

た。本稿ではADおよびMCIのバイオマーカーについての現状とタンパク質マーカーの解析ならびにpeptidomics（ペプチドミクス）解析によるバイオマーカー探索について述べる。

2. Omics（オミックス）解析

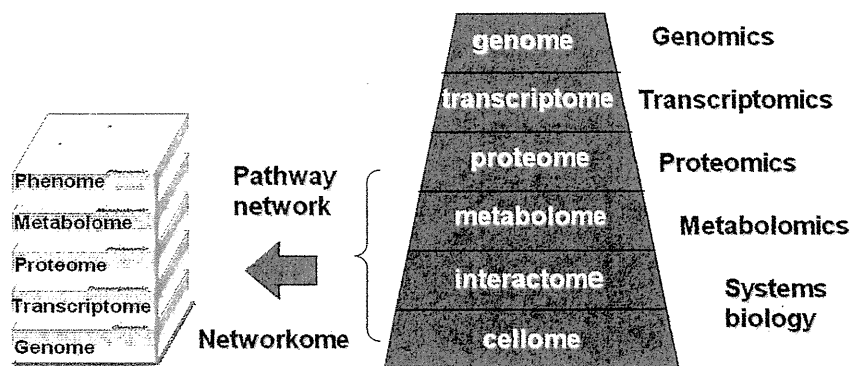
最近、Omics（オミックス）解析が生命科学の分野で注目されている。オミックス情報とは、生命から得られる網羅的分子情報であり、図1に示すような複数のレベルにおけるオミックス情報を統合したものである。従来、病気の診断名は、臨床情報（症状）を統合して分析、分類・命名されたものであり、病態の分子基盤についての情報から分類されたものではない。がんでは病理によって明らかなった組織形態から病型进行分类している。オミックス解析によって、115例の乳がん組織の534の遺伝子発現パターンをもとに分類しなおし、これらの分子情報が個々のがんの臨床における表現型に近いことを示した報告がある（Sorlie et al., 2003）。われわれは、DNAコピー数解析（Genomics）と遺伝子発現解析（Transcriptomics）によりがんの新規分子標的の同定を行ってきた（Kojima et al., 2010）。最近では、統合オミックス解析によって、1個人を時系列で解析し、健康状態や病態をモニター・評価する試みが報告されており、integrative personal omics profile (iPOP) と呼ばれている（Chen et al., 2012）。このように生命から得られる網羅的分子情報を基盤として疾患概念そのものを再構築することにより、予防・

治療への道が開くことが期待されている。

統合失調症をはじめとして精神神経疾患については、臨床症状をもとに分類されたものであり、病態についての分子基盤がわかっているものはほとんどない。ADはAβが、脳組織に蓄積する病態であり、糖尿病が血液中の高血糖をもって診断されるように、脳内での高Aβ状態をひとつの病態とすることも考えられるが、Aβの蓄積があっても認知機能が正常であるものもあり、またAβの蓄積だけで認知機能の低下を説明できないことから、認知症においてもオミックス解析による詳細な分子病態の解明が待たれる。

バイオマーカーは病態に連動して変化する生体情報および発症のリスクなどと関連する生体情報であり、必ずしも発症機構などの分子病態に関与する分子である必要はなく、サロゲートマーカーのように、臨床上の決定を行う上で有用な生体情報であればよい。臨床情報、心理テスト、画像情報、血液中のタンパク質や代謝物、遺伝子の変化などすべてバイオマーカーとしての可能性がある。遺伝子のポリモルフィズムもバイオマーカーとして有用である（Alzgene database (<http://www.alzgene.org/>))（Bertram et al., 2007）。

従来の臨床検査で用いられているタンパク質は、肝機能障害を示すトランスアミナーゼのように有用ではあるが、病気に早期に変化するものではない。また臨床では検査対象になっているタンパク質は、その翻訳後修飾の状態やプロテアーゼによる活性化（断片化）などを区別して測定されてはならず、研



オミックス医療研究会資料より転載。

図 1

究レベルでの解析と比べておおざっぱな調べ方である。これは実用性という観点から、生物学的意義の高さや臨床有用性以外のファクターとして検査のコストと分析スループットが重視されるためである。オミックス解析による網羅的かつ詳細な分析によって、タンパク質の多様性を利用した新しい有用な診断バイオマーカーが同定され、それらのアッセイ開発により、従来は難しいと思われていた疾患の早期診断に役立つ検査の実現が期待される。

