

<特集「神経・精神疾患の基礎研究 Now」>

アルツハイマー病脳の空間マルチオミクス解析

池川 雅哉*, 外山友美子

同志社大学生命医科学部医生命システム専攻

Spatial Multi-omics Study of Postmortem Brains of Alzheimer's Disease

Masaya Ikegawa and Yumiko Toyama

Department of Life and Medical Systems, Doshisha University, Kyotanabe, Japan

抄 録

医学研究におけるマスマスペクトロメトリー (Mass Spectrometry: MS) の利用は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: MALDI) 法の開発により生体分子の中でも高分子に属するタンパク質・ペプチドの網羅的解析を可能にし、今日のプロテオミクスの発展に寄与した。さらに液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) や新たな解離法 (フラグメンテーション) を組み合わせた代謝物や脂質の網羅的解析の高深度化により生体組織由来の分子情報は爆発的に増加している。2023年12月から、我が国ではアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease: AD) 脳のアミロイド病変に根拠を置いた治療薬レカネマブの承認が行われ、その有効性や対象を検討する上でもバイオマーカー探索やバイオマーカー検出法の開発は急務である。最近では直接病理組織学的解析とオミクス解析を統合した質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging: MSI) 法の発展が著しく、その手法の可能性も大きく広がりを見せている。本稿では、AD 病変病理研究における MALDI-MSI を用いた空間プロテオミクス・リポドミクスの深化について紹介し AD バイオマーカー研究への展望について若干の考察を加えた。

キーワード: 空間オミクス, 質量分析イメージング, アルツハイマー病, アミロイドベータ, スフィンゴ脂質.

Abstract

Pathological hallmark of Alzheimer's disease (AD) is characterized by the accumulation and aggregation of amyloid β ($A\beta$) peptides into extracellular plaques of the brain. Clarification of the process of how soluble $A\beta$ starts to assemble into amyloid fibrils is an essential step in elucidating the pathogenesis of AD. In our previous study, $A\beta$ proteoforms were visualized in postmortem brains from AD patients with matrix-assisted laser desorption/ionization-based mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). In this review, we introduce liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based shotgun proteomics with laser microdissection (LMD) excised tissue samples as well as direct tissue imaging with MALDI-MSI. Of note, as lipid dysregulation has been implicated with AD pathology, we have challenged to integrate proteomics and lipidomics imaging for AD neuropathology. Spatial multi-omics is a powerful strategy to bridge biofluid biomarker studies and pathological events in brains of AD patients.

Key Words: Spatial Omics, Mass Spectrometry Imaging, Alzheimer's Disease, Amyloid beta, Sphingolipid.

令和6年10月4日受付 令和6年10月4日受理

*連絡先 池川雅哉 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷1-3

mikegawa@mail.doshisha.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.133.10.639

はじめに

1906年、アロイス・アルツハイマーは、テュービンゲンの南西ドイツ精神医学会で進行性の記憶障害や妄想などの認知症を起こして死亡した55歳の女性アウグステ・Dについて報告した¹⁾。その後、同じような症状を示す患者さんについての報告が相次ぎ1910年にアルツハイマーの師であるエミール・クレペリンが、この疾患を「アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease: AD)」と名付けた。クレペリンは、アルツハイマーの報告した患者さんが初老期に発病したことから老年認知症とは別の疾患であると考えたのである。1911年、アルツハイマーは、この症例の詳しい神経病理学的所見を論文に発表し、(1) 大脳の萎縮と大脳皮質の神経細胞の減少、(2) 老人斑と呼ばれる異常構造の多発、(3) 神経原線維変化と呼ばれる神経細胞の中に繊維状の塊が蓄積することを指摘している²⁾³⁾。

老人斑は、銀染色に濃く着色する直径数10～100 μm くらいの斑状の構造である (図1)。1984年、Glennerら⁴⁾、1985年、Mastersら⁵⁾は、脳血管アミロイドの沈着しているAD脳・ダウン症脳より分子量約4,200のタンパク質を発見し、その一次構造を決定しアミロイド β タンパク ($A\beta$) と名付けた⁴⁾⁵⁾。さらに1987年、Robakisら⁶⁾、Tanziら⁷⁾、Kangら⁸⁾がそれぞれcDNAをクローニングし、 $A\beta$ がアミロイド前駆タンパク (β amyloid precursor protein: APP) の一部であることを明らかにした。Kangらは、APP遺伝子が第21番染色体上に存在することを明らかにした。このことはダウン症の原因である21番染色体の重複とダウン症患者の脳病理とAD病理と同様であることと符合する。

アルツハイマーの指摘したもうひとつの病変である神経原線維変化は、やはり銀染色で濃く染まる神経細胞や神経細胞の突起の中にできる細胞内のひも状の異常構造で、paired helical filament (PHF) と呼ばれている (図1)。井原康夫博士らは、アルツハイマーが指摘した神経原線維変化に関する研究を、その形態学的変化

のみならずタンパク質解析から行い、異常リン酸化 tau タンパク質が主な構成成分であることを示した⁹⁾。このように剖検脳を前に診断確定に至る神経病理学的特徴が明確であるのに対して、この疾患の特殊性は確定診断に至るために行う血液や脳脊髄液などの体液を対象にした定量的かつ特異性の高いバイオマーカー探索が困難であることが挙げられる。我々は、このような状況下でAD脳病理とバイオマーカー探索とをつないでAD発症や進行を修飾する治療法の開発のためにAD脳の空間マルチオミクス解析法の開発に取り組んできた。

