神経疾患の体液バイオマーカー：血液バイオマーカーを中心に

要 旨

神経疾患では、原因である病理変化と神経症状の対応が患者毎の個人差が大きく、また、病理変化は出現しているが、臨床症状がないpreclinical期が存在する。従って、神経疾患の診断・重症度の層別化には客観的なバイオマーカー（biomarker：BM）が不可欠である。画像BMと血液BMは、その有用性が相互に補完的であり、単独で使用するのではなく、背景病理を正確且つ定量的に反映する多項目の画像・血液（体液）BMが一体となった診断システムの開発と実用化が重要である。

〔日内会誌 109：2502～2508, 2020〕

徳田 隆彦

Key words 神経疾患, 画像バイオマーカー, 血液バイオマーカー, Alzheimer病（AD）, Parkinson病（PD）

はじめに：神経疾患における バイオマーカーの必要性

神経疾患は、高齢者では頻度の高い疾患であり、一般診療でも遭遇することが多く、的確な診断及び治療が求められる。神経疾患の診断は、未だに熟練を要する（artisticな）神経学的所見の占める割合が多く、また、熟練した脳神経内科医でも、神経所見だけでは診断が困難な症例がしばしば存在する。また、原因となっている病理変化と出現する神経症状の種類・重症度との対応は個々の症例でかなり異なっており、その経過にも個人差が大きい。以上からは、神経疾患の診断と重症度の層別化診断には、背景となる生化学的・病理学的異常とその重症度

の診断と経過観察を行うための、科学的な（scientific）なBMが必要不可欠である。さらに決定的なこととして、近年、Alzheimer病（Alzheimer's disease：AD）やParkinson病（Parkinson's disease：PD）等の神経変性疾患では、臨床症状が出現する数年～数十年前から疾患特異的な脳病理が出現し始めることが明らかになっている。このようなpreclinical期こそが治療的介入に最適な時期であるとされており、その診断はBMなくしては不可能である。

多種多様なBMのなかで開発が進んでいるのは、画像BMと体液BMである。画像BMと体液BM、特に血液BMは相互に補完的なものである。すなわち、ある神経疾患の血液BMの探索・開発においては、「答え合わせ」をするための「基準

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所脳機能イメージング研究部

Clinical Examinations: Mutual Understandings and Adequate Usage Suitable for a New Era. Topics：VII. Fluid biomarkers for neurological diseases：focusing on blood-based biomarkers.

Takahiko Tokuda：Department of Functional Brain Imaging Research, National Institute of Radiological Sciences, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, Japan.

図1 Alzheimer病の脳病態の時間経過とATN BM (体液BM)

Aβアミロイド病理 (ATNのA) は、認知症発症の20年前から蓄積し始め、アミロイド病理が元来は正常加齢である内側側頭葉のリン酸化タウ蓄積 (神経原線維変化: ATNのT) を新皮質へ伝播させてAlzheimer病による認知障害が出現する。神経細胞障害 (ATNのN) の出現にはタウ病理が必須条件である。それぞれの脳病態を反映するBM, すなわち, ATN BMが提唱されており¹⁾, 著者のグループでは, 全てを血液で定量することができる。

NFT: neurofibrillary tangle

となる診断法」(standard of truth: SOT) が必要であるが、従来、神経疾患では、そのSOTは病理診断に頼らざるを得なかった。しかし、近年の、疾患特異的な脳内の異常構造物を画像化できるPET (positron emission tomography) 検査のめざましい進歩によって、それが体液BMのSOTとして使用できるようになりつつある。しかし、画像診断は、高価・低効率・可能な施設が限定的等の欠点があり、大規模なスクリーニングには向いていない。また、preclinical期の診断においては、症状がないために陽性者の検出効率が悪い。このような場合に、スクリーニングに最適な血液BMが利用できれば、より効率的に画像BMの実施対象とすべき患者を選定できる。このように、画像BMと血液BMは、相互促進的に開発・検証していくべきものであり、最終的には、患者の診断及び重症度による層別化診断を行うための、血液BMと画像BMを一体化した「多項目BMシステム」が必要であると著者

は考えている。

本稿では、最近進歩が著しいADの血液BMを中心に概説し、PDの血液BMについても紹介したい。

1. Alzheimer病 (AD) の血液BM

1) ADの脳病理を反映する“ATN” BMシステム

ADに特徴的なアミロイドβ (amyloid β: Aβ) 蛋白やタウ蛋白の脳内蓄積は、臨床症状を発症する数年~20年前に始まっており、このようなpreclinical期を含めて、ADには、臨床症状ではなく、脳病理に基づいた病期診断・分類が必要である (図1)。最新のADのBM分類システムとして、ATN分類 (A: 凝集Aβ, T: 凝集タウ, N: 神経変性あるいは神経損傷) が提唱されており¹⁾ (図1), 過去30年の国際的なAD研究の成果をもとに、それぞれのBMとして、Aにはアミロ