3. 横断研究と縦断研究による バイオマーカー探索とバリデーション

バイオマーカーの臨床有効性を検証するための臨床研究は、多施設が参加する横断研究と、地域の住民の協力をもとに発症前から発症にいたるまでに時間軸で個々の症例を解析する縦断研究がある。われわれは、筑波大学を中心に多施設が参加する横断研究と利根プロジェクトと称している茨城県利根町における縦断研究によって、MCIならびにADのバイオマーカー探索とバリデーションを行っている。朝田らは、縦断研究として2001年度から65歳以上を対象に、認知症の有病率の調査（ADなどの認知症とMCIの診断）、その後の3年ごとの追跡調査、さらに「栄養・運動・睡眠」による予防介入を行ってきた。2003年、2005年、2008年、2011年、2012年に追跡調査を行い、認知機能健常者（NDC）が時間とともに認知機能健常を維持する状態、健常からMCIや認知症に至る過程の血清を採取している。追跡調査では、「記憶、注意、言語、視空間認知、類推」の五つの分野（5-Cog examination）を調べる。2次調査としてMMSE、問診を行う。これにより認知機能が低下してくるMCI、ADの診断が正しくできる。時系列サンプルは縦断研究として、同じ年に採取したサンプルは横断研究（NDC vs. MCI, NDC vs. AD）として解析することができる。またこれらのデータを他のコホートの解析結果と比較することで、多施設臨床研究として診断バイオマーカーの臨床有効性を示す上での有用なデータとなる。

これまでの利根プロジェクトの成果として、認知

症、MCIの正確な有病率を明らかにし、*APOEε4*が危険因子であること、血漿の脂質である高密度リポタンパク質（HDL）が発症の予防因子であることなどが示されている。また、運動講座の実施によって、有酸素運動が認知症の予防に有効であることが明らかになってきている（Miyamoto et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Yasuno et al., 2012）。これらの予防の有効性についての検証は、国内外の研究グループでも証明されている。またサプリメントの一部も効果があるという動物実験やiPS細胞を用いた基礎研究の結果がでてきている（Kondo et al., 2013; Yahata et al., 2011）。これまでの成果をもとに認知症の予防を実現するための早期診断のための検査と介入の仕組みの実現が期待できる。

4. ADの病態とバイオマーカー

ADの発症機序には $A\beta$ が深く関与している（アミロイドカスケード仮説）（Hardy & Selkoe, 2002）。ADの発症する20年近く前から原因物質である $A\beta$ が凝集体を形成し、脳の中に少しずつ蓄積する。可溶性の $A\beta$ オリゴマーはシナプス毒性があり、神経細胞にダメージを与え、記憶や認知機能を担うシナプスを障害する（Balducci et al., 2010; Palop & Mucke, 2010）。 $A\beta$ によって障害をうけたシナプスの状態が病態の進行に関係すると考えられる。最近では、認知機能健常からADに至るまで、プレクリニカルAD、MCI due to AD、ADという臨床病理上のプロセスを経ると考えられている（図3）。プレクリニカル期やMCI期に介入することの重要性が示唆されている（Jack et al., 2011; Sperling et al., 2011）。

MCIやADに至る認知機能の低下は、 $A\beta$ の産生と排出（クリアランス）のバランスの異常が一つの要因にあると考えられる。アミロイドプレカーサプロテイン（APP）から産生された $A\beta$ は、脳内から髄液（CSF）に排出される。私たちの体には $A\beta$ が脳内に蓄積しないよう排除する仕組みやその毒性を弱める仕組みが備わっている。脂質代謝に関連するアポリポタンパク質や免疫における補体タンパク質、 $A\beta$ と結合してその作用を抑制するトラン