医学研究におけるマスマスペクトロメトリー (Mass Spectrometry: MS) の利用は、島津製作所の田中耕一博士をはじめとするマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: MALDI) 法の開発により生体分子の中でも高分子に属するタンパク質・ペプチドの網羅的解析を可能にし、今日のプロテオミクスの発展に寄与した¹⁰⁾。2023年12月から、我が国ではAD脳のアミロイド病理に根拠を置いた抗AD治療薬レカネマブの承認が行われ、その有効性や対象を検討する上でもバイオマーカーの探索により対策を講じる重要性が活発に論じられている¹¹⁾。このような時代背景において、バイオマーカー探索やバイオマーカー検出法の開発は急務であり、最近では直接病理組織学的解析とオミクス解析を統合した質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging: MSI) 法の発展が著しく、その手法の可能性も大きく広がりを見せている¹²⁾。本稿では、AD病脳病理研究におけるMSIを用いた空間プロテオミクス・リポミクスの深化について紹介しADバイオマーカー研究への展望について若干の考察を加えた。

AD脳における

$A\beta$ プロテオフォーム・マッピング

質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging: MSI) 法は、生体組織切片上に存在する物質を直接MALDI質量分析計で検出し、それぞれの物質の切片上での位置情報と従来の

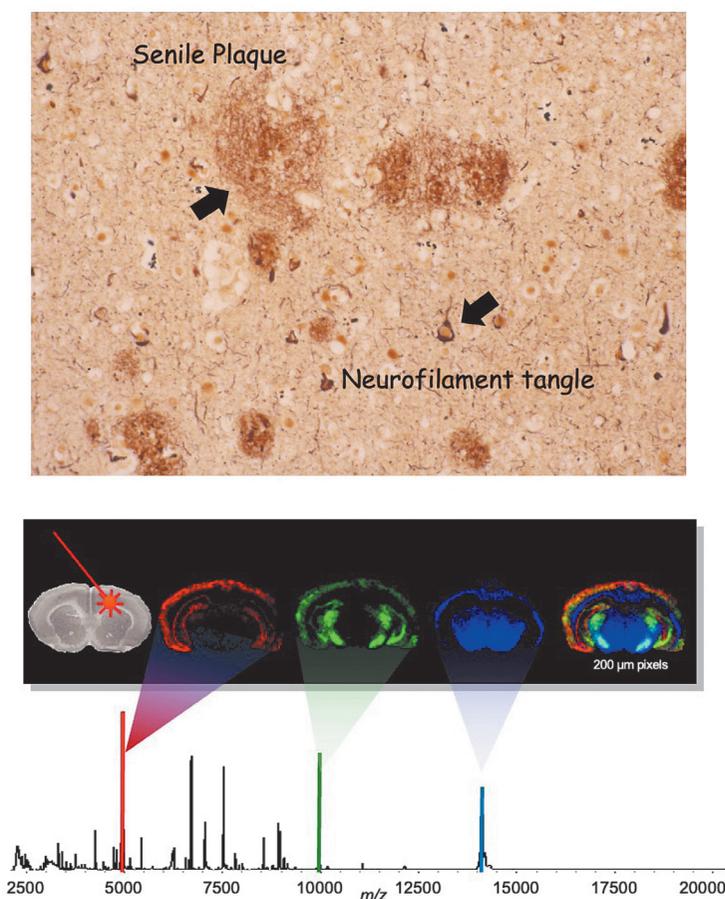


図1 アルツハイマー病脳と質量分析イメージング法. アルツハイマー病脳のプラークとタンゲル, 井原康夫先生ご提供 (上). 質量分析イメージングの原理図 (下). 試料となる生体組織切片を X, Y 軸で等間隔ピクセル状に分析を行う, 2次元での可視化法. 取得した質量スペクトル上の任意の分子量を指定し, それらの分子量別に色分けすることにより, 物質の空間分布を2次元で可視化・描画させ, イメージ画像として取り出して分析できる. 良好なイメージ画像を得るためには, 装置だけではなく測定対象となる生体組織切片の前処理の仕方も重要な要素となる.

組織・病理学情報との比較を行う方法である (図1). Stoeckliらは, APP23 マウス脳におけるアミロイドのMALDI-MSIを世界に先駆けて行った¹³⁾. マウス脳からヒト剖検脳を対象としたタンパク質・ペプチドレベルのMSI研究に移行するのに技術的課題が存在し, その解決には数年の歳月が必要であったが, 脳組織の前処理法を工夫することにより, ヒト剖検脳を対象としたMSIプロトコルを完成させること

ができた¹⁴⁾¹⁵⁾. この背景には, 1) MSI法に適したMALDI質量分析計の普及, 2) AD由来ヒト剖検脳の症例および部位の選択, 3) 剖検脳の死後脳変化など試料保存状態, 4) 脳組織の前処理法, 5) マトリックスの選択など質量分析計の測定条件, 6) トリプシン処理の有無などが影響している. MSI法に適した組織切片とは, 剖検脳においてはpost mortem interval (PMI)の最短化など死後脳変化の影響を

最大限に抑制するよう配慮された新鮮凍結切片である。このことは、我が国のブレインバンクをはじめとするヒト剖検脳の PMI は、海外の報告例と比べて極めて有意な状況と考えられる。近年では、心臓・腎臓のバイオブシーサンプルを対象に行うホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin Fixed Paraffin Embedded: FFPE) 標本を対象とした MSI 法によって診断のつかなかった心・腎アミロイドーシスのタイピングが可能となるなど FFPE 標本を対象とした AD 脳病理解析においても MSI 法のさらなる発展が期待される¹⁴⁾¹⁵⁾。

