

進行性核上性麻痺 (PSP)の バイオマーカー開発

鳥取大学医学部医学科

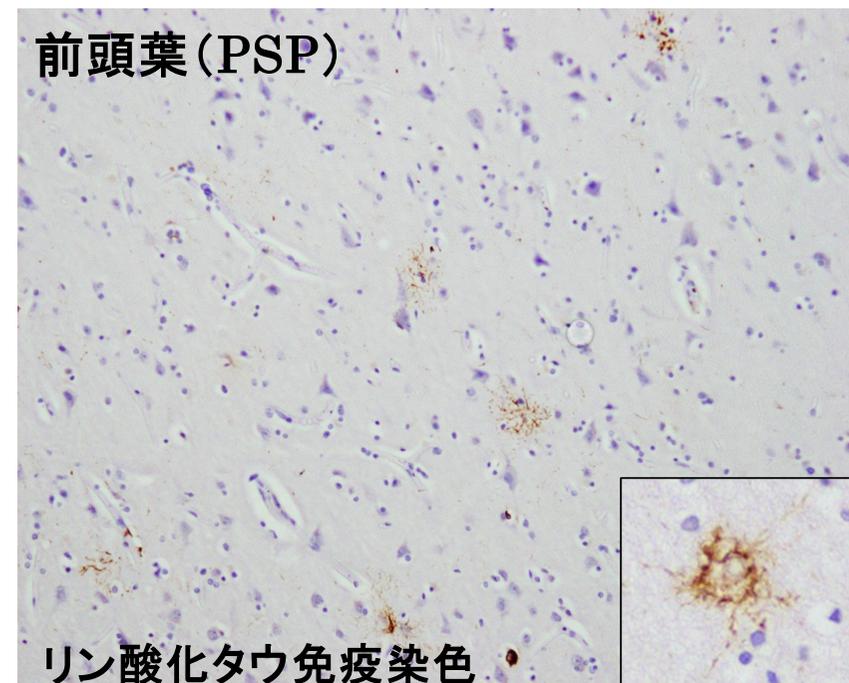
脳神経医科学講座脳神経学内科分野

講師 瀧川 洋史

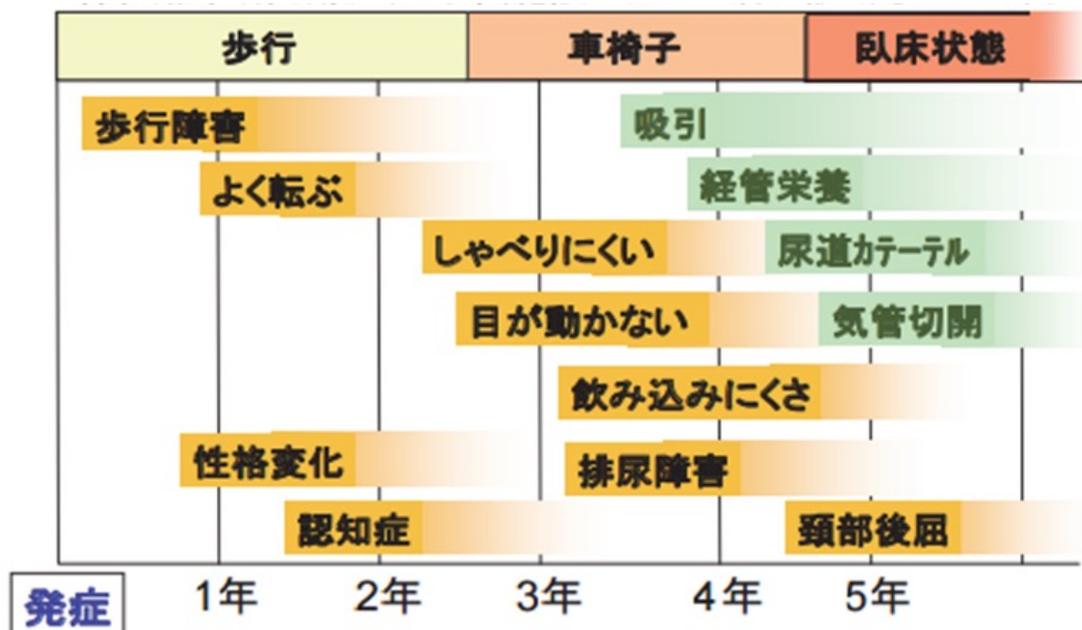
2024年3月5日

進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP)

- Steele, Richardson, Olszewski博士によって報告された(1963年).
- 50歳以上で発症し, 核上性注視麻痺, 頸部・躯幹の筋強剛, 易転倒性, 認知症を認めるパーキンソン症候群のひとつ.
- 多彩な臨床像を呈することが明らかとなってきた.
- 確定診断は病理学的な検索による
 - ✓ 神経細胞の変性・脱落, 組織の粗鬆化, グリアやグリア線維の増殖.
 - ✓ 脳内へのタウタンパクが蓄積.
 - ✓ タウ封入体であるtuft-shaped astrocyte (房状星細胞)出現.
- 根治療法はなく, 対症療法による治療が行われている.
- 指定難病(特定疾患)対象に認定(2003年).
- 介護保険特定疾病に指定(2006年).



PSPの経過



* 各項目の左端は平均出現時期を示す

* 各項目の左端は平均出現時期を示す

罹病期間: 5~9年

神経臨床研究湯浅班・班員施設において病理診断された17例

PSPの疫学

➤ 鳥取県米子市での疫学調査

- ✓ パーキンソン病よりやや高齢で、60歳以降の発症が多い。
- ✓ 原則として遺伝はしないと考えられている。
- ✓ 推定患者数：**約22000人**



<https://www.city.yonago.lg.jp/33693.htm>

報告者 (報告年)	調査年	患者数 (男/女)	発症年齢 (歳)	有病率 (/10万人)	全国訂正 有病率 (/10万人)
Kawashima (2004)	1999-2002年	8 (6/2)	71.4±6.6	5.82	5.03
Takigawa (2016)	2009-2014年	20 (7/13)	73.6±7.0	17.90	17.26

- 法医解剖が行われた998例を対象に検討したところ29例(男性11例)においてNINDS-PSPの病理診断基準を満たした(全例中**2.9%**、60歳以上中4.6%)。
- 全ての症例で生前にはPSPの診断は受けておらず、日常生活能力は維持されていた。
- 14例(48.3%)では認知症、11例(37.9%)では抑うつ、16例(55.2%)では歩行障害を呈していた。
- 転倒などによる事故死例16例、自殺例11例はPSP病理との関連が疑われた。