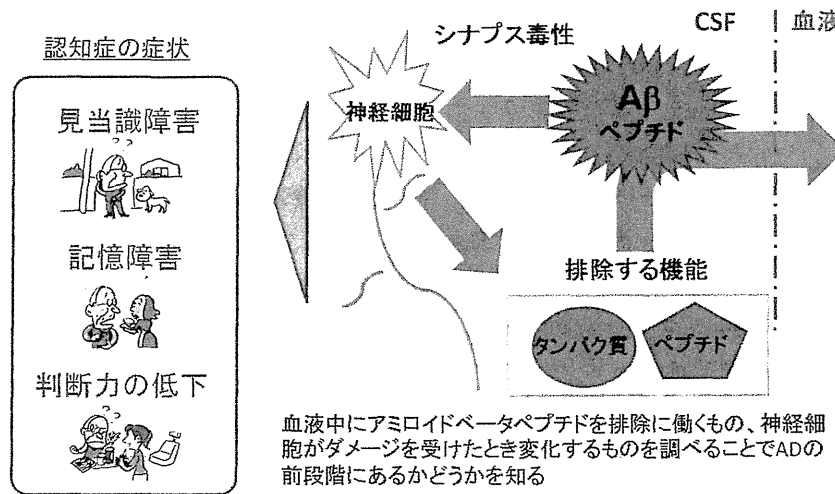
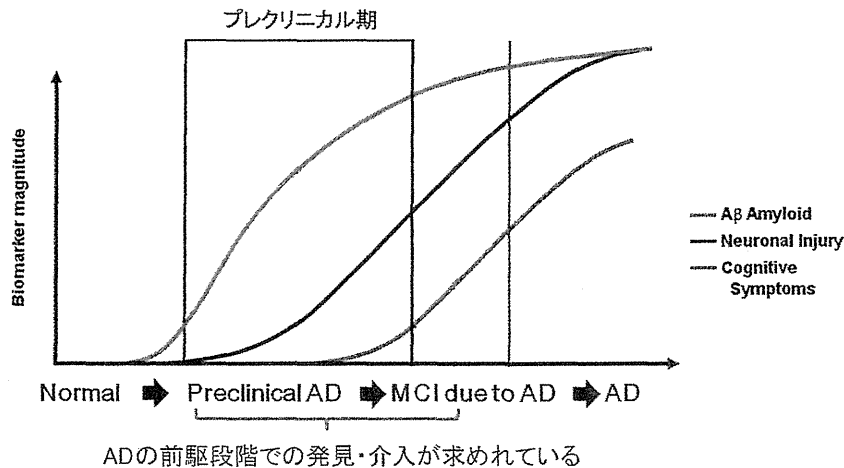


図 2



Ann Neurol. (2012) 71: 765–775

図 3

スサイレチン (TTR) などがこれに関係している (図 2, 4).

アポリポタンパク質の apoE, apoA1 および apoJ は、アミロドベータペプチドと結合してその凝集や毒性を防ぐといわれている (Ghisso et al., 1993; Koldamova et al., 2001; Paula-Lima et al., 2009). ApoE タンパク質は 299 アミノ酸残基の糖タンパク質で、その遺伝子型がアルツハイマー病の発症と関係している (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). ε2, ε3, ε4 の 3 つのアイソフォームがあり (APOE2, APOE3, APOE4), ε4 アレルを持たないものと比較

して ε4 アレルを 1 つもつものは、AD の発症のリスクが 2~3 倍, ε4 アレルを 2 つもつものは発症のリスクが 12 倍といわれている (Bertram et al., 2007; Roses, 1996). APOEε4 アレルに依存して CSF 中の Aβ の低下と脳内への蓄積が報告されている (Risacher et al., 2013; Vemuri et al., 2010). AD のリスクに対する apoE アイソフォームの主な効果は、Aβ 凝集および排除における違いと考えられている (Kim et al., 2009). ApoE は肝臓と脳で発現が高く、脳ではアストロサイトとミクログリアに発現が認められる。血漿 apoE はリポタンパク質のエン

ドサイトーシスのリガンドとして機能している。脳においてはHDLの構成成分は主にapoEである。アストロサイトとミクログリアで産生されたapoEは、アイソフォームに依存してすなわちE2>E3>E4のようにA β と結合し、受容体を介してエンドサイトーシスされる。さらに脳血流関門(BBB)を介した血流への移行に関与する。われわれの検討でも血液中のapoEは ϵ 4アレルに依存して低下することがわかっている。CSFや血液におけるapoEのレベルは、ADと健常人との間で有意な違いはない。

ApoA1は、血液中ではHDLの構成成分として細胞から肝臓へのコレステロールの輸送に働いている。ApoA1はHDLとは独立して心血管疾患のリスクを下げるといわれている。また抗炎症作用と抗酸化作用によって血管障害を防ぐといわれている(Barter et al., 2004)。ADではapoA1は脳組織とCSFでA β ならびにAPPと結合しており、A β の凝集とA β による毒性を抑制することが示されている(Koldamova et al., 2001; Paula-Lima et al., 2009)。ラットの海馬の培養系を用いてapoA1がA β の凝集を抑制し、A β による酸化ストレスと神経変性を防ぐことが示されている。さらにAPP/presenilin 1(PS1)トランスジェニックマウス(Tg)とAPP/PS1/APOA1 Tgマウスの比較によって、apoA1がA β によって誘導される炎症を抑制し、APP/PS1マウスにおける学習記憶機能レベルの低下を防ぐことが報告されている(Lewis et al., 2010)。臨床サンプルを用いた研究でADではapoA1の血漿レベルが低下していること、疫学研究によりapoA1はAD発症のリスクを下げる事が明らかになっている(Saczynski et al., 2007)。APOA1のポリモルフィズムとADの発症リスクの関連についての報告もある(Vollbach et al., 2005)。