AD 脳など神経変性疾患における凝集体を形成するタンパク質は、不溶性で扱いにくい物質である。ヒト剖検脳のアミロイド・イメージングに取り組んだ当初、解析対象をマウスからヒトへ移すことによって、イオン化や組織前処理法において検討すべき条件課題がたちだかかった。我々は、組織前処理法を独自に開発することにより AD 脳や脳血管にアミロイドの沈着するタイプの脳アミロイド血管症 (Cerebral Amyloid Angiopathy: CAA) を MSI 法で解析することに成功した。このことは、同志社大学脳科学研究科井原康夫教授と東京都健康長寿医療センター研究所高齢者ブレインバンク村山繁雄教授らとの共同研究において実現した¹⁶⁾¹⁹⁾。

A β は、ヒト脳において様々なプロテオフォームとして存在し、主に注目されてきたのは、C 末端の A β 40 と A β 42 であり A β 42 は凝集しやすく毒性も強いこと、さらに A β 43 も A β 42 と同様に強い毒性を持つことが報告されていた。一方、これまでの報告では、抗体を用いた解析が主流であったためペプチド断片の正確な分子量や化学修飾まで正確な判別が困難であった。我々は MALDI-MSI 法を用いた A β を一挙にアミノ酸一個ずつの違いごとの脳内分布を明らかにした¹⁶⁾¹⁸⁾。また A β 1-42/43 とそれより長さの短い A β 1-36, 37, 38, 39, 40, 41 は、髄膜血管周辺か、脳実質の老人斑か、たった 1 個のアミノ酸の違いで劇的に分布が異なることが明らかとなった (図 2, 図 3)¹⁶⁾¹⁷⁾。

さらに解像度や感度を向上させる条件を模索

することで未だ報告のない A β プロテオフォームの局在と病態との関連についての情報を収集することが可能となってきている (図 4)。このアプローチは、新たなイオン化方式とイオンモビリティを用いた解析手法によって正確な A β プロテオフォームの特定を可能にした。外山らは、このアプローチを用いて先行研究の再現性を確認すると同時に、新たに A β 1-29, A β 10-40 などのプロテオフォームの脳内分布を報告した²⁰⁾。

Hanrieder らは、MALDI-MSI 法の神経変性疾患研究への応用におけるパイオニアである。AD モデルマウス脳やヒト AD 剖検脳を対象とした単一プラークレベルの A β 蓄積と脂質の低分子イメージングについて一連の成果を報告しプラーク形成の分子基盤を問う精力的な研究成果を報告している²⁰⁾²⁶⁾。彼らの業績で特筆すべきは、MALDI-MSI 法を基軸とした AD 脳病理の理解とバイオマーカー探索への橋渡しをプロテオミクス・リポドミクスの空間マルチオミクスの視点から実行していること、豊富な家族性 AD 由来の臨床検体を背景に脳脊髄液由来 A β プロテオフォームの解析から家族性 AD の Uppsala 型変異の発見に寄与したこと²⁶⁾、マスペクトロメトリーを駆使したアミロイド凝集について種々の chemical probe を利用した multi modal な解析を試みていること²⁰⁾²⁶⁾、タンパク質のターンオーバーを iSILK 法という安定同位体を用いた定量方法を採用していること²⁶⁾、2D の組織イメージングを複数取得し統合することにより 3D イメージの構築を試みた²⁵⁾ ことなどが挙げられる。

質量分析イメージング法を用いた 高深度組織プロテオミクス

AD 脳での A β 蓄積に加えパーキンソン病 (Parkinson's disease; PD)、プリオン病 (prion diseases)、ハンチントン病 (Huntington's disease; HD)、前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia; FTD)、運動ニューロン疾患 (motor neuron disease) など異常タンパク質の凝集や蓄積という神経変性疾患の共通の病態理解のた

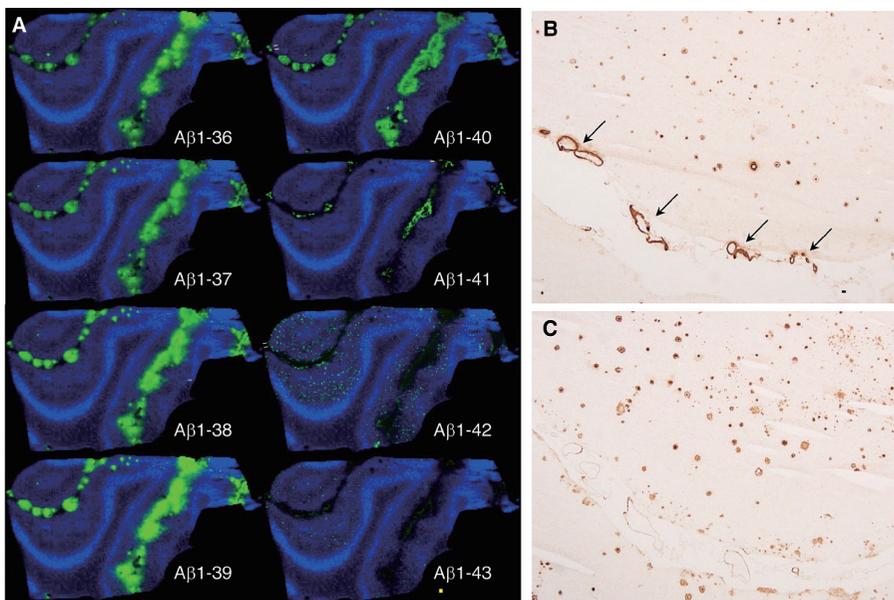


図2 ヒト脳凍結切片のA β プロテオフォーム・イメージング。アルツハイマー病脳凍結切片のMALDI質量分析イメージング法(A)と連続切片の免疫組織染色(B, C)。空間分解能は100 μ m。Bar = 5 mm。D. 抗A β 40抗体(BA27) E. 抗A β 42抗体(anti-A β 42 polyclonal)。Bar = 500 μ m。

