

<シンポジウム (3)—11—4> 神経変性疾患の病態解明・その病態とバイオマーカーの開発を目指して

パーキンソン病のバイオマーカーの開発を目指して

徳田 隆彦

(臨床神経 2012;52:1332-1334)

Key words : バイオマーカー, パーキンソン病, α -シヌクレイン, オリゴマー, プロテオミクス

パーキンソン病 (PD) の診断は, 生前診断の正診率が運動障害疾患専門家間でさえ~85% であること¹⁾からも, その病理変化を反映するバイオマーカー(サロゲートマーカー)の開発が求められている。さらに, 近年の研究により, 孤発性 PD における脳病理とくに α -シヌクレインの異常蓄積は運動障害の出現以前に始まっていることが明らかにされており²⁾, このような段階の病理変化をとらえられるバイオマーカーが開発されれば, より早期の治療および運動症状の予防的治療も可能になると考えられる。疾患バイオマーカーの探索研究においては, 一般的に, すでに報告されている特定の疾患関連分子がバイオマーカーとして有用性であるか検討する手法(候補分子の解析/targeted analysis)が主流であるが, 近年のゲノミクスおよびプロテオミクスの急速な進歩により, ゲノムワイド関連解析あるいは髄液蛋白のプロテオーム解析などをバイオマーカーの開発に応用(網羅的解析/unbiased profiling)することも可能になってきている。

I. 候補分子の検討 (targeted analysis)

1) α -シヌクレイン (α -syn)

ヒト髄液中 α -syn の ELISA による定量は, 2006 年に著者らがおこなった報告が最初であり, 対照群と比較して, PD 患者では髄液 α -syn 濃度が低下していた³⁾。PD で髄液 α -syn が低下する病的機序としては脳実質への沈着が free の可溶性 α -syn を低下させていることが主因であると考えた。その後, 2010 年の報告では, α -syn の髄液濃度は, 採取時の血液のコンタミネーションによって大きく増加することが示された。ヘモグロビン濃度の高かったサンプルを除去すると PD 群では正常対照群よりも有意に低値であった⁴⁾。したがってこれまでの髄液 α -syn を定量した報告の結果が一致しなかったのは, 血液のコンタミネーションが原因である可能性がある。

また, アルツハイマー病などと同様に, 可溶性 α -syn オリゴマーこそが PD 患者脳における神経細胞毒性にとって重要であるならば, それは PD の病態発現により特異的なバイオマーカーとなるはずである。われわれは, α -syn オリゴマーを定量する single-antibody sandwich ELISA (SAS-ELISA) という方法を世界に先駆けて開発した (Fig. 1A)。この方法で認識できる髄液中 α -syn オリゴマーは対照群 (28 例) と比較し

て PD 群 (32 例) で有意に増加していたこと (Fig. 1B), さらに髄液中の α -syn オリゴマーと total α -syn の比をとることで PD 群と対照群を感度 90.6%, 特異度 89.3%, ROC (receiver operating characteristic) 解析での AUC (area under the curve) が 0.948 と, きわめて高い弁別能力で鑑別できた (Fig. 1C) ことを報告した⁵⁾。このように髄液 α -syn オリゴマーは PD のバイオマーカーとしてきわめて有用性が高い可能性があるが, 今後の大規模研究による validation が必要である。

上記以外にも様々な蛋白や化合物が PD あるいはパーキンソニズムのバイオマーカーとして検討されているが, その多くは単一の施設からの報告あるいは少数例での検討である。そのような報告については, 詳細なレビューが存在するので参照して欲しい^{6)~8)}。

II. 網羅的解析 (unbiased profiling)

最近の技術的な進歩により, 特定の組織, 体液や細胞中に存在するすべての遺伝子, メッセンジャー RNA (mRNA), 蛋白, 代謝産物 (metabolites) などの網羅的な検討 (ゲノミクス, プロテオミクス, メタボロミクス) が可能になりつつある。

1) 髄液蛋白のプロテオミクスの検討

①髄液蛋白の網羅的解析によるバイオマーカー候補分子の同定

PD および対照患者の髄液を iTRAQ ラベリングと LC-MS/MS によって分析した報告では, 1,500 以上の髄液蛋白の中から, PD 群において発現量がことなった 72 種類の髄液蛋白質を同定している。その中の 8 種類の髄液蛋白セットを, 蛍光色素標識ビーズとフローサイトメトリーにより多項目同時測定をおこなうシステム (Luminex suspension array technology) をもちいて定量した結果では, 8 種類の髄液蛋白 (t-tau, 脳由来神経栄養因子 (BDNF), インターロイキン 8, A β 42, β 2-ミクログロブリン, ビタミン D 結合蛋白, アポリポ蛋白 AII, アポリポ蛋白 E) の同時解析により, PD 群と正常対照群とを感度 95%, 特異度 95% で弁別できたとしている⁹⁾。