ApoJタンパク質はclusterinとも呼ばれ、最近genome-wide association study (GWAS)によってその遺伝子CLUはAPOEについてADの発症リスクと関連していることが明らかになった(Lambert et al., 2009)。ApoJは75-80 Kdaの糖タンパク質で α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーとして存在する。427アミノ酸残基の前駆体タンパク質がプロテアーゼで切

断され、それぞれ40 kDaの α 鎖と β 鎖が5つのジスルファイド結合でヘテロダイマーを形成する(Yu & Tan, 2012)。ApoJは脳組織で産生され、ADをはじめとする脳神経疾患で発現が上昇する。ApoJは、A β の凝集を阻害し、BBBを介したA β の脳からの排出に働いている。APP tgのADマウスモデルでAPOEとAPOJをダブルノックアウトすると、A β とアミロイドプラークが増加しADの発症が早まったことから、apoJはapoEと強調してA β の脳からの排出や毒性の軽減にはたらいている可能性が考えられる(DeMattos et al., 2004)。

ADなど神経変性疾患は脳における炎症がその発症に関与しているといわれている。補体は20以上のタンパク質からなり、主に肝臓で産生され、自然免疫においてマクロファージによる異物の排除に必要なタンパク質である。補体タンパク質は通常は非活性化された血漿タンパク質である。補体の活性化に3つの経路があるが、いずれの経路でも最も量の多い補体タンパク質であるC3の分解が起こり、C3aとC3bに分解される。C3bは貪食細胞のレセプターCR1と結合することによりオプソニンとして作用する。CR1はADの発症に関わる遺伝子ポリモルフィズムとしてGWASで同定されている(Lambert et al., 2009; Crehan et al., 2012)。血漿C3についてはADでのあまりはっきりした量の変化は認められないが、CSF中のC3と補体因子HがADで上昇するという報告がある(Daborg et al., 2012)。しかしアッセイに使用しているELISAなどで、全長のC3を特異的に検出しているものは少なく、多くはC3bなど活性化断片もあわせて全体を検出しているため、また使用している抗体のエピトープのわからないものが多いためこれらの結果の解釈が難しい。

中枢神経系でも補体が産生され、補体系の活性化に必要なコンポーネントも備わっている(Morgan et al., 1997)。補体は脳組織においてもミクログリアやアストロサイトによるエンドサイトーシスに重要であり、A β オリゴマーは補体の働きによって貪食作用によって排除される。この過程には補体C3、C4の活性化が必要といわれている。ADマウスモ

デルである APP トランスジェニックマウスにおいて C3 をさらにノックアウトすると、Aβ やアミロイドプラークが増強するという報告がある (Wyss-Coray et al., 2002). 最近、シナプスの再構築におけるミクログリアを介した synaptic pruning (シナプスの枝打ち) に C3 と補体レセプター CR3 が関与しており、正常の中枢神経系において不必要なシナプスを選択的にプルニングし、シナプスの可塑性に寄与していることが報告された (Schafer et al., 2012). 認知機能の低下との関連が興味深い。

トランスサイレチン (transthyretin; TTR) はプレアルブミンとも呼ばれ、ホモ 4 量体の 64 kDa のタンパク質で主に肝臓と脈絡叢で産生されている (Sousa et al., 2007). 血液中の TTR は低栄養や肝硬変など低下することから、臨床検査では栄養状態の評価に使われている。TTR は以前から AD のバイオマーカーとしても注目されてきた。1994 年に TTR は Aβ オリゴマーと結合してその凝集を阻害することが報告され (Schwarzman et al., 1994), さらに AD のマウスモデルで TTR が Aβ のシナプス毒性を抑制することが示されている (Buxbaum et al., 2008). 免疫組織染色で TTR は海馬のアミロイドプラークと共存していること、AD の脳組織に多いことが報告されている (Li et al., 2011; Stein et al.,

2004). TTR は AD 患者の CSF で低下することが報告されている (Sullivan et al., 1999; Schultz et al., 2010). また AD では血清 TTR レベルが低下するといわれている (Han et al., 2011).

このように、アポリポタンパク質や TTR は Aβ と結合してその毒性を抑制したり脳内から排出するいわゆる “sequester タンパク質” であり、その量や機能が低下することが AD の発症の背景にあると考えられる (Li & Buxbaum, 2011) (図 4).