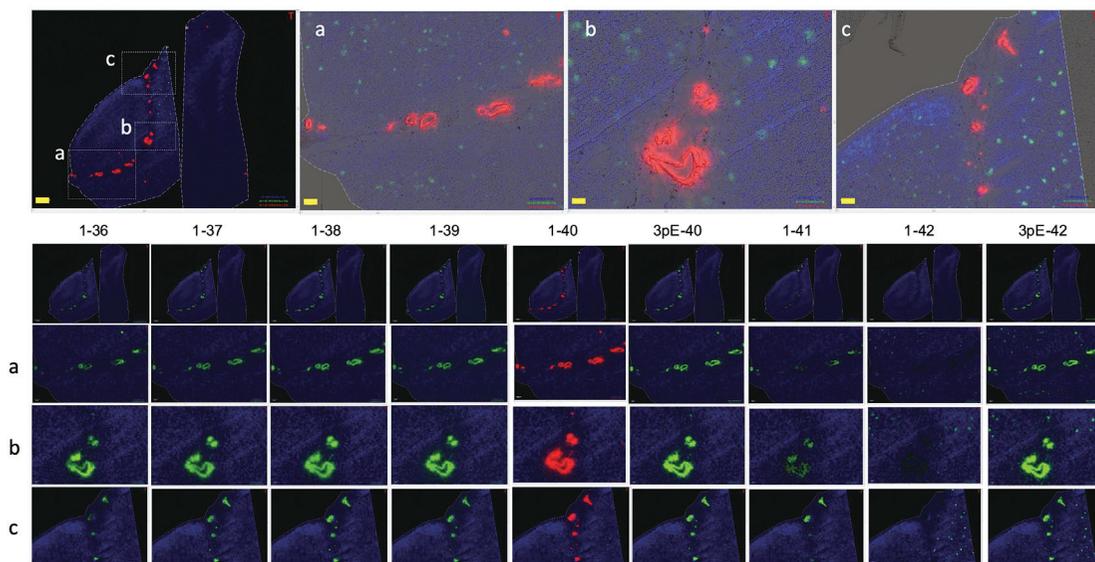


図3 高解像度アルツハイマー病脳のアミロイド・イメージング。高解像度のアミロイドペプタンパク質のC端のバリエーションを可視化。A β 1-36からA β 1-41は髄膜腔内血管に沈着する一方、A β 1-42、A β 1-43は脳実質の老人斑(プラーク)に局在している。空間分解能は20 μ m。

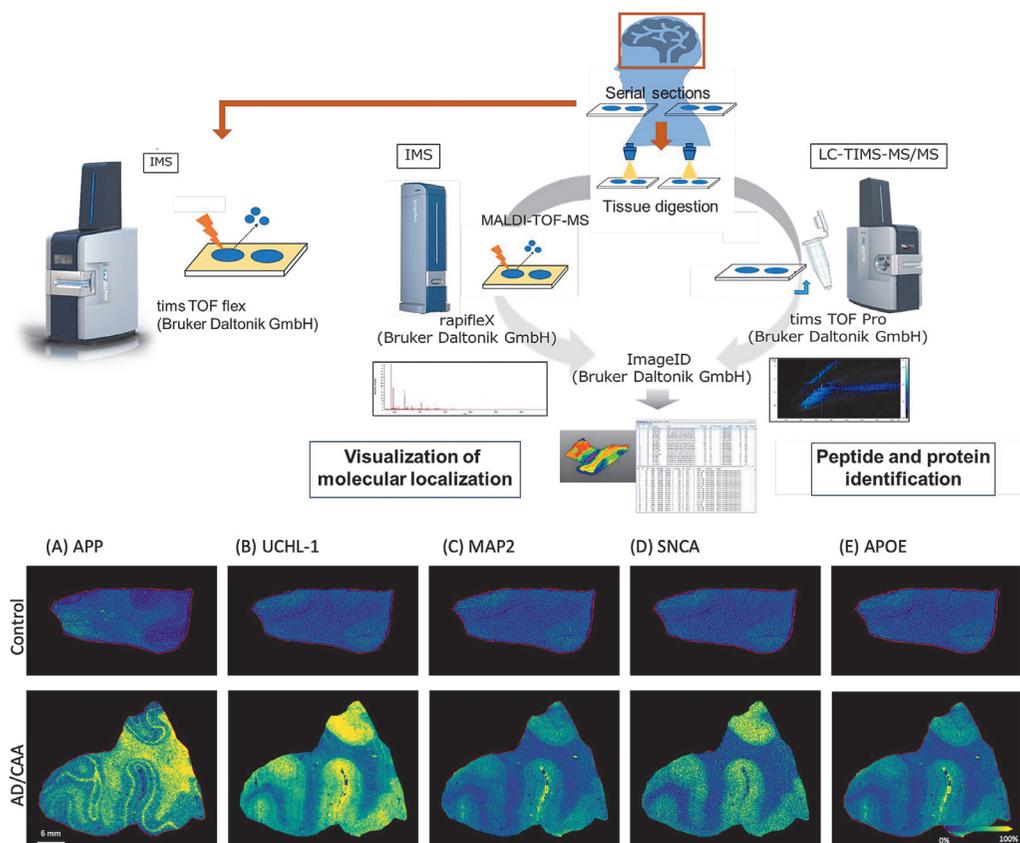


図4 MALDI質量分析イメージング法とLC-MS/MSを統合したワークフローによる空間プロテオミクス。上：統合ワークフロー。下：コントロール脳（上）とAD/CAA脳（下）のAPP, APOE, SNCA, UCHL1, MAP2タンパク質群の分布。部位は、occipital lobe。