②プロテオミクスパターン解析の PD 鑑別診断への応用

われわれは, 上記のようなプロテオミクス解析によって複数の候補分子を同定する方法とはことなり, 磁性ビーズとマ

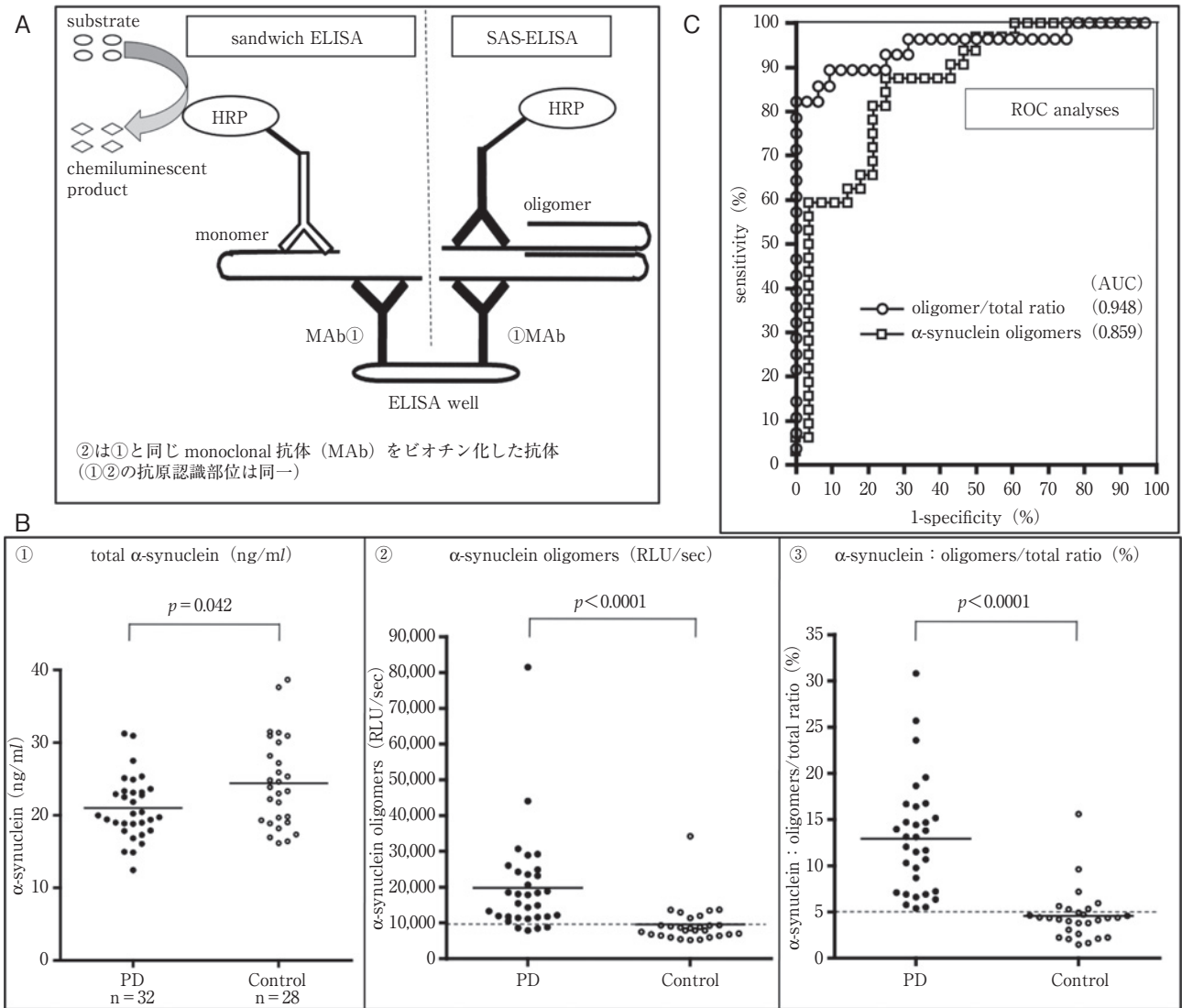


Fig. 1 (A) 通常の sandwich ELISA と SAS-ELISA の原理を示す模式図。SAS-ELISA はモノマーを検出せずにオリゴマーを検出する。(B) PD 患者 (n=32) とコントロール患者 (n=28) の髄液中の total α -syn (①), α -syn オリゴマー (②), オリゴマー/total 比 (③) を示す。PD 患者ではコントロールと比較して、髄液中の total α -syn は減少し、 α -syn オリゴマーおよびオリゴマー/total 比は増加していた。total α -syn の値には両群の間にかかなりの overlap があつたがオリゴマー/total 比をもちいると両群間の overlap はかなり減少した。(C) 髄液中の α -syn オリゴマーおよびオリゴマー/total 比による PD 群とコントロール群の鑑別をおこなつた場合の ROC 曲線。両者とも高い鑑別能力を有しており AUC はそれぞれ 0.859, 0.948 ときわめて高い値を示した。