5. プロテオミクスによるバイオマーカー探索

血清・血漿を用いたタンパク質の網羅的解析 (プロテオミクス) は、多量に含まれるアルブミンなど血漿タンパク質が網羅的解析を妨げるため、SDS-PAGE や LC-MS を用いたプロテオミクス解析によって ng/ml 以下で存在するバイオマーカーの探索はきわめて難しい。われわれは、タンパク質バイオマーカーを ‘Focused proteomics’ によって、低分子量タンパク質を ‘Peptidomics’ (後述) によって探索してきた。‘Focused proteomics’ では、横断研究と縦断研究の血清サンプルを用いて前述の “sequester タンパク質” に注目してその量の変化について調べた。正常の中枢神経系においては、“sequester タン

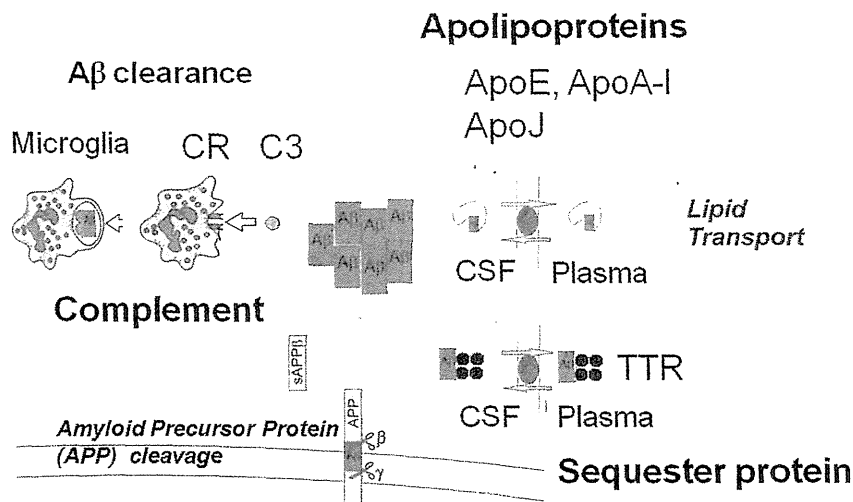
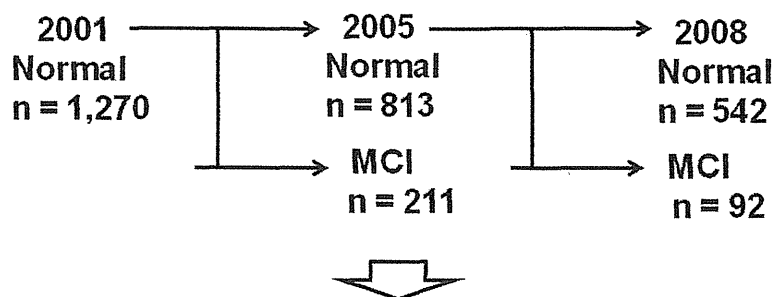


図 4

Numbers of participants in Tone cohort



Paired serum samples from Tone cohort

Group	2005	2008	Sample sets
NDC during follow up	NDC ⇒	NDC	20
NDC to MCI	NDC ⇒	MCI	15
MCI to stable MCI	MCI ⇒	MCI	9

図 5

パク質”による神経保護 (neuroprotective) 作用がもともと備わっており, Aβの神経 (シナプス) 毒性によるADの発症を抑制していること, 加齢によるこれらの神経保護タンパク質の量や機能の低下が, ADの発症のリスクを高めると考えている. 縦断研究の血清サンプルは貴重なため, これらのタンパク質の解析には, 少量のサンプルで多くのアナライต์が解析できる同時多項目イムノアッセイ Luminex 法を用いた. 縦断研究に用いた症例を図5に示す. 2001年からの調査のうち, 2005年と2008年の血清サンプルを用いた. 2001年のNDCを追跡調査し, 2005年と2008年の診断をもとに症例を選択した. Stable MCIとは, 2005年にMCIと診断され, 2008年もMCIであった症例を指している.

その結果, アポリポタンパク質をはじめとして, これらの“sequester タンパク質”はMCIの進行とともに減少することがわかった (表1). 横断研究においてもMCIで有意に減少するもの, MCIからADで有意に減少するものが認められた. TTR, apoA1, C3の臨床有効性については, NDC vs. ADにおいて receiver operating characteristic (ROC) 曲線における area under curve (AUC) 値がそれぞれ

表 1. 縦断研究と横断研究においてADおよびMCIで変動する血液中のタンパク質

Protein	Changes in MCI and/or AD
ApoE	decrease in MCI and AD
ApoA1	decrease in MCI and AD
ApoJ	increase in MCI and AD
C3	decrease in MCI and AD
C4	no change
Complement factor H	no change
A2-macroglobulin	no change
TTR	decrease in stable MCI and AD