イドPET及び髄液A β 42（あるいはA β 42/40比）、TにはタウPET及び髄液リン酸化タウ（p-タウ）、NにはMRI（magnetic resonance imaging）、FDG（fluorodeoxyglucose）-PETならびに髄液 total タウ（t-タウ）が挙げられている。このように、当初に提唱されたATN分類の生化学BMは髄液BMであったが、現在では、これらを血液で正確に定量できるシステムが希求されている（図1）。

2) 新規の超高感度リン酸化タウ（p-タウ）

定量系の開発

我々は、近年開発された従来のELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法の1,000倍の検出感度を実現できる超高感度デジタルアッセイ技術であるSimoa（single molecule array；米国Quanterix社）を用いて、2017年9月に世界で初めて、実際のヒトの血液中でp-タウをfg/mlのオーダーで検出できる定量系を開発した²⁾（図2A）。この新規に開発した定量系を用いて、実際の患者血漿中p-タウを定量すると、正常対照群と比較して、AD患者群では血液中p-タウが有意に高値であった（ $p=0.0039$ ）（図2B）。さらに、40歳代から大脳にp-タウからなる神経原線維変化が出現し始めることがわかっているDown症候群（Down syndrome：DS）患者群では、年齢を合致させた正常対照群と比較して、血液p-タウ値が有意に高値であった（ $p=0.0332$ ）。さらに、血液p-タウ値が非常に高い値（ >1.0 pg/ml）を示したDS患者は全員が40歳以上であった²⁾（図2C）。これらの結果からは、我々が新規に開発したp-タウ定量系で測定した血液p-タウ値は、AD患者やDS患者に出現する認知機能障害と最も密接に関連する神経原線維変化の出現を反映するBM、すなわち、ATN分類の“T” BMになると考えた。

3) 国際的なADのBM研究の状況と今後の展開

この数年、AD研究の領域では、国際的に血液BMの開発研究が激しい競争のもとに行われている。

まず、ATN分類の“A” BMについては、ELISA法・Simoa・質量分析法等で、血液中のA β 42及びA β 40を定量してA β 42/40比をとることによって、アミロイドPETで検出した脳のアミロイド沈着を高精度で予測できるとする報告が2018年から2019年にかけて相次いでなされている。我が国からも、島津製作所と国立長寿医療研究センターとの共同研究で、免疫沈降法と質量分析法を組み合わせた方法により、90%以上の精度で脳のアミロイド沈着を血液で判定できる方法が2018年にNature誌に報告され³⁾、既に受託検査として利用できる体制がスタートしている。

ATN分類の“N” BMについても、神経細胞変性の検出においては、Jackらがオリジナル論文¹⁾で挙げたt-タウよりも髄液及び血漿中のneurofilament light chain（NfL）がより有力な“N” BMの候補であることが、複数の大規模試験で報告されている⁴⁾。

また、我々の最初の報告からは2年遅れていたが、2019年末から2020年はじめにかけて、Simoaやその他の定量システムを用いて、血液中のp-タウがADの診断に有用なことが、タウPETの結果と良好な相関を有すること、MCI（mild cognitive impairment）から認知症へconversionするか否かの予後判定に有用であること等が米国及びスウェーデンの大規模コホート研究から続々と報告されている⁵⁾。

さらに、今後は、ADのATN病理だけでなく、シナプス障害や神経炎症を反映するBM、そして、非AD認知症の分子病態を反映するBM等の必要性も考慮すべきであり、我々量子研（National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology：QST）では、“ATN” BMを超える、多項目の血液BMと画像BMを統合した日本発の包括的な認知症診断・層別化BMシステム（beyond ATN）の開発・検証・実用化を目指している（図3）。

図2 徳田らが開発した血液p-タウを定量できるSimoaシステムとそのヒト血漿への応用

- A：我々のSimoa系の標準曲線。p-タウを、従来その検出に用いられていたELISA法の1,000倍の高感度で検出できるp-タウ定量系を開発することに成功した。
- B：AD患者及び正常対照者（control）の血液中p-タウの定量。（左図）我々が開発したp-tau定量系（Simoa）で測定したAD及びcontrolの血液中p-タウ濃度を示す。AD群では、正常対照群と比較して、血液中p-タウが統計学的に有意に高値であった。（右図）p-タウ定量系によるADとcontrolを鑑別診断する能力を検討するROC曲線。ROC曲線のAUC値は0.786であった。
- C：DS患者及びage-matchさせた正常対照者（control）の血液中p-タウの定量。（左図）我々が開発したp-タウ定量系で測定したDS患者及び正常対照者（control）の血液中p-タウ濃度を示す。DS患者群では、正常対照群と比較して、血液p-タウ値が統計学的に有意に高値であった。（右図）DS患者の年齢と血液中p-タウ値の相関。血液p-タウ値とDS患者の年齢との間には正の相関が存在し、血液p-タウ値が著明な高値（>1.0 pg/ml）を示したDS患者（赤）は全員が40歳以上であった。