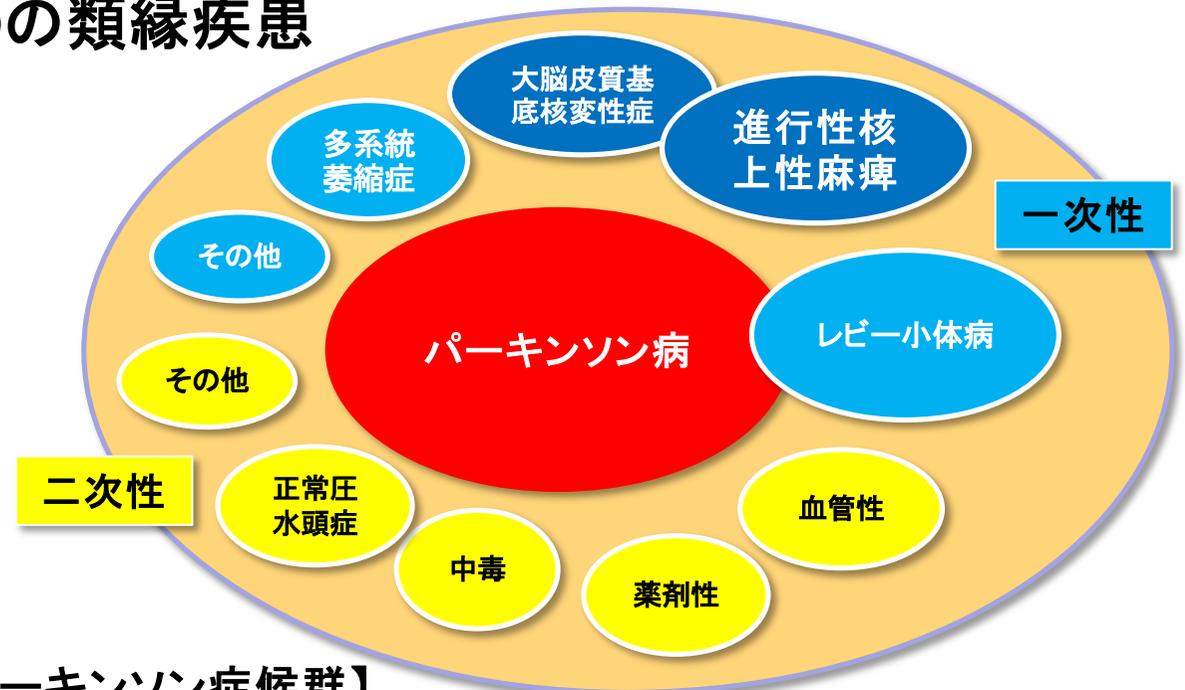
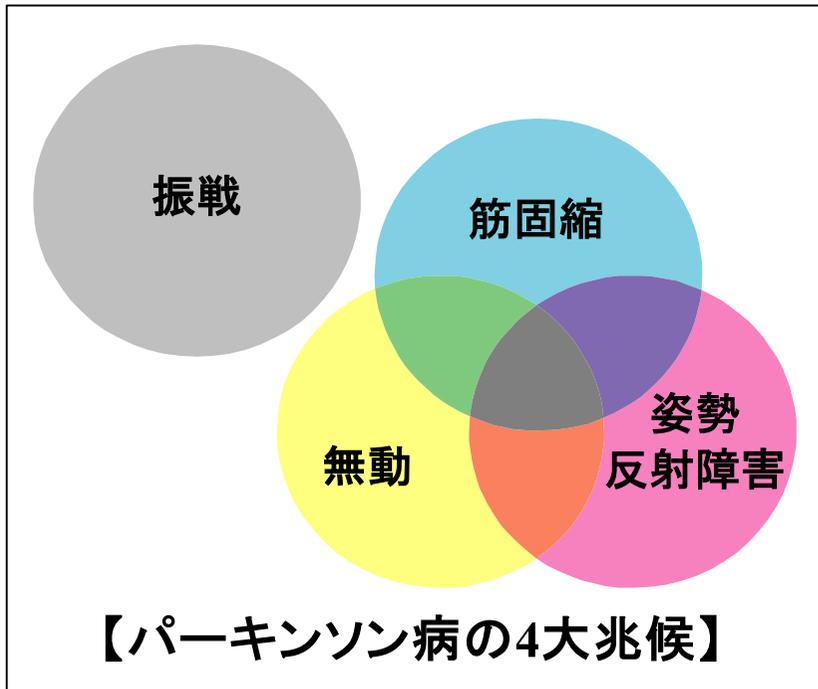
(Yoshida K, 2017)



潜在的なPSP症例はより多い

症候学：PSPはパーキンソン症候群のひとつ

- ◆ パーキンソン病 (PD)
 - ✓ 1817年に英国のJames Parkinson博士により初めて記載された。
 - ✓ 主に50歳以降に発症し、ゆっくり進行する。
 - ✓ 4大徴候 (**振戦**, **無動**, **筋強剛**, **姿勢反射障害**)
 - ✓ 原因不明, 脳の一部の神経細胞が変性・脱落する。
 - ✓ 一般に遺伝性は認めない(約5%: 常染色体優性or劣性遺伝性)。
- ◆ パーキンソン症候群 (PS) はPDの類縁疾患
- ◆ **PSPはPSのひとつ**。

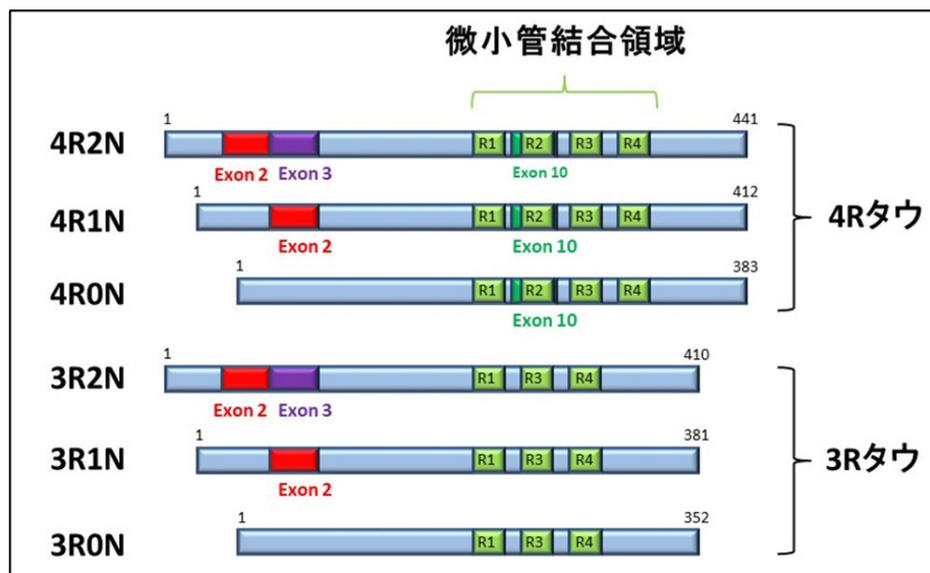


【パーキンソン症候群】
安静時振戦, 筋強剛, 無動, 姿勢反射障害のうち2つ以上の症状があるものの総称

生化学：PSPはタウオパチーのひとつ

- 神経変性疾患の多くは、タンパクの構造（コンフォメーション）の異常が発症メカニズムに起因している。
- PSPは神経変性疾患のひとつであり、神経細胞内、グリア細胞内にタウタンパクが蓄積するタウオパチーに分類される。
- タウタンパク
微小管結合蛋白
細胞の安定化に関与