0.73, 0.67, 0.83, NDC vs. MCIにおいて, 0.68, 0.65, 0.66であった. そのほかのタンパク質についても有意差は認められなかったが減少ないしは増加の傾向が認められた. さらにこれらTTR, apoA1, C3を用いて多重ロジスティック回帰を用いたマルチマーカーによる判別解析を行ったところ, NDC vs. ADにおいて感度92%, 特異度68%, NDC vs. MCIにおいて感度90%, 特異度50%の結果が得られた. さらにこれらのマーカーにMMSEの結果を加えると, NDC vs. ADにおいて感度100%, 特異度96%, NDC vs. MCIにおいて感度87%, 特異度82%となっ

た。以上の結果から、MCI および AD のスクリーニング検査として、 $A\beta$ と結合してその毒性の抑制や排出にかかわる “sequester タンパク質” を測定することは有用と思われる。これらのタンパク質の減少が結果的に認知機能の低下につながったと考えられるが、血液における変化が、CSF や中枢神経系にどのように影響しているのかは今後明らかにしていく必要がある。

6. ペプチドミクスによるバイオマーカー探索

われわれは、血液中の分子量 1 万以下の低分子タンパク質（ペプチド）は、認知症などの精神神経疾患において病変組織におけるタンパク質の生合成・分解の異常や生体反応を反映すると考え、NDC, AD, MCI, その他の認知症と他の精神神経疾患（うつ病など）の血清を用いて、疾患特異的に血中で検出されるペプチドを非標識 2D- μ LC-MALDI-TOF MS 法によるディファレンシャル解析で探索・同定し、これら AD・MCI バイオマーカーペプチドについて、複数のコホートからなる横断研究と 2001 年から継続する利根町コホートでの MCI 発症時系列血清を用いた縦断研究により臨床有効性のバリデー

ションを行った。探索方法は非標識 2D- μ LC-MALDI-TOF MS 法で、患者群ならびに NDC 群のそれぞれの識別タグ付きマススペクトルピークを、HPLC 画分番号と質量数で規定される空間でクラスタリングした。その後、各クラスター（ペプチド）で患者対健常人のディファレンシャル解析を行うもので、結果を ROC による医療統計解析を行い、ペプチドを AUC 値の大きい順にランク付けして自動的にリストアップする独自の解析ソフトウェアにより疾患バイオマーカーの同定ができるようになった（図 6）。バリデーションには iTRAQ 法（nanoLC-ESI-Qq-TOF）、タンデム四重極 UFLC-MS/MS (SRM/MRM) 法を用いた。ペプチドが由来するタンパク質の海馬組織、血清中の発現についても検討した。AD および MCI バイオマーカーペプチドは神経細胞由来、炎症関連タンパク質由来、アポタンパク質由来であり、一つのタンパク質から複数の断片が MCI で同じように上昇するものがあった。また横断研究と縦断研究の結果が一致したものがあり、NDC から MCI 発症で有意に血中量が変化した。これらのペプチドの中には、タンパク質レベルでも同様の変動を示したものもある。神経細胞由来の受容体タンパク質や細胞間マトリクスに由来するペプチ