可視化しているのは、トリプシン酵素消化による以下のペプチド断片(A) APP: K. VESLEQEANER.Q, m/z 1373.6423, (B) UCHL-1: R. VDDKVNHFHILFNNVDGHLVELDGR.M, m/z 2975.4566, (C) MAP2: K. MEFHDQQLTLPSTAEPDQKEK.E, m/z 2574.1544, (D) SNCA: K. TVEGAGSIAAATGFVK.K, (E) APOE: R. AATVGLSLAGQLQERA.A, m/z 1496.7947。

めに、脳プロテオームの解析手法の開発は必須である²⁸⁾。ポリグルタミン病 (polyglutamine diseases; polyQ) と呼ばれる一群の疾患における polyglutamine の異常蓄積が報告されている。これらの研究手法の最も重要な部分は、いかに凝集タンパク質を分析し、病巣に共同在するタンパク質群 (aggregate interacting proteins; AIPs) を網羅的に特定するかである。我々は、これらの神経変性疾患の脳プロテオームを遂行するのに適切な前処理法を検討し、MALDI-MSI法とLC-MS/MSを統合したワークフ

ローを考案しそれぞれ独立した modality によって取得されたプロテオームデータをいかに統合・解釈すべきについて一つの応用例を体験した。

神経核内封入体病 (Neuronal intranuclear inclusion disease, NIID) は、中枢神経系の神経細胞、末梢神経系および一般臓器細胞に核内封入体が広く分布する神経変性疾患で1968年に第一例目の報告以来、死後脳の組織病理学解析でのみ診断可能であった。ハンチントン病のようなCAG繰り返し配列の伸長によるポリグ

ルタミン病でも核内封入体が認められることから、NIIDは原因の異なる疾患群であることがわかってきた²⁹⁾。この疾患の核内封入体の組成については、長年探索が続けられていたが、ついに貫名らは、日本型とは異なり NOTCH2NL 遺伝子の異常を持たないフィンランド型の NIID 患者脳を用いて核内封入体の主な組成が Hornerin であることを明らかにした³⁰⁾。この仕事で朴らのとった戦略は、リピートのあるタンパク質・ペプチドでは、ある特定のアミノ酸の増加を認めることから、現代的手法であるショットガンプロテオミクスに加え古典的手法ではあるが極めて基本的かつ原理的に重要な「アミノ酸分析」を採用し、予測どおり NIID 患者脳の核内封入体を精製し分析した結果、セリンが封入体分画で増加していることが明らかとなった。そこでショットガン解析から NIID 特異的に同定されたタンパク質の中でセリン含量の多い Hornerin が主な構成成分であることを MALDI-MSI 法とイオントラップ型質量分析法を行い、見事に Hornerin の NIID 特異的な分布の可視化に成功した³⁰⁾。

外山らは、上記アプローチを進めると同時に、AD 剖検脳 occipital lobe 由来の凍結切片を対象に高深度プロテオミクスと MALDI-MSI 法の統合的アプローチを試みた¹⁹⁾。その結果、 $A\beta$ に加えて APP, UCHL-1, MAP2, SNCA, APOE など AD 病理関連タンパク質由来ペプチドの分布の可視化に成功した。本手法による統合的空間プロテオミクスの手法については、同一タンパク質由来のペプチド・ドメイン間で局在に差が生じる場合など、どのような解釈が必要となるかさらなる検証と標準化の必要が指摘されている。この問題を補足すべく、近年、新たに MALDI HiPLEX IHC 法が開発された³¹⁾³²⁾。筆者らは、現在このシステムを AD 脳病理解析に応用し、同一組織から AD 脳リポドミクスとプロテオミクスの統合を試み、その有効性を確信している。

質量分析イメージング法を用いた AD 脳リポドミクス

AD 脳病理は $A\beta$ や tau タンパク質をはじめとする空間プロテオミクスにより理解が深まったのに対し、脂質は、神経細胞膜の主要構成分子であり、脳の 90% を占めていることから神経毒性について考察する上で重要な分子群であることが指摘されている。例えばリポタンパク質や脂質のトランスポーターである APOE/ABCA7³³⁾ や、脂質のセンシングに関わる TREM2 は、AD 脳病理に深く関わっている³⁴⁾。外山らは、図 4 で示したワークフローを用いてコントロール脳と AD/CAA 脳の脂質イメージングを行なった。灰白質には Phosphatidylcholine (PC)、白質には Cerebroside (Cer) がそれぞれ特異的に分布することを可視化している。この解析結果に機械学習法を用いた Segmentation を試みると灰白質よりも白質における脂質プロファイルがコントロール脳と AD/CAA 脳との間で顕著な差であることが明らかとなった。白質病変に関連する分子の一例として AD/CAA 脳およびコントロール脳の両組織で共通して髄膜血管に一致して分布する m/z 616 に注目した。この分子は AD/CAA 脳白質の一部に顆粒状の点在が認められタンデム質量分析を行うと heme であることがわかった (図 5)。この症例では AD/CAA 脳の白質の一部に血管の破綻による微小出血が認められた可能性が示唆された¹⁹⁾。

Hanrieder らは、AD モデルマウス脳においてプラークを形成する微小環境および単一プラーク内での分子イメージングの結果、gangliosides (GM), phosphoinositols (PI), phosphoethanolamines (PE), phosphatidic acids (PA) の脂質の分子種が増え、一方で sulfatides (ST), cardiolipins (CL), polyunsaturated fatty acid (PUFA)-conjugated phosphoserines (PS), PE は減じていることを報告した²¹⁻²³⁾ (図 6)。さらに、*PSEN1* 変異を伴う AD 脳において、単一プラークレベルでの網羅的な空間リポドミクスのデータを上梓し、 $A\beta$ 凝集

