構成細胞として構成されている。中でもアストロサイトから分泌される液性因子がBBBの機能制御に影響していることが知られている^(4, 5)。そこで、血管内皮細胞とアストロサイトの共培養 in vitro BBBモデルを構成し、A β によるフロチリンレベル変化をウエスタンブロットで検討した。Transwell側のフロチリンレベルは時間依存的に低下し、A β 添加から72時間後には有意な低下がみられた。また、dish側のフロチリンレベルに明らかな変化は認めなかった。

考 察

血液検査で、脳内病変をとらえることが困難な理由の一つは、BBBの存在である。A β の排泄にはBBBが関与していることが知られており、本研究では、血液側と脳側の両面に面している血管内皮細胞に着目し、A β が血液側のフロチリンレベルを低下させる可能性を検証した。

今回使用したADモデルマウスは2ヶ月齢からアミロイド班の形成が始まり、6ヶ月齢から記憶学習障害が認められることが知られている⁽³⁾。本研究では、ADモデルマウスのアミロイド班の形成時期から血中フロチリンレベルの低下を認めており、血中フロチリンが脳内のA β 蓄積に伴い低下する可能性を示した。血中フロチリンレベルが脳内A β 蓄積を反映していれば、AD治療薬の効果判定に客観的なマーカーとして利用できる可能性が期待できる。

血管内皮細胞へのA β 添加実験では、フロチリンレベルに変化を認めなかった。一方で、

アストロサイトとの共培養モデルでは、時間依存的にフロチリンレベルの有意な低下を認めた。このことから、アストロサイトから放出される液性因子が、血管内皮細胞へ影響を及ぼし、transwell側のフロチリンレベルの低下を引き起こしている可能性が考えられた。

A β の除去にはエクソソームが関与することが知られている⁽⁶⁾。これまでに我々は、アストロサイトにおいてA β の投与によってエクソソームマーカーの一つであるフロチリン量が有意に変化することを報告している⁽⁷⁾。エクソソームにはmRNA、microRNA、タンパク質等の情報伝達物質が内包されており、周囲の細胞に情報を伝達し、周囲の細胞を制御していると報告されている⁽⁸⁾。また、AD患者では、エンドサイトーシス障害を示す病変が確認されていることから、エンドサイトーシス障害とA β との関係性にも注目が集まっている。エクソソームの形成、取り込みには、さまざまなエンドサイトーシス経路が関与することが示されており、AD患者における血中フロチリンレベル変化の分子病態にも、これらが関与している可能性がある。今後の方針としては、アストロサイトから分泌されている液性因子を同定し、血管内皮細胞におけるフロチリン分泌変化の細胞内メカニズムを解明していく。また、本研究の結果を、AD血液診断法の実用化へ応用していく予定である。

要 約

超高齢社会を迎え、認知症患者数は2025年には約700万人に増加すると推計されている。また、世界では3秒に1人のペースで認知症患者数は急増しており、認知症は世界共通の課題となっている。これまでのAD研究から、早期診断の重要性が示されてきたが、新たなAD治療薬アデュカヌマブの登場は、早期診断の意義をこれまで以上に高めた。

本研究では、これまでに我々が報告したAD患者における血中フロチリンレベル変化の分子病態メカニズムについて検討した。A β の蓄積は、BBBにおいてアストロサイトを介して血液中のフロチリンレベルを低下させる可能性が示された。

血液バイオマーカーは、非侵襲・低コスト・簡便な診断マーカーであるが、手法の煩雑さや高感度機器の必要性などの理由から現在まで実用化には至っていない。血中フロチリンは単一分子で診断が可能なことや脳内A β 蓄積を反映している可能性から、新たなAD診断法としての利用や、治療薬の効果判定として利用できる可能性が示唆された。

文 献

1. Zou K, Abdullah M, Michikawa M. Current Biomarkers for Alzheimer's Disease: From CSF to Blood. *J Personal Med* 10: 85-85 (2020)
2. Mohammad Abdullah, Noriyuki Kimura, Hiroyasu Akatsu, Yoshio Hashizume, Taslima Ferdous, Takuto Tachita, Shinsuke Iida, Kun Zou, Etsuro Matsubara, Makoto Michikawa. Flotillin is a Novel Diagnostic Blood Marker of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 72: 1165-76 (2019)

3. Takashi Saito, Yukio Matsuba, Naomi Mihira, Jiro Takano, Per Nilsson, Shigeyoshi Itoharu, Nobuhisa Iwata and Takaomi C. Saido. Single APP knockin mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 17: 661-663 (2014)
4. N Joan Abbott, Lars Rönnbäck, Elisabeth Hansson. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7: 41-53 (2006)
5. Jorge Ivan Alvarez, Takahiro Katayama, Alexandre Prat. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*, 61: 1939-58 (2013)
6. Kohei Yuyama, Hui Sun, Susumu Mitsutake, Yasuyuki Igarashi. Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia. *J Biol Chem*, 287: 10977-89 (2012)
7. Mohammad Abdullah, Hiroshi Takase, Mari Nunome, Hiroyuki Enomoto, Jin-Ichi Ito, Jian-Sheng Gong, Makoto Michikawa. Amyloid- β Reduces Exosome Release from Astrocytes by Enhancing JNK Phosphorylation. *J Alzheimers Dis*, 53:1433-41 (2016)
8. Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, Takahiro Ochiya. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101: 2087-2092 (2010)