タウタンパクの6アイソフォーム



神経変性疾患と異常タンパク質

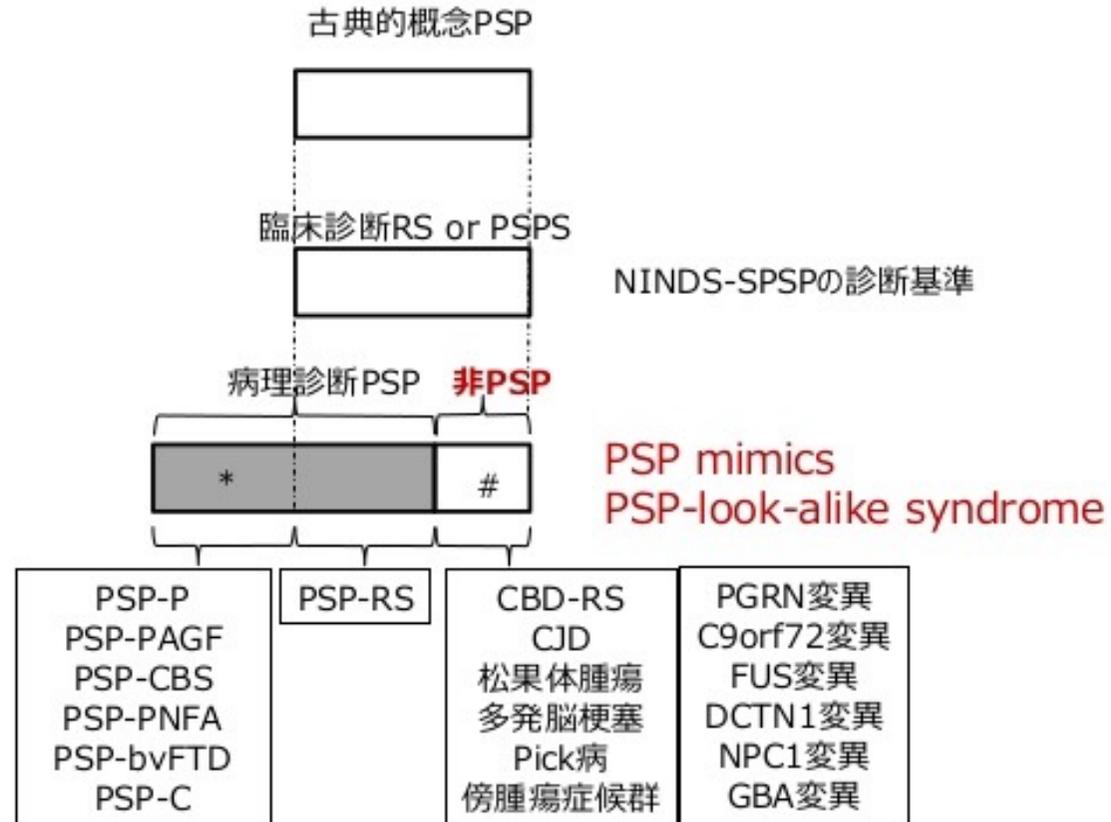
蓄積するタンパク	疾患名	病理所見	
タウ	4リピート	PSP CBD	tufted astrocyte astrocytic plaque
	3リピート	Pick病	Pick body
	3+4リピート	アルツハイマー病	NFT, dystrophic neurite
		パーキンソン病 レビー小体型認知症 多系統萎縮症	Lewy body Lewy body glial cytoplasmic inclusion
TDP-43	筋萎縮性側索硬化症	skein, round inclusion	
アミロイド	アルツハイマー病	senile plaque	
ポリグルタミン	ポリグルタミン病 (ハンチントン病など)	polyglutamine	

PSP-RSと7つの異型PSP症候群

臨症亜型	臨床的な特徴
PSP-RS	古典的PSP(Richardson症候群)
PSP-P	パーキンソン病型
PSP-PGF	純粹無動症型
PSP-F	前頭葉認知症を主徴とした型
PSP-OM	眼球運動障害を主徴とした型
PSP-SL	言語障害を主徴とした型
PSP-CBS	大脳皮質基底核変性症型
PSP-IP	姿勢保持障害を主徴とした型

(Höglinger et al, Mov Disord, 2017)