ROC：receiver operating characteristic, AUC：area under the curve

図3 量子科学技術研究開発機構 (QST) で開発中の

PET画像と血液BMを一体化した認知症の包括的な診断・層別化システム

徳田が所属するQSTでは、画像BM (PET画像) と血液BMの開発を相互促進的に行っており、自己開発したシーズを複数保有している。最終的には、多項目の画像及び血液BMを統合し一体化した認知症の包括的な診断・層別化システムの開発を目指している。

TDP : TAR DNA-binding protein, GFAP : glial fibrillary acidic protein, CXCL : C-X-C motif chemokine ligand, NSE : neuron-specific enolase

2. Parkinson病 (PD) の血液BM

PDについては、現時点では、その有用性が大規模に検証されて実臨床に应用されている髄液あるいは血液BMは存在しない。従って、ここでは、いくつかの候補分子について紹介する。

1) α-シヌクレイン (α-syn) : 髄液α-synの報告

α-シヌクレイン (α-synuclein : α-syn) の異常な蓄積はPDの疾患特異的な病理変化であり、その遺伝子の重複変異による過剰産生は臨床的重症度と相関すること等から、PDのBM候補として最も検討されている。著者らは、PD患者では、対照群と比較して髄液中の総α-syn (単量体が主体) 濃度が有意に低下することを世界で最初に示した⁶⁾。この結果は、複数のメタ解析で

も検証されているが、髄液総α-syn濃度はPD患者群と対照群との間にかなりのoverlapが存在しているため、個々の患者の診断BMとしての髄液総α-synの有用性は否定されている。そのため、より病態に直結する分子種であると考えられているα-synオリゴマーに注目が集まっている。著者らは、世界で初めてα-synオリゴマーをヒト体液中で定量できる特殊なELISA系 (SAS (single-antibody sandwich)-ELISA) を開発し、PD患者群では髄液中α-synオリゴマーが有意に上昇しており、PDと対照者を鑑別するうえで優れた鑑別能力を有することを報告した⁷⁾。この結果は、独立した複数の追試研究によって再現されている。

異常凝集したα-syn分子種の検出において最近の重要な知見は、protein misfolding cyclic

amplification (PMCA) 法, real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) 法ならびに HANdai Amyloid Burst Inducer (HANABI) 法等の方法によって, 凝集の核 (シード) となるシーディング活性を有する α -syn 分子種の検出がヒトの生体試料で可能になったことであろう。これは, α -syn 凝集のシードとなり得る異常 α -syn 分子 (α -syn オリゴマーあるいは微小線維) を含んだ生体試料を合成 α -syn 溶液中に添加し, 振とう攪拌または超音波照射を加えると, α -syn の凝集反応が加速される現象を利用している。特に PMCA/RT-QuIC 法で検出される α -syn 凝集反応の検出は, シヌクレイノパチーの診断において優れた診断能を有することを, 著者らを含む複数のグループが報告している^{3~5)}。また, 興味深いこととして, HANABI 法で計測した髄液中の α -syn 凝集活性が, 前述の著者らが開発した SAS-ELISA 法で定量した髄液 α -syn オリゴマー値と関連していた⁶⁾。さらに, PMCA/RT-QuIC 法の凝集反応曲線のパターンによって, PD と非定型パーキンソニズムである多系統萎縮症 (multiple system atrophy : MSA) が鑑別できることが 2020 年に報告され, 注目を集めている⁸⁾。PMCA/RT-QuIC 法で, 血液中のシーディング活性を有する α -syn 凝集核を検出する研究も始まっており, これが実現できれば非常に有望な血液 BM となり得る。

2) 血液中 α -syn

血漿中の総 α -syn (単量体が主体) は, 正常対照群との比較で, PD 群で増加/減少という相反する報告があり, 結果が一定しない。この不一致の最大の原因は, 赤血球中に大量に含まれる α -syn が採血時の溶血によって血漿/血清中に混入することをコントロールできないことであると考えられており, このために, 血中 α -syn はそのままでは血液 BM としては利用できない。この問題を回避する戦略として, 脳由来のエクソソームを血漿から単離してエクソソーム中の