トリックス支援レーザー脱離 (MALDI) 型質量分析計 (autoflex II, Bruker Daltonik GmbH) を組み合わせた新しいシステム (ClinProt システム) を使用し、多変量解析などの統計手法を駆使することによって、CSF プロテオミクスパターン解析によって PD と MSA の鑑別が可能かを検討した¹⁰⁾。PD 26 例、MSA 23 例、対照患者 26 例の計 75 例を first cohort、PD 11 例、MSA9 例の計 20 例を second cohort として、総計で 95 例を対象として解析した。各 CSF サンプルから取得した質量スペクトラムは、ソフトウェアをもちいて標準化した後、多変量解析をおこなつた。機械学習法のひとつである support

vector machine (SVM) アルゴリズムをもちいた PD、MSA、対照群のそれぞれの判別モデルの有効性は、MSA 群と対照群は常に 90% 以上、PD 群と対照群も 83% 以上の cross validation (CV) 値で鑑別可能であつた。PD 群と MSA 群も 83% 以上の CV 値を示した。また、1st cohort で作成した判別モデルを 2nd cohort にて検証し、さらに逆に second cohort をもちいて作成した判別モデルを 1st cohort をもちいて検証して、SVM モデルの再現性を検討した。感度、特異度は、両比較において 80% 以上で、PD の陽性判別率はいずれの検討においても 80% 以上であつた。われわれの検討は、プロテオミ

クスパターン解析の手法が診断の正確性を向上させ、今後の臨床マネジメントや研究に有用であることを示唆している。今後は大規模スタディーでさらに再現性を検討し、臨床で使用可能な診断パネルの作成や、バイオマーカー分子の同定などを継続研究する予定である。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織や団体
研究費・助成金などの総額：武田薬品工業株式会社
企業などが提供する寄付講座：第一三共株式会社

文 献

- 1) Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998;339:1044-1053.
- 2) Braak H, Del Tredici K, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
- 3) Tokuda T, Salem SA, Allsop D, et al. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:162-166.
- 4) Hong Z, Shi M, Chung KA, et al. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 2010;133:713-726.
- 5) Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, et al. Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from Parkinson's disease patients. *Neurology* 2010;75:1766-1772.
- 6) Mollenhauer B, Trenkwalder C. Neurochemical biomarkers in the differential diagnosis of movement disorders. *Mov Disord* 2009;24:1411-1426.
- 7) Constantinescu R, Zetterberg H, Holmberg B, et al. Levels of brain related proteins in cerebrospinal fluid: an aid in the differential diagnosis of parkinsonian disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:205-212.
- 8) Shi M, Huber BR, Zhang J. Biomarkers for cognitive impairment in Parkinson disease. *Brain Pathol* 2010;20:660-671.
- 9) Zhang J, Sokal I, Peskind ER, et al. CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases. *Am J Clin Pathol* 2008;129:526-529.
- 10) Ishigami N, Tokuda T, Ikegawa M, et al. Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov Disord* 2012 Jun 1. doi: 10.1002/mds.24994 (in press).

Abstract

Aiming to develop biochemical biomarkers for Parkinson's disease and related disorders

Takahiko Tokuda, M.D.

Department of Molecular Pathobiology of Brain Diseases (Neurology), Kyoto Prefectural University of Medicine

In Parkinson's disease (PD), its diagnosis, measurement of progression and response to therapeutic intervention currently rely upon clinical observation. However, there remains a critical need for validated biomarkers for PD. Among proteins in cerebrospinal fluid (CSF) there is ample biochemical, pathological, and genetic evidence that the metabolism of α -synuclein (α -syn) plays a crucial role in the pathogenesis of PD. We first reported that PD patients had significantly lower α -syn levels in their CSF than the control groups. We then investigated the levels of α -syn oligomers in CSF using a specific self-developed ELISA. The levels of α -syn oligomers were significantly higher in the PD compared to the controls, with a sensitivity of 75.0% and a specificity of 87.5% for the diagnosis of PD, demonstrating that CSF α -syn oligomers can be a useful biomarker for diagnosis of PD. We have recently developed a proteomic profiling strategy for PD. CSF proteins were purified with C8 magnetic beads, and mass spectra were obtained by mass spectrometry. By building a Support vector machine classifier, PD and multiple system atrophy (MSA) were classified effectively with good cross-validation accuracy. A proteomic pattern classification method can increase the accuracy of clinical diagnosis of PD and MSA.

(*Clin Neurol* 2012;52:1332-1334)

Key words: Parkinson's disease, biomarker, α -synuclein, oligomer, proteomics