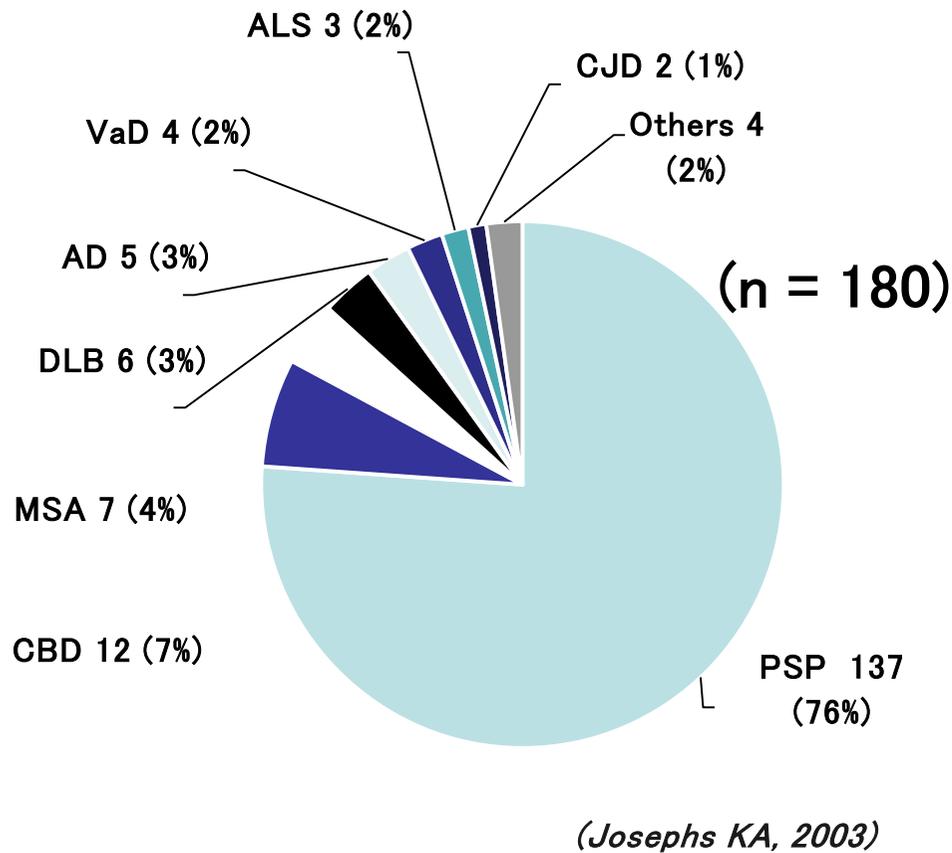
PSPの考え方の変遷



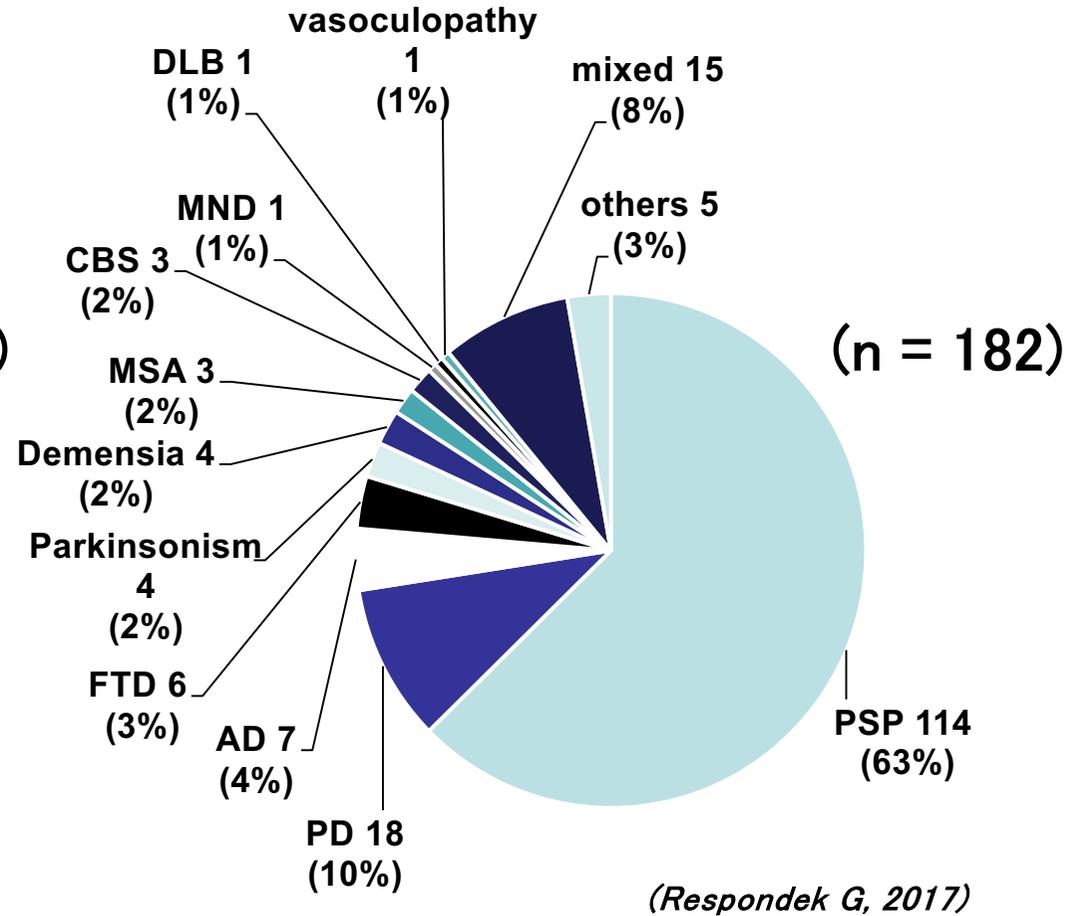
(下畑享良)

PSPの臨床診断と病理診断の解離

臨床診断PSPの病理診断



病理診断PSPの臨床診断



臨床診断基準の感度・特異度

(n = 129)

	感 度 (%)	特異度 (%)
初診時		
NINDS-SPSP	45.5	90.5
MDS	87.9	60.3
最終受診時		
NINDS-SPSP	71.2	60.3
MDS	98.4	22.2

(Ali F, 2019)

NINDS-SPSP診断基準:

1996年に作成されたが、主にRSをターゲットとした基準であり十分ではなかった。

MDS診断基準:

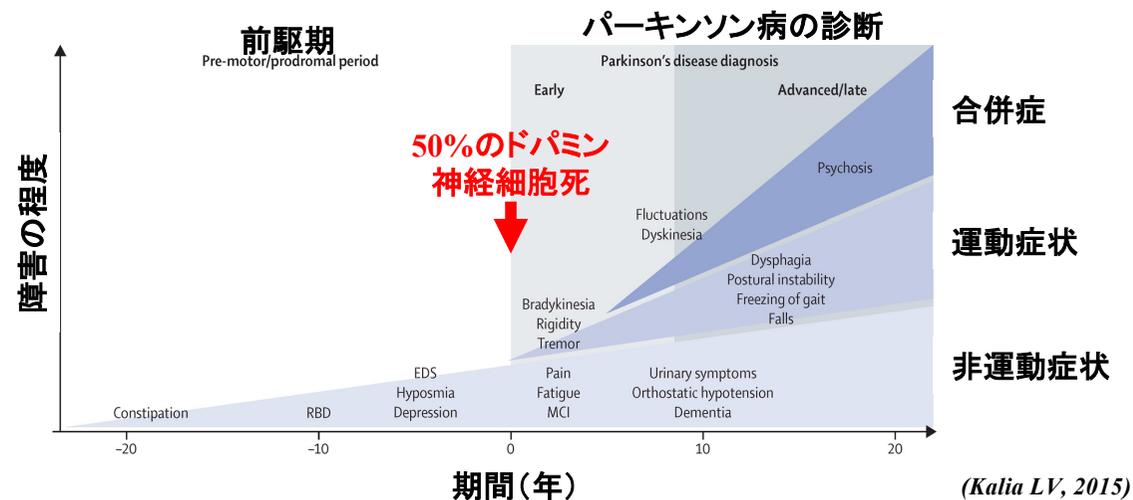
2017年に作成された診断基準で、PSPをより広く拾い上げることはできるが、特異度が低い。

神経変性疾患における疾患修飾薬の開発

- 神経変性疾患領域においては、疾患修飾薬の開発が進められている。
- PSPにおいても複数の治験が実施されているが、臨床的効果を示す薬剤の開発には至っていない。
- 薬剤開発を困難としている要因として発症早期からの臨床診断が不確実である点、薬剤導入時期が遅い点が指摘されている。
- 代表的な神経変性疾患であるパーキンソン病では、運動症状が出現した時点において主たる病巣である中脳黒質において約50%の神経細胞が変性していることが示されており、**発症早期における確実な臨床診断**、薬剤の導入が、疾患修飾薬の開発には必要不可欠である。

【バイオマーカー探索の意義】

- 発症早期における臨床診断
- 疾患の進行・治療効果判定
- 治験へのリクルート
- 病態の解明→新たな治療戦略



従来技術とその問題点

PSPの臨床診断は、臨床症候、画像検査、臨床経過、薬剤への反応性などによって行われるが、

多彩な臨床像のために感度・特異度が低い

発症早期からの診断が困難

等の問題があり、十分な臨床診断基準とされるに至るまでには至っていない。

質量分析による網羅的解析(CSF)-1

➤ 探索研究

✓ SELDI-TOF-MAS

- 探索研究1:PSP 8例, CTL 8例 (219 peaks → 24 peaks)
- 探索研究2:PSP 6例, PD 6例, CTL 6例 (24 peaks → 1 peak)