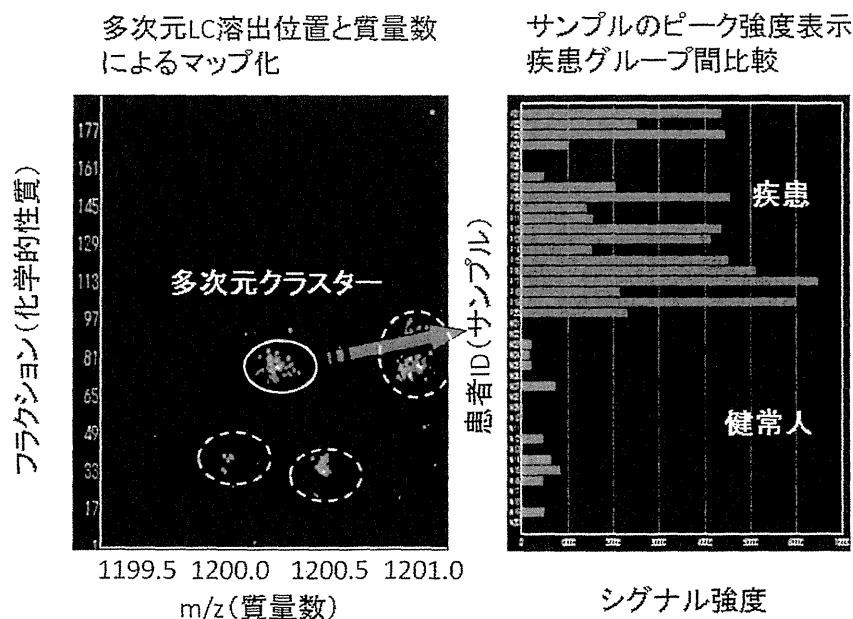


図 6

でも検出され、これらが、A β オリゴマーによるシナプス障害の程度を反映するかについて今後検討が必要である。

7. まとめ

認知症の予防にはその前駆段階からの早期の介入が効果的である。専門医による診断を受けるためにはまず自ら病院に行く必要がある。そのためには、健康診断のようなスクリーニング検査の導入が必要である。本稿で述べたA β によるシナプス障害を未然に防ぐ“sequester タンパク質”の量を調べることは、その量や機能低下が間接的に認知機能低下のリスクや状態を反映するという意味で有用と考えられる。さらにオミックス情報を最大限に活用してAD, MCIの発症、もしくは認知機能の低下におけるシナプス障害の程度を客観的に評価できるようなバイオマーカーを見出し、これを利用することで介入の効果などを評価することも可能になると考えられる。

文 献

- 朝田 隆 (2013) 都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応。厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）総合研究報告書
- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 2295-2300
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM (2004) Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 95 : 764-772
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39 : 17-23
- Blennow K, Hampel H (2003) CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2 : 605-613
- Buxbaum JN, Ye Z, Reixach N, Friske L, Levy C, Das P, Golde T, Masliah E, Roberts AR, Bartfai T (2008) Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of Abeta toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 : 2681-2686
- Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J, Jiang L, Lam HY, Chen R, Miriami E, Karczewski KJ, Hariharan M, Dewey FE, Cheng Y, Clark MJ, Im H, Habegger L, Balasubramanian S, O'Huallachain M, Dudley JT, Hillenmeyer S, Haraksingh R, Sharon D, Euskirchen G, Lacroute P, Bettinger K, Boyle AP, Kasowski M, Grubert F, Seki S, Garcia M, Whirl-Carrillo M, Gallardo M, Blasco MA, Greenberg PL, Snyder P, Klein TE, Altman RB, Butte AJ, Ashley EA, Gerstein M, Nadeau KC, Tang H, Snyder M (2012) Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell* 148 : 1293-1307
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261 : 921-923
- Crehan H, Holton P, Wray S, Pocock J, Guerreiro R, Hardy J (2012) Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology* 217 : 244-250
- Daborg J, Andreasson U, Pekna M, Lautner R, Hanse E, Mint-hon L, Blennow K, Hansson O, Zetterberg H (2012) Cerebrospinal fluid levels of complement proteins C3, C4 and CR1 in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 119 : 789-797
- DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Harmony JA, Aronow BJ, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2004) ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* 41 : 193-202
- Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B (1993) The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J* 293(Pt 1) : 27-30
- Han SH, Jung ES, Sohn JH, Hong HJ, Hong HS, Kim JW, Na DL, Kim M, Kim H, Ha HJ, Kim YH, Huh N, Jung MW, Mook-Jung I (2011) Human serum transthyretin levels correlate inversely with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 25 : 77-84
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297 : 353-356