α -syn を測定している報告がある。重要な研究であるが, 今後の検証が必要である。

3) 血液中 NFL

髄液・血漿/血清中の NFL は, その原因に関係なく, 神経細胞, 特に大径有髄線維の軸索障害によって上昇し, また, 神経障害の進行が速い疾患では, NFL の上昇が大きい (神経細胞障害の重症度を反映)。従って, 血中 NFL は神経細胞障害の診断及び重症度判定において有用な BM となる。PD は, MSA 等の非定型パーキンソニズムと比較すると進行が遅く, また, 大径有髄線維の障害は生じにくいと考えられる。実際に PD 群における NFL の増加幅は相対的に小さく, 非定型パーキンソニズムにおいては著明に増加するため, 血液中 NFL は両者の鑑別に有用である。

4) 蛋白分子の多項目同時解析

Qiang らは, 96 種類の蛋白分子を bead-based flow cytometric assay を用いて半網羅的に同時定量して候補分子を絞り込み, 別のコホートで検証することによって, 血漿中 apolipoprotein A1 (ApoA1) の低下が PD の早期発症及びドパミントランスポーター画像における取り込み低下と関連していることを明らかにした⁹⁾。この結果は, プロテオミクス解析で得られたデータとも合致しており, その後の追試でも ApoA1 の低下と PD の発症年齢との相関が確認されている。血漿 ApoA1 の低下は, 再現性のある診断 BM であると考えられる。

5) 代謝産物の網羅的解析 (メタボロミクス解析)

Hatano, Saiki らは, 血漿中の 434 種類の低分子代謝産物を網羅的に解析し, カテコラミン代謝, カフェイン・キサンチン代謝・酸化還元代謝に関連するいくつかの PD 特異的代謝産物を報告し, 特にカフェイン濃度について別コホートで再現性を確認している¹⁰⁾。メタボロミクス解析は, プロテオミクス解析と同様に, 対象と

した疾患におけるこれまで知られていない病態メカニズムを明らかにする可能性があり、興味深い。

まとめと今後の展開

前述のように、例えば、ADあるいはPDの異なる脳病理ステージを反映する多項目の血液BMが十分に検証されて臨床に応用されれば、それによって患者脳に出現しており、その神経症状の発現に関連している複数の病態（病理所見）とその進展度の診断を、血液BMを用いて、客観的・効率的且つ非侵襲的で安価に行うことが可能になると考えられる。このことは、これまでの神経疾患診療、特にAD及びPD等の脳の神経変性疾患の診療の枠組みを根本的に変える可能性がある。例えば、血液BMは、一般人口の多数の高齢者を対象にした健康診断において、煩雑

な神経心理学的検査や運動症状の評価（UPDRS（unified Parkinson's disease rating scale）等）を行う前に、迅速スクリーニング検査として用いることが可能である。また、今後の根本治療薬の開発研究でも、その臨床試験において、登録患者の客観的な診断と予後の層別化が安価な血液検査で可能になるため、新薬の開発コストを大幅に減少させ、ひいては、治療薬開発研究を加速させることにもつながっていく。これらの応用例のように、原因疾患の中核及び末梢神経病理を反映する血液BMは、神経疾患の日常診療から臨床研究までの全ての局面で、それらの診断過程を革新的に進歩させることが期待されており、それが現実になる近未来は、一輪の梅花を見つけて桜花爛漫の春を思うがごとく、もうすぐそこまで来ているのである。

著者のCOI（conflicts of interest）開示：徳田隆彦；寄附講座（大原記念病院グループ）

文献

- 1) Jack CR Jr, et al : NIA-AA research framework : toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14 : 535-562, 2018.
- 2) Tatebe H, et al : Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology : pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Mol Neurodegener* 12 : 63, 2017.
- 3) Nakamura A, et al : High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554 : 249-254, 2018.
- 4) Preische O, et al : Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in pre-symptomatic Alzheimer's disease. *Nat Med* 25 : 277-283, 2019.
- 5) Karikari TK, et al : Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease : a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol* 19 : 422-433, 2020.
- 6) Tokuda T, et al : Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 349 : 162-166, 2006.
- 7) Tokuda T, et al : Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75 : 1766-1772, 2010.
- 8) Shahnawaz M, et al : Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature* 578 : 273-277, 2020.
- 9) Qiang JK, et al : Plasma apolipoprotein A1 as a biomarker for Parkinson disease. *Ann Neurol* 74 : 119-127, 2013.
- 10) Fujimaki M, et al : Serum caffeine and metabolites are reliable biomarkers of early Parkinson disease. *Neurology* 90 : e404-411, 2018.