✓ LC-MS/MS

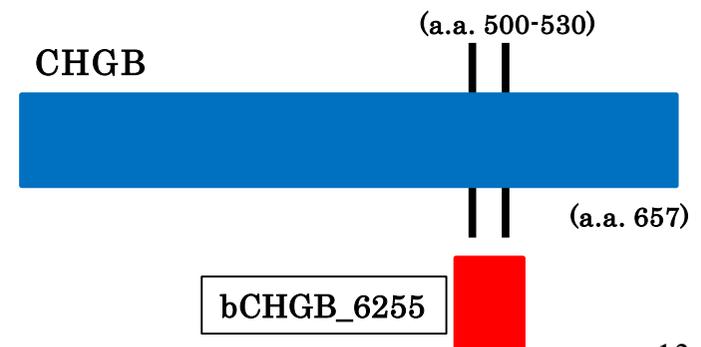
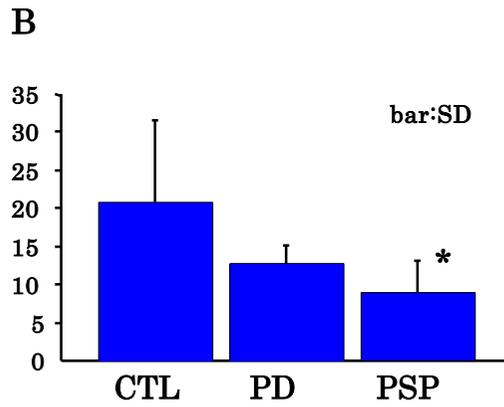
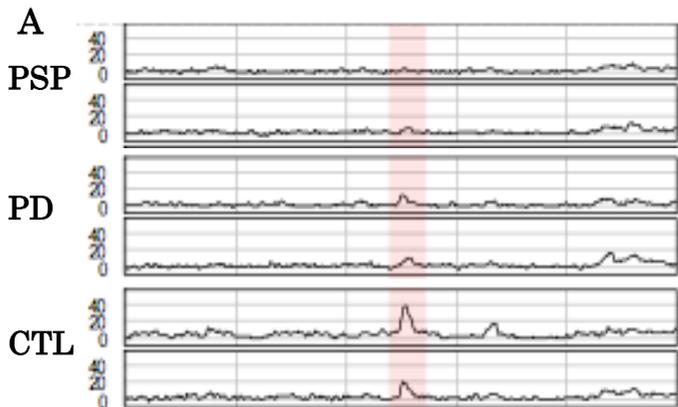
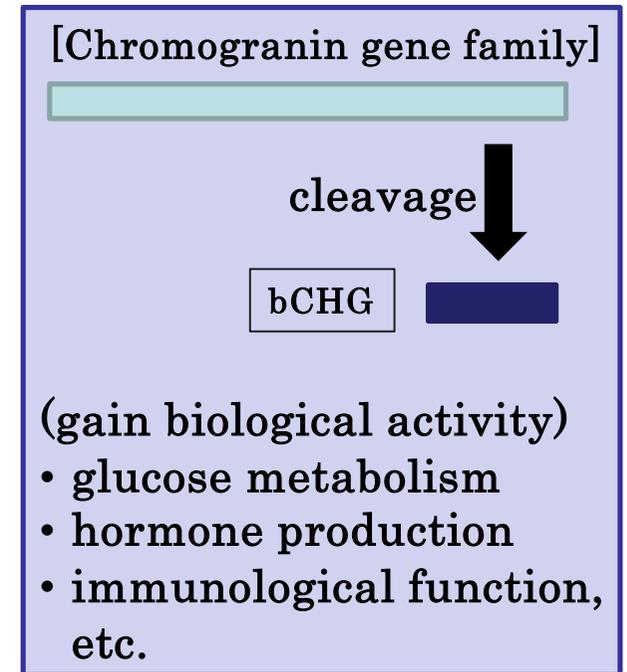
- **Chromogranin B (CHGB)**の一部 (bCHGB_6255)

➤ CHGBは, 神経細胞に広く分布する酸性可溶性分子であり, 神経分泌タンパクのひとつである.

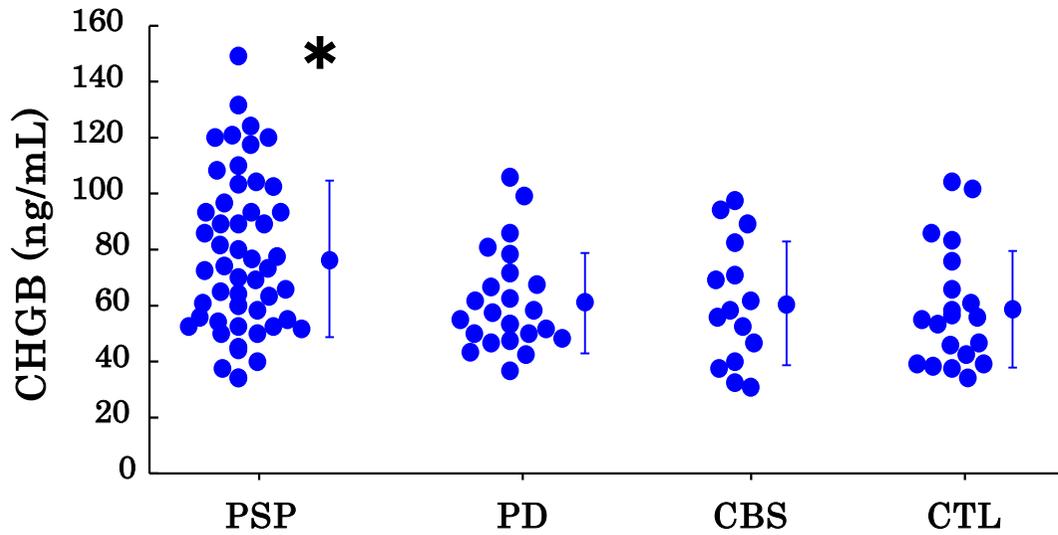
➤ 神経疾患の関連が報告されている.

- ✓ 家族性筋萎縮性側索硬化症: 遺伝子多型と発症時期
- ✓ 統合失調症: CSF中CHGB低値や遺伝子多型と疾患感受性
- ✓ 多発性硬化症: 病初期に増加し, 病期の進行とともに減少

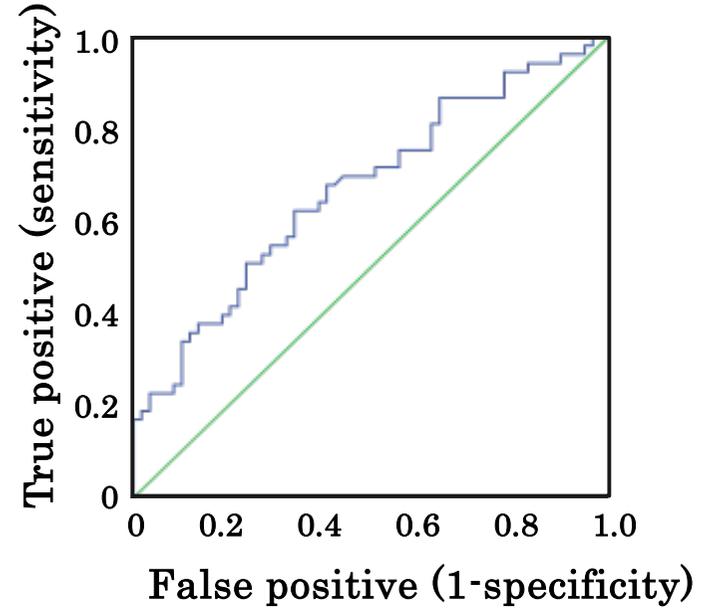
➤ CHGBを含めたchromogranin遺伝子族においては, 様々なペプチドが切り出され, 糖代謝やホルモン産生, 免疫系などに独自の生理活性を発揮する.