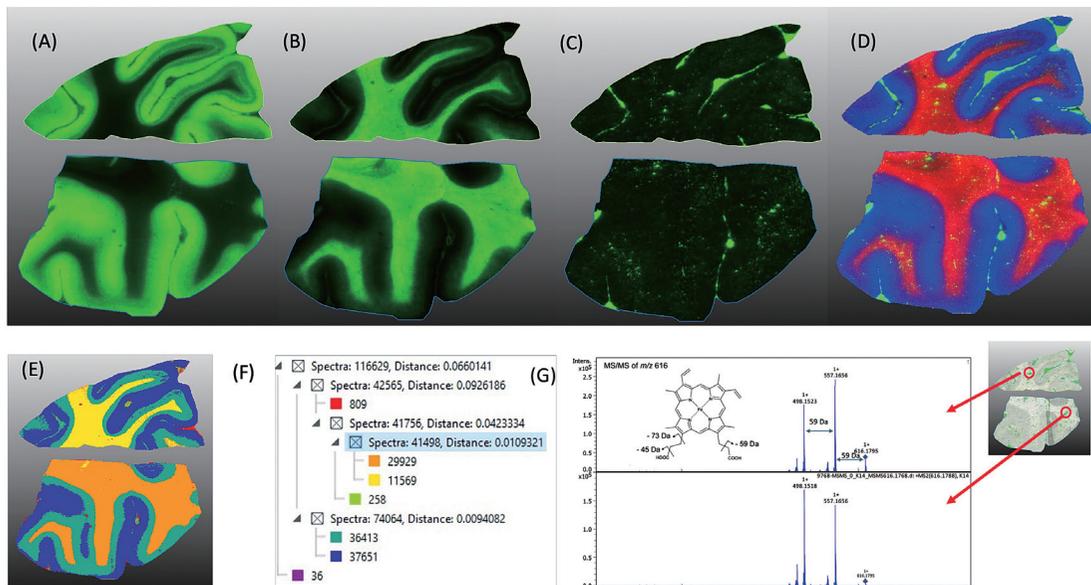


図5 AD 脳の空間リポドミクス. (A)–(D): コントロール脳 (上) と AD/CAA 脳 (下) (A) Potassiated phosphatidylcholine 32:0, m/z 772. (B) Potassiated cerebroside, m/z 851 (C) Heme B 由来の m/z 616 イオンの局在の可視化. コントロール脳では, 血管走行に沿って分布. AD/CAA 脳では, 血管走行に加えて白質の一部で顆粒状の分布が確認できる (D) 赤 cerebroside, 青 phosphatidylcholine, 緑 Heme B. (E) Segmentation の可視化. (F) (E) におけるセグメンテーションの構造. SCiLS ソフトウェアを用いて計算. 類縁性の高い順に色付けを行った. Scale bar indicates 5 mm. (G) m/z 616 の MS/MS による配列決定. Heme B 由来であると判断できた.

を促す ganglioside (GM1) や脱髄による Sulfatide の減少がヒト AD 脳においても確認された³⁵⁾. またリン脂質である PA, PI, PE や LPI, LPA, LPE は, ミクログリアの活性化を通じてアミロイドプラーク病理と深い関連性を持つこと, なかでもアミロイド病理との強い関連性の確認されたのは, スフィンゴ脂質 (CerP, PE-Cer, HexCer, GM1) であった³⁵⁾.

近年注目を集めている Desorption Electrospray Ionization (DESI) mass spectrometry imaging (MSI) 法と Mass Cytometry Imaging 法の統合的アプローチによりマウス脳およびヒト剖検脳を対象にした空間リポドミクスとタンパク質解析の報告がなされた³⁵⁾. APP^{NL-GF} 脳を対象に lysophospholipids, bis (monoacylglycerol) phosphates, phosphatidylglycerols が A β プラークと高い共局在性を示した. これらは炎症性脂質であり, また A β プラークにおけ

るグリア細胞の活性化マーカーとして CD68, オートファジーのマーカーとして LAMP1 などのタンパク質マーカーとの関連について考察を加えている. ヒト剖検脳においても lysophospholipids と ceramides は Braak stage V/VI の進行例で A β プラークと共局在性を示し初期の Braak stage では認められないことから A β 病理とリポドミクスとの深い関係性を示唆した³⁶⁾.

空間マルチオミクスと 体液バイオマーカー研究

神経変性疾患における体液バイオマーカー研究におけるプロテオミクスの成果は, 脳病理に関連したタンパク質である amyloid, tau, alpha-synuclein に加えて, 疾患重症度との関連で NfL, シナプス機能不全との関連で neurogranin などの報告がある³⁷⁾. 中村らは, Immuno-

precipitation-mass spectrometry (IP-MS) による血中 A β プロテオフォーム定量を行い、PET による脳内 A β 量と良い相関を示した (APP)⁶⁶⁹⁻⁷¹¹/amyloid- β (A β)₁₋₄₂ をバイオマーカーとして日本とオーストラリアの国際共同研究で示した³⁸⁾. このフラグメント (APP)⁶⁶⁹⁻⁷¹¹ は、N-末端から 3 アミノ酸上流に伸びていた (A β (-3)-40) ため、背景の分子基盤についての議論や新たな報告がなされた³⁹⁾. 著者の田中耕一博士 (島津製作所) は、自身の開発した MALDI-MS を用いて IP-MS による血中 A β 定量法が免疫組織化学と並んで評価されたことは、質量分析法の臨床応用に向けて大きな一歩と位置付けておられた (personal communication). その後 IP-MS を用いた血液や脳脊髄液中 p-tau, GFAP, NFL などの定量による AD バイオマーカー研究の報告が相次ぐようになった. また SIMOA など高感度 Immunoassay の台頭などもこの領域の活況に影響を及ぼしている⁴⁰⁾.

