
アルツハイマー病における 血液細胞外小胞バイオマーカーの開発

Development of blood extracellular vesicle biomarkers in Alzheimer's disease

北海道大学 産学・地域協働推進機構 認知症包括研究部門／特任准教授

湯山 耕平*

はじめに

近年実用化されたアルツハイマー病 (AD) のアミロイド抗体治療薬の最適な介入時期は、プレクリニカル期であると予測されている。そのため、対象者のスクリーニングや治療効果判定のために、アミロイド蓄積を早期段階で評価できる血液バイオマーカーとその検出技術の開発が望まれている。

私たちは、特定の表面分子をもつ細胞外小胞 (Extracellular vesicle, EV) を高感度で検出できるバイオセンシング技術を開発し、脳疾患の血液バイオマーカーとして利用することを目指している。最近、ADモデルマウス血液中のアミロイド β ($A\beta$) が結合したEVを計測することに成功した。本稿では、この $A\beta$ 結合型EVとその検出技術について概説する。

アミロイド β 結合型細胞外小胞

EVは、細胞から放出される膜小胞の総称であり、産生される細胞部位によって多くの異なる種類のEVが産生される。特に、エンドソーム膜由来するエクソソーム (直径30~150 nm) や、細胞膜の一部から出芽してできるマイクロベシクル (0.1~1 μm) の研究が進んでいる。EVには、特定のタンパク質、核酸、脂質などが含まれており、近接または遠距離の細胞間での分子伝達を担っている。また、神経細胞やグリア細胞などの脳細胞から放出されるEVには、さまざまな神経変性疾患に関連

するタンパク質が含まれている。例えば、ADの $A\beta$ やタウオパチーのタウ、パーキンソン病の α シヌクレイン、筋萎縮性側索硬化症のTDP-43などが報告されている。また、脳由来EVはその一部が末梢血液へ移行し検出されることから、脳疾患に関する血液バイオマーカーソースとして注目を集めている。

AD病態に関与する可能性が示唆されている $A\beta$ 結合型EVに関しては、2006年に初めてRajendranらによって、アミロイド前駆タンパク質 (APP) を遺伝子導入した培養神経細胞由来エクソソームに含まれるかたちで微量の $A\beta$ が培養液中に放出されることが報告された。私たちも、APP遺伝子導入マウスや、ADモデル動物として知られるカニクイザルから採取した脳脊髄液中のエクソソームに $A\beta$ が存在することを報告した¹⁾。さらに、EV、特に神経細胞由来エクソソームの膜表面にはGM1などの糖脂質が高密度に存在しており、この糖脂質を介して $A\beta$ がエクソソーム表面に結合することも明らかにした^{2,3)}。2015年以降、ヒトの血液や脳脊髄液中のEVにおいても $A\beta$ の存在が確認され、さらに脳神経細胞由来とされる血液中EVの $A\beta$ 量が健常者と比較してAD患者で増加することも報告されている。

また、ADモデルマウス (APP遺伝子導入マウス) を用いた実験において、EVの脳内投与や、薬剤処理・遺伝子操作によるEV量抑制で、脳内のアミロ

* Kohei Yuyama (Associate professor) : Institute for the Promotion of Business-Regional Collaboration, Hokkaido University

イド蓄積量が変動することが報告されており、EVがアミロイド病理形成に関与する可能性も示唆されている。このような背景から、私たちはAβ結合型(糖脂質GM1含有)EVがアミロイド病理を評価するバイオマーカー候補として利用できるかどうか研究を進めている。

Aβ結合細胞外小胞のデジタル検出システム

デジタル検出は、微量の対象物を高感度で検出する技術であり、検出対象の存在をバイナリ(1または0)のデジタル信号として検出する。私たちは現在、特定の表面分子を持つEVを対象としたデジタル検出システムの研究を行っており、Aβが表面に存在するEVの検出系(immuno-Digital Invasive Cleavage Assay, idICA)をTOPPANホールディングスと共同開発した⁴⁾。

この系の概略は、図1に示すように、まず血漿などの検体中から総EVを単離する。次に、総EVの中から検出対象となるEVを磁性ビーズで捕捉する。ここでは、糖脂質GM1を含むEVを選択的に捕捉す

