

調査研究番号 26-1-2

認知症・依存症の早期診断・新規治療法の開発—その1

大阪精神医療センター こころの科学リサーチセンター

塩坂 貞夫、島田 昌一

1. 諸言

こころの科学リサーチセンターでは、社会的ストレスや急激な変革による現代人の心の病に対処するため、橋渡し研究 (Translational Research) を行うべく 2020 年 4 月に大阪精神医療センターの一部門として新設された。とりわけ社会要求度の高い認知症・依存症に絞り研究を行っている。塩坂ユニット・島田ユニットはそれぞれ認知症・依存症を中心に検討している。

1.1 認知症ユニット (塩坂ユニット)

カリクレイン関連ペプチダーゼ (kallikrein related peptidase : KLK) 8 は記憶や情動など大脳辺縁系の神経活動に同期して、エンドプロテアーゼ活性が活性化されるとともにその産生も増大する。同定された基質として神経栄養因子 (neuregulin 1 : NRG1) のほか接着分子、細胞外基質タンパク質がある。NRG1 は GABA ニューロンにある受容体にシグナルを伝え、 γ -アミノ酪酸 (gamma-Aminobutyric acid : GABA) ニューロンの活動を制御する。アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) や軽度認知障害 (mild cognitive impairment : MCI) においては、KLK8 は過剰となり脳脊髄液および血中 (cerebrospinal fluid : CSF/Blood) に漏出すると同時にアミロイドの蓄積を促進する。これによりシナプス伝達障害が起こると考えられる。このため血中 KLK8 量の測定は MCI および AD の診断法として極めて有力である。また、記憶や情動機能などを直接制御すると考えられるこのシステムを薬物、脳機能賦活法などにより制御できれば有力な治療法となり得る。

1.2 依存症ユニット (島田ユニット)

依存症の先行研究においては診断の要件を満たすバイオマーカーは存在しない。依存症の重症度の客観的なマーカーができれば、治療や再発防止の指標としても大いに役立つと考えられる。本研究では血中の微量元素の変化を網羅的に分析し、依存症との関係を解析した。生体内の 96.6%は炭素、酸素、水素、窒素の 4 つの主要な構成元素からなるが、それ以外にナトリウム、カリウム、カルシウムなどの 7 つの中間元素が 3~4%を占め、この両

者で生体内の99%以上を占める。それ以外の元素を微量元素と呼ぶが、微量元素の中には鉄や亜鉛など生命の機能維持に必要なものから、まだ機能のよく解っていない元素が多数存在している。しかし、最近の研究で生体内の微量元素の役割や重要性、疾患との関係も解明されつつある。本研究ではこの点に着目し、薬物依存によって生じる脳機能の変化を微量元素の測定を通して解析した。[redacted]モデル動物を用いて、誘導結合プラズマ質量分析法（inductively coupled plasma mass spectrometry：ICP-MS）によって血中微量元素の網羅的測定と多変量解析を行うことにより、[redacted]依存症モデルマウスと正常マウスの血液検体を高い精度で識別する方法を開発した。

2.方法

2.1 認知症

血漿 KLK8 の測定法として今回酵素結合免疫吸着法（enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA）システムを立ち上げ、高感度な測定を可能とした。全長ヒト KLK8 タンパク質のモノクローナル抗体を作成した。またこれを用いヒト KLK8ELISA システムを立ち上げた。これを用い日本人集団に対して MCI および各ステージの AD の血液（および CSF）を用いて検討した。測定対象として KLK8 を最小検出感度、希釈直線性、干渉物質による影響、病態および既存マーカーとの相関性、測定再現性などを総合的に検討した。

2.1.1 後ろ向き研究

臨床検査および既存バイオマーカーによって診断された患者の脳脊髄液および血漿リソースを用いた KLK8 定量法の確立を行った。

2.1.2 前向き研究

大阪精神医療センターのもの忘れ外来由来の血漿サンプルを用いて、アミロイドβ（Aβ）、リン酸化タウ、KLK8 を同時に、時間経過を追って分析する血中 KLK8 の定量法の確立を行った。