血液・脳脊髄液を対象とした体液リピドミク

スによるバイオマーカー探索についても、二つの大きなコホートの結果から、血中スフィンゴ糖脂質と AD の臨床症状との強い相関が示され、なかでも GM3 との相関が最も顕著であった⁴¹⁾. 今後は、MSI 法による AD 脳内イベントと体液マルチオミクス解析との相補的な解釈を通じて、診断や治療法のさらなる最適化が期待される. MSI によって提供される分子情報と PET や MRI などの *in vivo* 画像診断手段との統合の試みが始まっている. これらのワークフローは、まだ簡単ではないが、有望な開発が進行中であり、生体外イメージングと生体内イメージングの世界の間のギャップを埋めるための大きな一歩が踏み出されており、臨床医学の現場における MSI の統合が大幅に加速される可能性がある. なかでも Agar らのグループは、MSI を用いた術中迅速質量分析法を実践している. MRI を補完する MSI ベースのアプローチとして、革新的な高度マルチモダリティ画像誘導手術 (AMIGO) スイートで、DESI-MSI を使用して腫瘍代謝物 (2-ヒドロキシグルタル

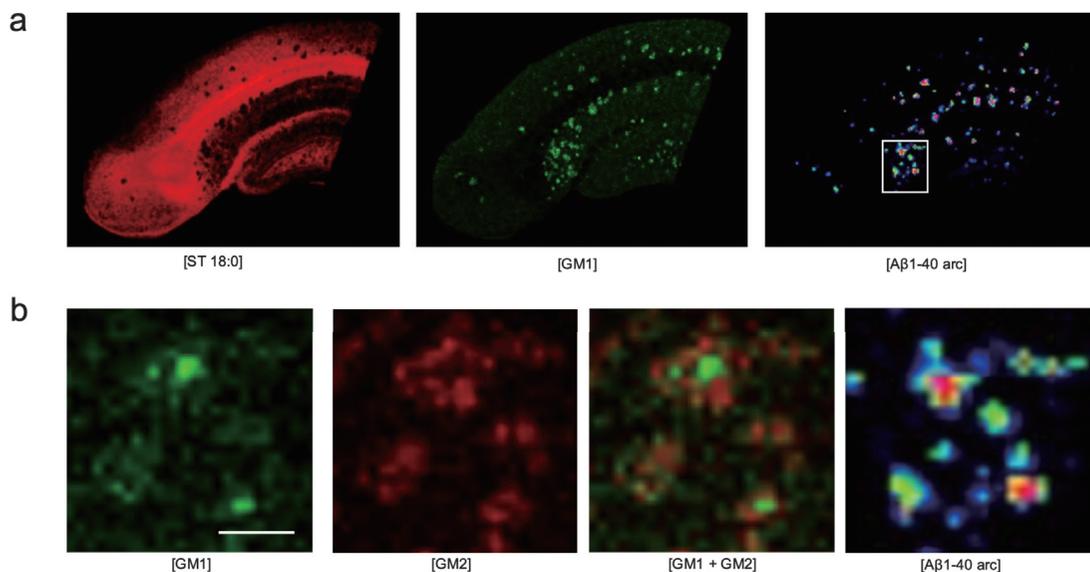


図6 AD 脳の空間マルチオミクス. 高解像度の単一プラークレベルの ganglioside と A β の共局在の様式. AD マウス脳. (a) 左から ST 18:0, GM1, Ab 1-40arc. (b) GM1, GM2 および Ab 1-40arc とそれらの統合図. A β 陽性プラークに対して GM1 は、プラーク中心部に分布するのに対し GM2 はプラーク全体に分布. (a) 四角内の拡大像を (b) に示した. scalebar = 100 μ m. Michno et al., 2019 より.

酸；2-HG) をモニタリングし、脳腫瘍手術中に decision making を行うという画期的なシステムである。MSI 分析は、手術中に外科的に切除された標本に対して実行され、数分以内に組織と腫瘍の辺縁を評価できる。病理学者が手術室の外で染色切片を評価する日常的な臨床ワークフローでは、施設によっては数時間以上かかることを考えると画期的である。また AMIGO アプローチを使用すると、標的の代謝産物シグナルが腫瘍の 3D MRI 上にマッピングされ、臨床上的意思決定を強化する上で強力な手法である⁴²⁾。現在、我々は、ヒト脳を対象に位相差 CT や MRI を用いた 3D 解析データと MSI の統合を試みている。本稿で述べてきた神経変性疾患への応用について、空間マルチオミクスの集学的アプローチに期待している。

文 献

- 1) Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin, 64: 146-148, 1907.
- 2) 村山繁雄 編著: アルツハイマー病診断。早期発見・早期介入のために。真興交易(株)医書出版部, 東京, pp.234, 2006.
- 3) Masters CL. The neuropathology of Alzheimer's disease. Dementia 4th Ed. CRC Press, 417-431, 2010.
- 4) Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun, 120: 885-890, 1984.
- 5) Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., & Beyreuther, K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82: 4245-4249, 1985.
- 6) Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. Proc Natl Acad Sci U S A, 84: 4190-4194, 1987.