- Jack CR, Jr., Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7 : 257-262
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63 : 287-303
- Kojima T, Shimazui T, Horie R, Hinotsu S, Oikawa T, Kawai K, Suzuki H, Meno K, Akaza H, Uchida K (2010) FOXO1 and TCF7L2 genes involved in metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49 : 379-389
- Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterova MI, Lazo JS (2001) Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry* 40 : 3553-3560
- Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H (2013) Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12 : 487-496
- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltnen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fievet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossu P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanche H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41 : 1094-1099
- Lewis TL, Cao D, Lu H, Mans RA, Su YR, Jungbauer L, Linton MF, Fazio S, LaDu MJ, Li L (2010) Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285 : 36958-36968
- Li X, Buxbaum JN (2011) Transthyretin and the brain revisited : is neuronal synthesis of transthyretin protective in Alzheimer's disease? *Mol Neurodegener* 6 : 79
- Li X, Masliah E, Reixach N, Buxbaum JN (2011) Neuronal production of transthyretin in human and murine Alzheimer's disease : is it protective? *J Neurosci* 31 : 12483-12490
- Miyamoto M, Kodama C, Kinoshita T, Yamashita F, Hidaka S, Mizukami K, Kakuma T, Asada T (2009) Dementia and mild cognitive impairment among non-responders to a community survey. *J Clin Neurosci* 16 : 270-276
- Morgan BP, Gasque P, Singhrao SK, Piddlesden SJ (1997) Role of complement in inflammation and injury in the nervous system. *Exp Clin Immunogenet* 14 : 19-23
- Palop JJ, Mucke L (2010) Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease : from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13 : 812-818
- Paula-Lima AC, Triccerri MA, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Oliveira FF, Magdesian MH, Grinberg LT, Panizzutti R, Ferreira ST (2009) Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents A β -induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 41 : 1361-1370
- Risacher SL, Kim S, Shen L, Nho K, Foroud T, Green RC, Petersen RC, Jack CR, Jr., Aisen PS, Koeppe RA, Jagust WJ, Shaw LM, Trojanowski JQ, Weiner MW, Saykin AJ (2013) The role of apolipoprotein E (APOE) genotype in early mild cognitive impairment (E-MCI). *Front Aging Neurosci* 5 : 11
- Roses AD (1996) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47 : 387-400
- Saczynski JS, White L, Peila RL, Rodriguez BL, Launer LJ (2007) The relation between apolipoprotein A-I and dementia : the Honolulu-Asia aging study. *Am J Epidemiol* 165 : 985-992
- Sasaki M, Kodama C, Hidaka S, Yamashita F, Kinoshita T, Nemoto K, Ikejima C, Asada T (2009) Prevalence of four subtypes of mild cognitive impairment and APOE in a Japanese community. *Int J Geriatr Psychiatry* 24 : 1119-1126
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74 : 691-705
- Schultz K, Nilsson K, Nielsen JE, Lindquist SG, Hjermland LE, Andersen BB, Wallin A, Nilsson C, Petersen A (2010)

- Transthyretin as a potential CSF biomarker for Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies : effects of treatment with cholinesterase inhibitors. *Eur J Neurol* 17 : 456-460
- Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK, et al. (1994) Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 8368-8372
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 8418-8423
- Sousa JC, Cardoso I, Marques F, Saraiva MJ, Palha JA (2007) Transthyretin and Alzheimer's disease : where in the brain ? *Neurobiol Aging* 28 : 713-718
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease : recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7 : 280-292
- Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, Johnson JA (2004) Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons : support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 24 : 7707-7717
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E : high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 1977-1981
- Sullivan GM, Hatterer JA, Herbert J, Chen X, Roose SP, Attia E, Mann JJ, Marangell LB, Goetz RR, Gorman JM (1999) Low levels of transthyretin in the CSF of depressed patients. *Am J Psychiatry* 156 : 710-715
- Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Knopman DS, Shaw LM, Trojanowski JQ, Aisen PS, Weiner M, Petersen RC, Jack CR, Jr. (2010) Effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 67 : 308-316
- Vollbach H, Heun R, Morris CM, Edwardson JA, McKeith IG, Jessen F, Schulz A, Maier W, Kolsch H (2005) APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann Neurol* 58 : 436-441
- Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, Masliah E (2002) Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 10837-10842
- Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, Kaneko T, Maruyama K, Saido TC, Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N, Inoue H (2011) Anti-Abeta drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One* 6 : e25788
- Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Hidaka S, Mizukami K, Asada T (2012) Effect of plasma lipids, hypertension and APOE genotype on cognitive decline. *Neurobiol Aging* 33 : 2633-2640
- Yu JT, Tan L (2012) The role of clusterin in Alzheimer's disease : pathways, pathogenesis, and therapy. *Mol Neurobiol* 45 : 314-326

Peripheral biomarker for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease

Kazuhiko Uchida¹⁾, Kohji Meno²⁾, Hideaki Suzuki²⁾, Hiroyasu Akazu³⁾, Katsuyoshi Mizukami⁴⁾, Takashi Asada⁵⁾

¹⁾Department of Molecular Oncology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

²⁾Research Division, MCBI, Inc.

³⁾Choju Medical Institute, Fukushima Hospital

⁴⁾Sports and Health Promotion, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba

⁵⁾Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

Alzheimer's disease (AD) is most common form of dementia. Mild cognitive impairment (MCI) due to AD is symptomatic pre-dementia phase. We have investigated proteins which are involved in sequestration from amyloid (A β) peptide, and also low molecular weight protein (peptide) biomarkers for MCI and AD. In peptidomics analysis, we developed technology and know-how to unmask molecular biomarker from high abundant plasma proteins and to quantify the amount of biomarker peptide with high reproducibility. In this review, we survey potential peripheral biomarkers for AD, and introduce our recent activity in omics-based biomarker discovery using highly evaluated clinical samples and data in both segmental and longitudinal study.

Address correspondence to Dr. Kazuhioko Uchida, Department of Molecular Oncology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba (1-1-1 Ten-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)