今後、血液バイオマーカーを微量サンプルから高感度で迅速に測定するために、全自動免疫測定装置による高感度自動アッセイ系の確立を目指す。

2.2 依存症

6週齢のオスマウス（C57BL/6JJmsSlc）を日本エスエルシー株式会社より入手した。7週齢目から5日間連続で[redacted]もしくは生理食塩水を腹腔内投与した。[redacted]の腹腔内投与方法は、[redacted]投与量が2 mg/kgになるように[redacted]塩酸塩（製品名：[redacted]）を生理食塩水で調整し、インスリン用シリンジ（マイジェクター）を用いて1日1回、5日間連続投与すること

で██████依存症モデルマウスを作製した。

血清 25 μL を測定容器に取り分け、そこへ酸を加えて加熱分解を行った。血清に対し 50 倍希釈になるように超純水で希釈を行い、ICP-MS (Agilent 社製 Agilent7800、使用ソフト: Mass Hunter 4.3 Workstation Software for 7800 ICP-MS バージョン C.01.03 (ビルド: 505.16)) で各種元素の量を網羅的に測定した。血清の代わりに超純水で同様の操作を行ったものを操作ブランクとした。

コントロール群と██████投与群の各元素の実測値を用い、多変量解析を行い両者を識別する判別式を作成した。

3.結果

3.1 認知症ユニット

3.1.1 KLK8 抗体

1998 年我々が同定した抗原アミノ酸配列 (図 1) をヒト胚性腎細胞 (HEK 細胞) に発現させ、その培養上清からリコンビナントヒト KLK8 を調整した。定法通り抗体を産生細胞とミエローマを融合させ、ヒト抗体を産生するハイブリドーマ 16 クローンを選択した。このハイブリドーマの中から、結合親和性や特異性に優れたモノクローナル抗体を産生する細胞をさらに 7 クローン選別した。このうち 2 つのクローンから抗体を精製し、サンドイッチ法による ELISA システムを立ち上げた。

```
MGRPRPRAAKTWMFLLLLGGAWAGHSRAQEDKVLGGH  
ECQPHSQPWQAALFQGGQLLCCGGVLVGGNWWLTAABC  
KKPKYTVRLGDHSLQNKDGPEQEIPVVQSIPHPCYNSSD  
VEDHNHDLMLLQLRDQASLGSKVKPISLADHCTQPGQK  
CTVSGWGTVTSPRENFDTLNCAEVKIFPQKKCEDAYPG  
QITDGMVCAGSSKGADTCQGDSGGPLVCDGALQGITSW  
GSDPCGRSDKPGVYTNICRYLDWIKKIIGSKG
```

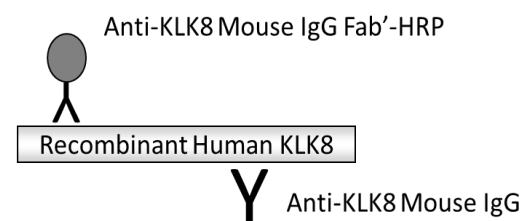


図 1 KLK8 アミノ酸配列及びサンドイッチ ELISA システム概要

3.1.2 血中 ELISA システムの検証

新規開発した ELISA システムで市販血漿にて測定したところ、約 300 pg/ml と先行研究 (Teuber-Hanselmann et al.²⁾) による正常コントロールの血中値 48.3~508.4 pg/ml とほぼ同等の結果が得られた。リコンビナント KLK8 の各濃度により検討したところ、十分なダイナミックレンジが得られ、高感度で実用的な ELISA システムが完成した。現在、大阪精神医療センターにおいて前向きサンプルの収集を行っており、本システムにより検討してゆく予定である。

3.2 依存症ユニット

連続投与の 依存症モデルマウスの血中の微量有元素を ICP-MS により網羅的に解析した。コントロールグループ間での血中の微量元素の含有量は、それほど大きなばらつきはなく、正常なマウスの生体内での必要な元素量は、比較的厳密にコントロールされていることが分かった。その中で、重要と考えられる 19 元素を選別し、多変量解析を行いコントロールマウス群と依存症マウス群の識別を可能とする判別式を作成した。この判別式より算出したスコアで比較すると 83%の判別率で、 依存症マウス群とコントロールマウス群を識別することができた。