るために、GM1を特異的に認識するコレラ毒素サブユニットB(Cholera Toxin Subunit B, CTB)で磁性ビーズを標識している。次に、抗Aβ抗体を反応させ、磁性ビーズ/EV/抗Aβ抗体の複合体を形成させる。その後、蛍光反応試薬と混合してマイクロウェルデバイスへ送液し、オイルを使ってマイクロウェルに封入する。マイクロウェル中での蛍光反応には、ICA反応を改良したDigital ICAを採用した。この反応は、検出抗体に結合したDNAオリゴを使った蛍光生成反応で、低温・短時間でウェル一個の中にある一分子のAβから検出が可能となる。反応後に、蛍光顕微鏡で撮影し、蛍光陽性ウェルをカウントして標的EV濃度を算出する。

このidICAを利用して、ADモデルマウスの血清中のAβ結合型EVを計測したところ、加齢とともにidICA値も月齢が進むごとに上昇した(図2)。また、個体別に脳内Aβ濃度と血清idICA値の相関を調べると、Aβ40とAβ42の両方で強い相関が認められた。脳Aβ蓄積量と負の相関を示す遊離Aβとは逆に、Aβ結合型EV(idICA値)は脳Aβ蓄積

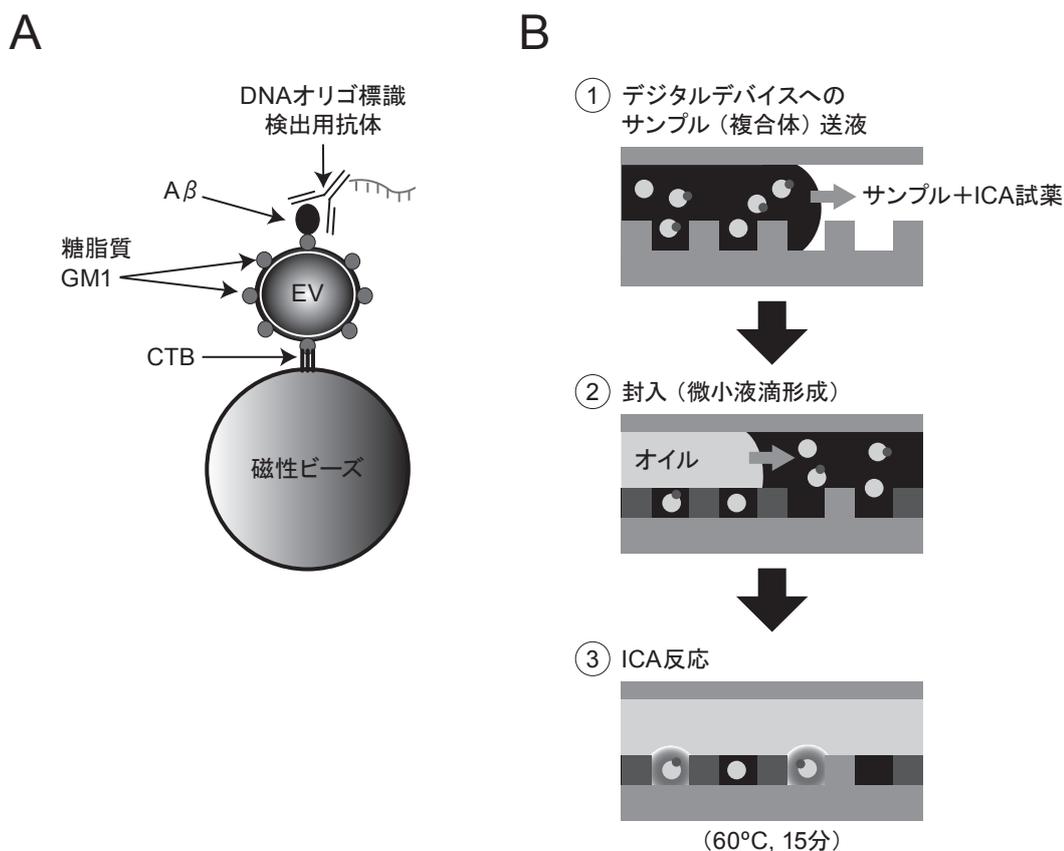


図1 idICA検出システムの概略

A. 磁性ビーズ/EV/検出用Aβ抗体の複合体, B. デジタル計測システムの流れ

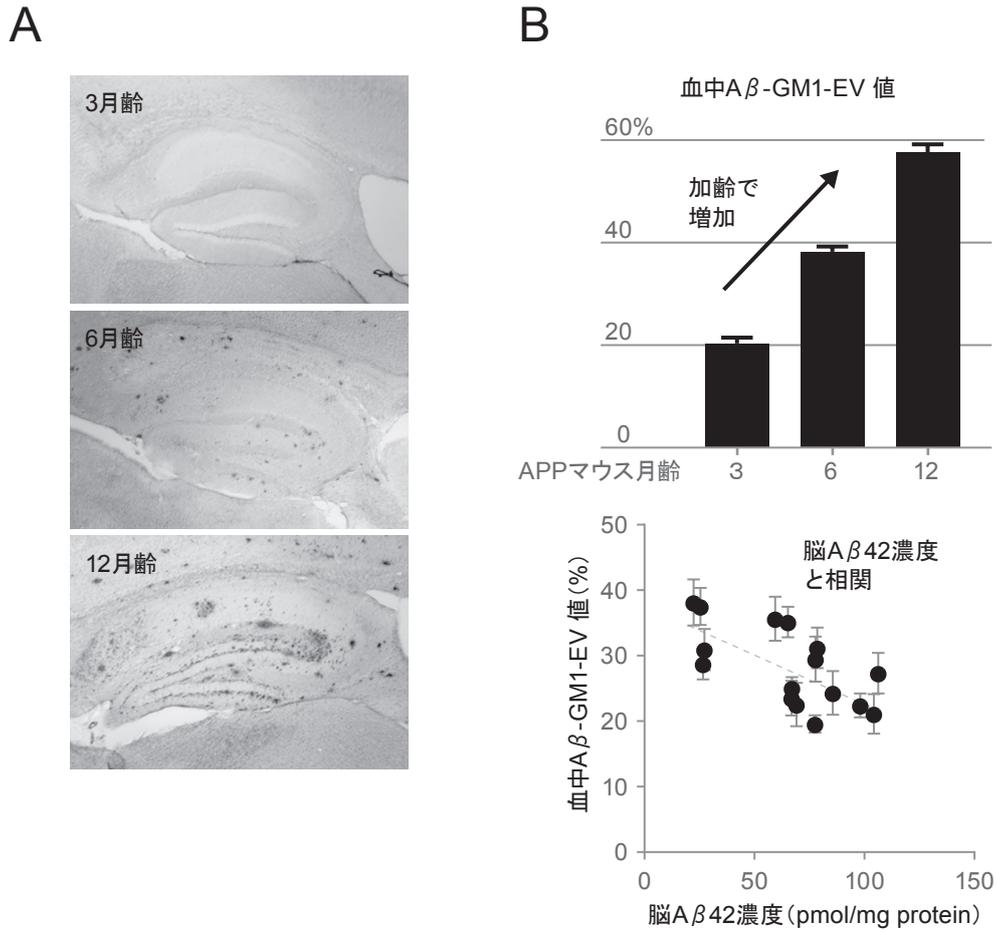


図2 Aβ結合型EVのデジタル検出

A. APP遺伝子導入マウス海馬切片のAβ免疫染色図, B. ADモデルマウス血液中Aβ結合型EVのidICA計測結果

量と正の相関を示した。現在、MCIやAD患者を含む臨床血液検体を用いたAβ結合型EVのバイオマーカー性能評価を進めている。

おわりに

ICA法は標識DNA配列を変えることでマルチカラーでの検出が可能である。今後はidICAの対象分子のバリエーションを増やし、複数のEVマーカーを同時に検出することで、例えば認知症原因疾患の類別診断などに利用できるEV検出基盤技術の構築を目指したい。

参考文献

- 1) Yuyama K, Sun H, Usuki S. et al.: FEBS Lett. 2015; 589: 84-88.
- 2) Yuyama K, Sun H, Mitsutake S. et al.: J Biol Chem. 2012; 287: 10977-89.
- 3) Yuyama K, Sun H, Sakai S. et al.: J Biol Chem. 2014; 289: 24488-98.
- 4) Yuyama K, Sun H, Igarashi Y. et al.: Alzheimers Res Ther. 2022; 14:140.

この論文は、2024年7月27日(土)第37回老年期認知症研究会で発表された論文です。