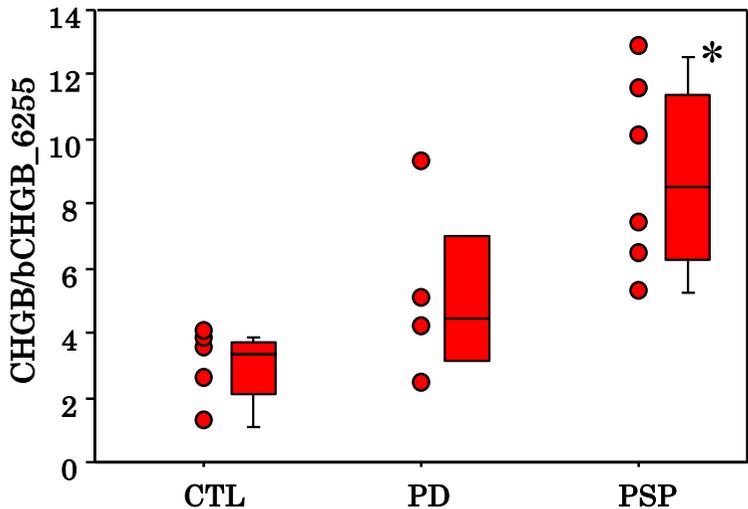
CSFのCHGBをELISA法で測定



ANOVA, post hoc,
*p < 0.05 : PSP vs PD, CBS vs control



統計学的な有意差は認めしたが、感度/特異度は低い。



Kruskal-Wallis test
*p = 0.0095, vs PD and CTL

CHGB/bCHGB_6255はPSP臨床診断に有用なバイオマーカーとなるか？

→ bCHGB_6255の同定・測定系確立が必要

質量分析による網羅的解析(CSF)-2

➤ ショットガンプロテオミクス

- ✓ 探索研究: PSP 4例, PD 4例, CTL 4例 (879 peaks)
- ✓ PSPに特異的な変化: CHGBを含めた **36 peaks**

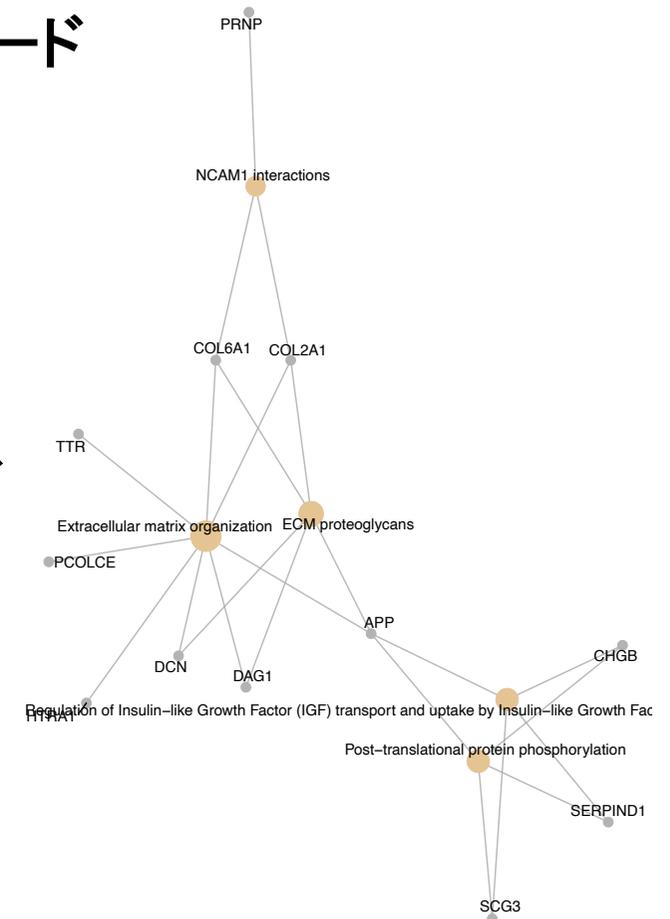
➤ パスウェイエンリッチメント解析

- ✓ 36種類の候補タンパク質の中から特定のカスケードに関連している分子を認めた.

パスウェイ	遺伝子
Extracellular matrix organization	TTR/COL6A1/COL2A1/PCOLCE/APP/DCN/HTRA1/DAG1
ECM proteoglycans	COL6A1/COL2A1/APP/DCN/DAG1
Post-translational protein phosphorylation	SERPIND1/APP/SCG3/ <u>CHGB</u>
NCAM1 interactions	COL6A1/COL2A1/PRNP

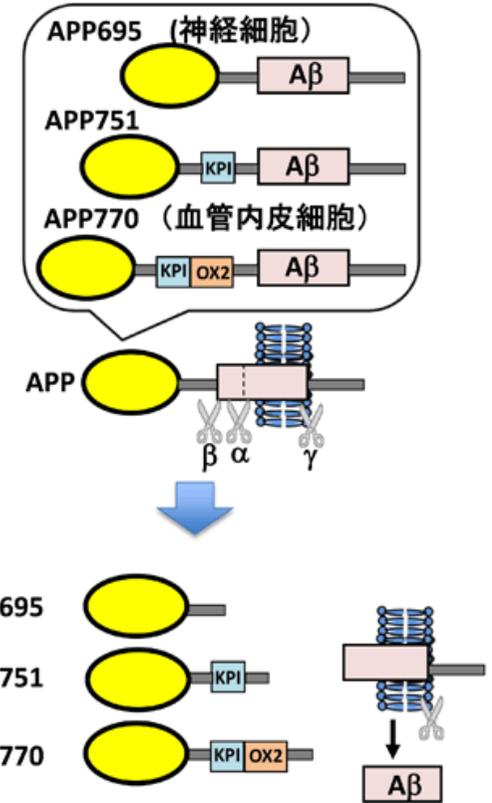
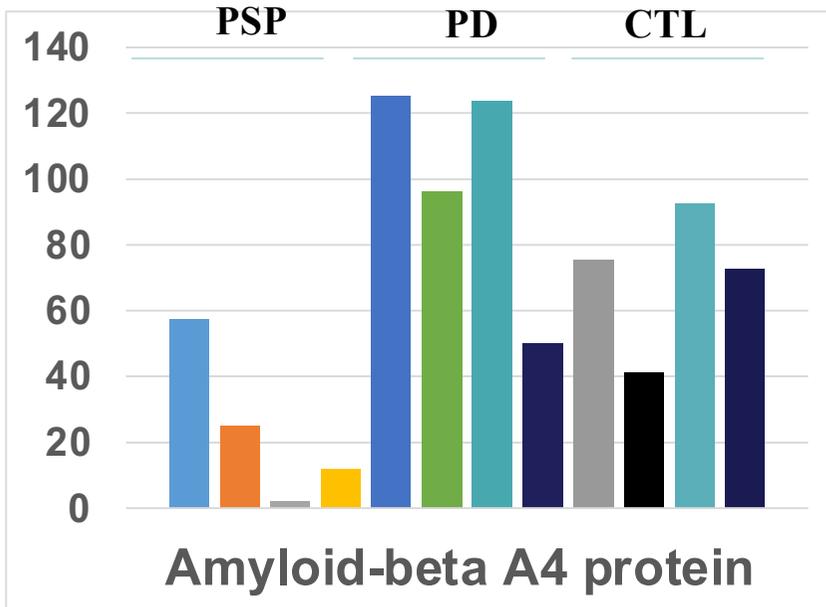
細胞外
マトリックス