4. 考察

4.1 認知症ユニット

AD のバイオマーカーとして、これまで CSF および血漿中での A β 42 やリン酸化タウの定量法あるいは脳画像検査が開発されてきた。しかし、これらは、MCI や初期 AD 患者の血漿においては正常人との差がつかない。理由としてこれらマーカーは神経の病理変性に基づいており、MCI 患者や初期 AD 患者の脳変性が軽微であるため CSF、血中での変化が神経変性を反映していないことが考えられる。また、原因物質の軽度な蓄積しかない認知症の初期段階であっても、記憶障害など生理学的な伝達障害、すなわちシナプトパチーは起こる。したがって、MCI 患者の治療あるいは AD への移行を防止する目的でバイオマーカーを測定するためには、A β やタウに先行し生理学的変化に鋭敏に反映するバイオマーカーを見いだすほかない²⁾。このことは、先制治療および予防的介入を実施する上で極めて重要なものとなる。我々は、AD 脆弱部位である大脳辺縁葉に局在し、且つ AD 患者脳で異常な遺伝子増加を示す神経可塑性制御分子 KLK8 を発見した。この KLK8 異常産生と蓄積は、患者死後脳の検討においてだけでなく CSF や血中においても認められる。この KLK8 起点シグナル系を測定できれば MCI 発症から初期 AD への移行期の重要なバイオマーカーとなり得る。しかし残念なことにこのアイデアは最近ドイツの研究者によって先行された。彼らは MCI および AD 患者血漿を用い、CSF および血漿中 KLK8 の有意な異常増加を報告した²⁾。

今回われわれはこの報告を日本人集団について追試するため、およびさらに実際の診断に用いることが出来る高感度で安定な ELISA システムの確立を行い、MCI およびその AD への移行過程を前向き研究により明らかにすることを目指す。その前段階として今回高感度 ELISA システムの確立に成功した。

4.2 依存症ユニット

をマウスに連続投与して 依存症モデルを作成し、ICP-MS を用いて血液検体の微量元素を網羅的に測定し多変量解析を行うことにより、数値化した客観的

な指標で、**██████**依存症モデルマウスと正常マウスの血液検体を高い精度で識別できることを明らかにした。微量元素の中には、脳内で神経伝達物質の代謝や合成に関わる酵素活性に必要な元素や、神経伝達物質の受容体の発現や機能調節などに必要な元素が存在し、正常な脳の神経活動を行うために、脳内ではこれらの微量元素は一定のバランスを保つように維持されている。本研究において、変化の認められた微量元素に関して、どのように依存症の形成が関与しているのかそのメカニズムを研究していく必要がある。今回は**██████****██████**依存モデルを用いて、微量元素測定による判別方法を開発したが、**██████**依存など他の依存モデルにおいても同様の解析方法で判別できるのか、依存症ごとに微量元素の変化プロフィールがどの様に異なるのか、どの様に共通するのか、依存症の重症度とこの指標が相関するのかなど、今後行うべき多くの研究課題が考えられた。

依存症は認知症を誘導もしくは加速するといわれている。たとえば、アルコールや薬物依存は脳を萎縮させ、認知症の発症を早める。しかし認知症素因がある人が依存症に陥りやすいのかといった研究はない。各バイオマーカーを前向きに検討していくことで、両者の関連が明らかとなると考えられる。認知症および依存症の前向き血液サンプルを今後さらに収集していき、バイオバンクとする計画である。

5.結語

5.1 認知症ユニット

認知症の早期診断の準備のため抗体を作成し、ELISA システムを確立した。

5.2 依存症ユニット

誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いて血中微量元素の網羅的測定と多変量解析を行うことによって、**██████**依存症モデルマウスと正常マウスの血液検体を高い精度で識別できる方法を開発した。

6.文献

- 1) Yoshida, S., Taniguchi, M., Hirata, A., Shiosaka, S., 1998. Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene. *Gene* 213, 9–16.
- 2) Teuber-Hanselmann, S., Rekowski, J., Vogelgsang, J., Von Arnim, C., Reetz, K., Stang, A., et al. 2020. CSF and blood kallikrein-8: A promising early biomarker for Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 91, 40–48. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-321073>

7.成果発表

未発表