

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学Ⅱ研究室

職・氏名 講師・柳田 寛太

研究テーマ：A β の貪食能をモニターするアルツハイマー病の早期病態バイオマーカーの開発

研究期間：

2024 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 (大阪医科薬科大学・薬学部・柳田 寛太・講師)

研究分担者 (大阪医科薬科大学・薬学部・福森 亮雄・教授)

<共同研究機関>

研究代表者 (高知大学・医学部・數井 裕光・教授)

研究目的：

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は、脳内におけるアミロイド β (A β) の凝集および蓄積により発症すると考えられている。A β 凝集体はミクログリアによって貪食・分解されるため、若年期には脳内への蓄積は認められない。しかし、加齢に伴いミクログリアの貪食能が低下することでA β が蓄積し、ADの発症に至るとされている。

現在、A β を標的とした抗体医薬としてレカネマブおよびドナネマブが臨床応用されている。これらはA β と結合することでミクログリアによる貪食を促進し、脳内A β 量を減少させると考えられている。一方で、A β は臨床症状が現れる約20年前から蓄積し始めることが明らかとなっている。そのため、神経細胞障害が進行し症状が発現した後にA β を除去しても、認知機能の回復は困難であり、治療効果は進行抑制にとどまる。したがって、抗A β 抗体の投与は、ミクログリアの貪食能が低下し、A β の蓄積が始まる時期に実施することが望ましい。本研究では、ミクログリアの貪食能低下を反映する分子を脳脊髄液 (CSF) から探索し、抗A β 抗体療法の開始時期を判断するバイオマーカーとなり得るかを検討した。

研究内容および研究成果：

本研究では、ミクログリアの貪食能低下を反映するバイオマーカー候補として、I型膜貫通タンパク質から産生されるA β 様ペプチド (以下、 β ペプチド) に着目した。A β は β セクレターゼおよび γ セクレターゼによる連続的切断によって生成するが、他のI型膜貫通タンパク質においても同様の機構により β ペプチドが産生されると考えられる。これらのペプチドは20~50アミノ酸程度の短鎖であり、分解酵素に対して比較的安定であることから、脳脊髄液や血中に安定して存在する可能性がある。

β ペプチドの検出は、特異的抗体を作製した後、培養細胞上清およびヒト CSF から免疫沈降を行い、MALDI-TOF MS および Western blot 法により実施した。I 型膜貫通タンパク質は、まず α または β セクレターゼによって膜貫通領域近傍で細胞外ドメインが切断され（シェディング）、その後 γ セクレターゼにより膜内で切断されることで β ペプチドが細胞外へ放出される。この際、シェディングによる切断部位が β ペプチドの N 末端となるため、当該部位をエピトープとするポリクローナル抗体を作製した。

今回、ミクログリアに発現する I 型膜貫通タンパク質の中で、TAM 受容体ファミリー（Tyro3、Axl、MerTK）に着目した。TAM 受容体はリガンドである Gas6 を介して A β 凝集体の認識および貪食に関与し、さらに γ セクレターゼの基質であることが報告されている。このことから、CSF 中の TAM 受容体ファミリーの β ペプチド（TAM β ）の減少が、ミクログリアによる A β の貪食能の低下を反映している可能性があると考えた。

まず、Tyro3 由来 β ペプチドの解析を行った。 γ セクレターゼ活性欠損細胞（PSKO HEK）に FLAG タグを付加した Tyro3 を発現させたところ、シェディングによって生成した C 末端断片（CTF）の蓄積が Western blot 法により観察された。さらに、C 末端欠損体（Tyro3 Δ C）を用いた CTF の MALDI-TOF MS 解析により、3 か所のシェディングによる切断部位を同定した。

次に、Tyro3 由来 β ペプチド（Tyro3 β ）に対するポリクローナル抗体を作製し、Tyro3 発現細胞の培養上清から免疫沈降後、MALDI-TOF MS 解析を行った。その結果、 γ セクレターゼにより膜内で切断されて生成した 9 種類の Tyro3 β を同定した。

続いて、Axl 由来 β ペプチド（Axl β ）の解析を行った。Tyro3 と同様に Axl β に対するポリクローナル抗体を作製し、Axl 発現細胞の培養上清から Axl β を免疫沈降後、MALDI-TOF MS で解析することにより 10 種類の Axl β を同定した。

現在、AD 患者および正常圧水頭症患者の CSF を用いて、Tyro3 β および Axl β の検出を進めている。さらに、サンドイッチ ELISA 等による定量系の確立を目的としてモノクローナル抗体の作製を行い、対応するハイブリドーマの樹立に成功している。加えて、Trem2 などのミクログリア関連分子についても抗血清を作製し、 β ペプチドの同定を進めている。今後は、これらの中からバイオマーカーとして最適な分子の選定を行う予定である。

成果発表：

<原著論文>

- ・
- ・

<学会発表>

- ・ TAM 受容体 Tyro3 の段階的切断とその代謝機構の解析

柿原 光希、高嶋 結衣、山口 敬子、金宗 潤、柳田 寛太、福森 亮雄

日本薬学会第 145 年会 3 月 29 日

- ・ 受容体型チロシンキナーゼ Tyro3 から放出される新規小ペプチド断片の検出

真木 芙美香、柿原 光希、高嶋 結衣、高木 陽子、福永 幸祐、徳山 聖祐、山口 奈央、金宗 潤、山口 敬子、柳田 寛太、福森 亮雄

日本薬学会第 146 年会 2026 年 3 月 28 日

- ・ 受容体型チロシンキナーゼ Axl から放出される新規小ペプチド断片の検出

杉本 陽菜、高木 陽子、超智 翔太、長谷 萌花、徳山 聖祐、福永 幸祐、山口 奈央、山口 敬子、

金宗 潤、柳田 寛太、福森 亮雄
日本薬学会第 146 年会 2026 年 3 月 29 日

<その他>

- ・
- ・