タンパク
リン酸化



アミロイド前期タンパク質

- APPは細胞膜貫通型の糖タンパクであり、アルツハイマー病 (AD) 発症との関連が指摘されている。
- APPがβ部位で切断されると、続いてγ部位で切断されて神経毒性を持つAβが産生される。
- APPがα部位とγ部位で切断された場合、非病原的なp3ペプチドが産生される。
- APPには3種類の異なるスプライシングバリエント, APP695, APP751, APP770が存在する。
- APPは複雑な代謝経路を持ち複数のバリエントが存在する。

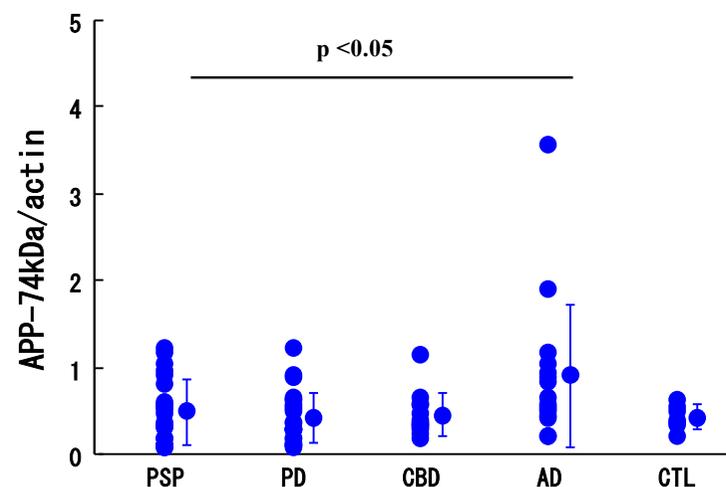
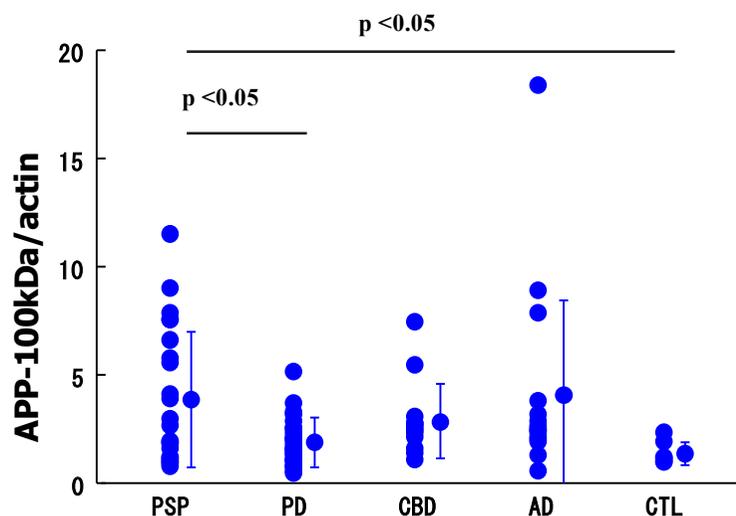


https://www.riken.jp/press/2012/20121011_2/index.html

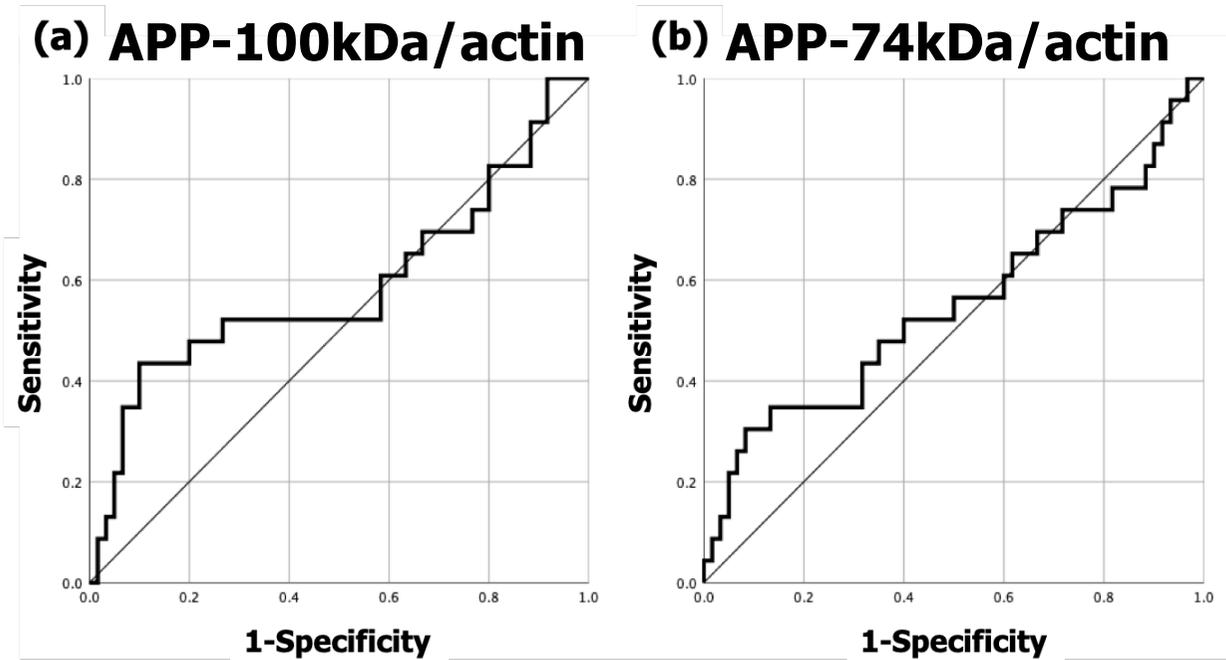
APP-variant検証研究

1. 脳脊髄液を対象に10% SDS-PAGEにて電気泳動を行い, APP-N-terminal antibodyにてWestern blottingを行った.
2. Image-Jにて各band, ならびに, β -actinのintensityを測定し, 比を計算した.
3. PSPをreferenceとして年齢性別を補正した重回帰分析を行い, 危険率5%未満を有意とした.

	PSP	PD	CBS	AD	CTL
n (M / F)	23 (13 / 10)	24 (11 / 13)	13 (4 / 9)	16 (3 / 13)	7 (3 / 4)
Age (mean \pm SD)	74.4 \pm 6.2	70.3 \pm 8.4	73.2 \pm 7.0	71.0 \pm 9.8	70.3 \pm 19.4



候補APP-variant/actinに関するROC解析



	APP-100kDa /actin	APP-74kDa /actin
AUC	0.588	0.551
Sens.	0.435 (10/23)	0.348 (8/23)
Spec.	0.900 (54/60)	0.867 (52/60)
PPV	0.625 (10/16)	0.500 (8/16)
NPV	0.806 (54/67)	0.776 (52/67)

ROC解析では感度は低いが、特異度は高い。
より多数例での検証, APP-74kDa, APP-100kDaの同定が望ましい。

microRNAの探索

- microRNA (miRNA) は21-25塩基長の1本鎖RNA分子であり真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与している。
- ヒトゲノムには1000以上のmiRNAがコードされていると考えられており、miRNAはその標的mRNAに対して不完全な相同性をもって結合し、一般に標的遺伝子の3'UTRを認識して、標的mRNAを不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制する。
- miRNAが介する転写抑制は、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは代謝といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られている。

探索研究

(miRNA array)

- ・検体: 血清由来miRNA
- ・対象: PSP 5, CTL 5
- ・解析miRNA: 2566個



8個のmiRNAsに
有意差あり

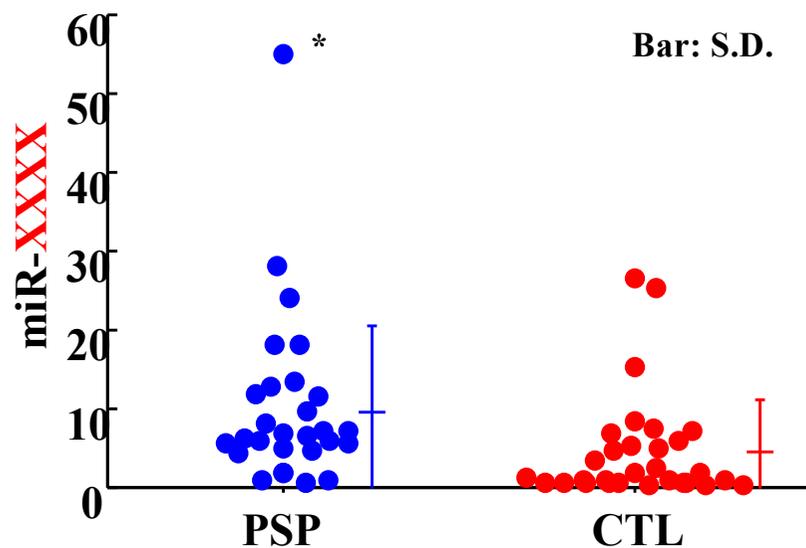
検証研究

(RT-qPCR)

- ・検体: 血清由来miRNA
- ・対象: PSP 30, CTL 30
- ・解析miRNA: 8個

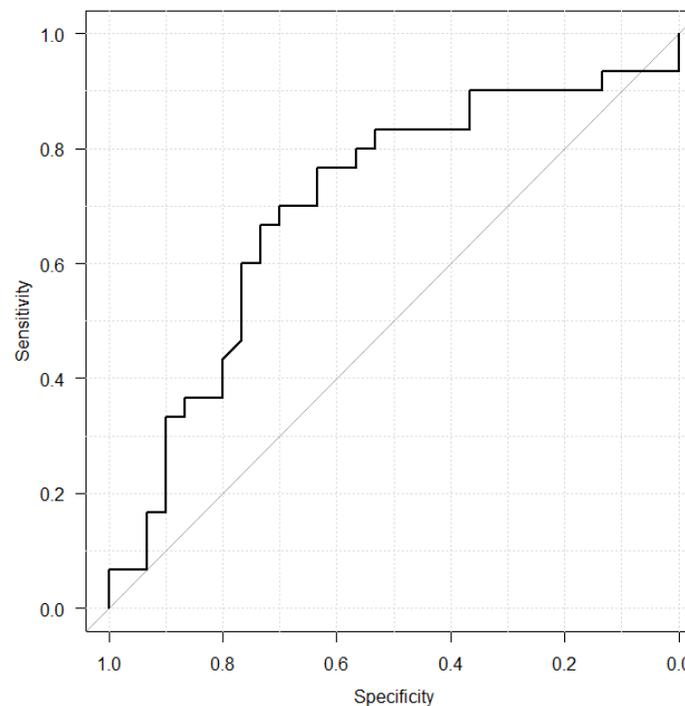
microRNA候補

RT-PCRの結果



ANOVA, age and gender adjusted
* $p < 0.05$

ROC解析



カットオフ値: 5.02

感度: 70.0%, 特異度: 70.0%, AUC: 0.701

初診時の臨床診断基準による既報

感度: 87.9%, 特異度: 60.3%

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来の問題点であったPSP診療の確定診断は死亡後の病理学的検索によらなければ至らなかつたことが、本技術によって生前の臨床診断精度を改良することを可能とすることが期待される。
- 本技術は、血液や脳脊髄液を用いた検査であり、低コストで繰り返し検証することが可能になることが期待される。

想定される用途

- PSP発症の早期からの臨床診断の精度が向上することが期待される。低コストで繰り返し検証できることでメリットが大きいと考えられる。
- 上記以外に、治験のエントリー基準に応用されることが期待される。
- また、新たな治療標的となる可能性もあると思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、CHBGの測定系について、確立しているが、bCHGB_6255について同定、測定系の確立の点が未解決である。
- APPについては、より多数例での検証実験、同定を進める必要がある。
- miR-XXXXについては、多数例での検証実験、分子生物学的な解析が必要である。

企業への期待

- 未解決のbCHGB_6255の同定について、タンパク質解析の技術を持つ企業との共同研究を希望します。
- 全てのバイオマーカー候補について、神経疾患領域における体外検査薬の開発を考えている企業との共同研究を希望します。
- また、miR-XXXXについては、PSPに対する新規治療薬分野への展開を考えている企業との共同研究を希望します。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 進行性核上性麻痺の診断マーカー
 - 出願番号 : 特願2021-107575
 - 出願人 : 鳥取大学
 - 発明者 : 瀧川洋史、花島律子、中島健二
-
- 発明の名称 : 進行性核上性麻痺の診断マーカー
 - 出願番号 : 特願2022-074987
 - 出願人 : 鳥取大学
 - 発明者 : 瀧川洋史、花島律子

お問い合わせ先

国立大学法人鳥取大学
研究推進機構 研究戦略本部

TEL 0857 - 31 - 5546

FAX 0857 - 31 - 5571

e-mail sangakucd@ml.cjrd.tottori-u.ac.jp