謝 辞

本研究を終始ご指導くださいました井原康夫先生、貫名信行先生、(同志社大学脳科学研究科)、村山繁雄先生(東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンター)並びに、質量分析イメージング法の開発に多大なるご尽力いただきました蕪澤 崇先生(Bruker Japan K.K.)、質量分析イメージング法に関心を寄せ科学的助言をくださいました Colin L. Masters 先生(Florey Institute and The University of Melbourne)、同分野のリーダーであり盟友の Jörg Hanrieder 先生(Gothenburg University)に感謝申し上げます。ここに昨年ご逝去された井原康夫先生のご冥福をお祈り申し上げます。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

- 7) Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science, 235: 880-884, 1987.
- 8) Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature, 19-25; 325: 733-736, 1987.
- 9) Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. J Biochem, 99: 1807-1810, 1986.
- 10) 池川雅哉: プロテオミクス。医療系学生のための医用質量分析学テキスト。診断と治療社。東京, pp.92-99, 2019.
- 11) van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. N Engl J Med, 388: 9-21, 2023.

- 12) 池川雅哉 編: 別冊「医学のあゆみ」質量分析イメージング法を用いた創薬・医学研究——時空間マルチオミクスの力, 東京, 医歯薬出版株式会社. pp130, 2023.
- 13) Stoekli M, Knochenmuss R, McCombie G. et al. MALDI MS Imaging of Amyloid. *Methods in Enzymology*. Vol. 412 Amyloid, prions, and other protein aggregates Part B, 2006.
- 14) 武笠結天, 他: イメージング質量分析法を用いたプロテオームレベルの細胞組織病理解析法について. 日本組織細胞化学会編. *組織細胞化学*, 2020, 195-205, 2020.
- 15) 外山友美子, 他: イメージング質量分析法を用いたアルツハイマー病をはじめとする脳病理解析. 日本組織細胞化学会編. *組織細胞化学*, 2022, 211-218, 2022.
- 16) Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, Nirasawa T, Wada-Kakuda S, Takahashi-Fujigasaki J, Murayama S, Ihara Y, Ikegawa M. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun*, 5: 73, 2017.
- 17) Ikegawa M, Nirasawa T, Kakuda N, Miyasaka T, Kuzuhara Y, Murayama S, Ihara Y. Visualization of Amyloid β Deposits in the Human Brain with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry. *J Vis Exp*, 145, 2019.
- 18) Ikegawa M, Kakuda N, Miyasaka T, Toyama Y, Nirasawa T, Minta K, Hanrieder J. Mass Spectrometry Imaging in Alzheimer's Disease. *Brain Connect*, 13: 319-333, 2023.
- 19) Toyama Y, Nirasawa T, Morishima M, Saito Y, Irie K, Murayama S, Ikegawa M. Integrated Spatial Multi-Omics Study of Postmortem Brains of Alzheimer's Disease. *Acta Histochem Cytochem*, 57: 119-130, 2024.
- 20) Michno W, Wehrli PM, Blennow K, Zetterberg H, Hanrieder J. Molecular imaging mass spectrometry for probing protein dynamics in neurodegenerative disease pathology. *J Neurochem*, 151: 488-506, 2019.
- 21) Hanrieder J, Malmberg P, Lindberg OR, Fletcher JS and Ewing AG. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry based molecular histology of human spinal cord tissue and motor neurons. *Anal. Chem*, 85, 8741-8748, 2013.
- 22) Michno W, Wehrli PM, Koutarapu S, Marsching C, Minta K, Ge J, Meyer SW, Zetterberg H, Blennow K, Henkel C, Oetjen J, Hopf C, Hanrieder J. Structural amyloid plaque polymorphism is associated with distinct lipid accumulations revealed by trapped ion mobility mass spectrometry imaging. *J Neurochem*, 160: 482-498, 2022.
- 23) Kaya I, Michno W, Brinet D, Iacone Y, Zanni G, Blennow K, Zetterberg H, Hanrieder J. Histology-Compatible MALDI Mass Spectrometry Based Imaging of Neuronal Lipids for Subsequent Immunofluorescent Staining. *Anal Chem*, 89: 4685-4694, 2017.
- 24) Michno W., Kaya I., Nystrom S., Guerard L., Nilsson K. P. R., Hammarstrom P., Blennow K., Zetterberg H. and Hanrieder J. Multimodal chemical imaging of amyloid plaque polymorphism reveals a beta aggregation dependent anionic lipid accumulations and metabolism. *Anal. Chem*, 90: 8130-8138, 2018.
- 25) Enzlein T, Cordes J, Munteanu B, Michno W, Semeels L, Strooper BD, Hanrieder J, Wolf I, Chavez-Gutierrez L, Hopf C. Computational Analysis of Alzheimer Amyloid Plaque Composition in 2D- and Elastically Reconstructed 3D-MALDI MS Images. *Anal. Chem*. 92, 21, 14484-14493, 2020.
- 26) Michno W, Stringer KM, Enzlein T, Passarelli MK, Escrig S, Vitanova K, Wood J, Blennow K, Zetterberg H, Meibom A, Hopf C, Edwards FA, Hanrieder J. Following spatial $A\beta$ aggregation dynamics in evolving Alzheimer's disease pathology by imaging stable isotope labeling kinetics. *Sci Adv*. 7: eabg4855, 2021.
- 27) Pagnon de la Vega, M., Giedraitis, V., Michno, W., Kilander, L., Güner, G., Zielinski, M., Löwenmark, M., Brundin, R., Danfors, T., Söderberg, L., Alafuzoff, I., Nilsson, L. N. G., Erlandsson, A., Willbold, D., Müller, S. A., Schröder, G. F., Hanrieder, J., Lichtenthaler, S. F., Lannfelt, L., & Ingelsson, M. The Uppsala APP deletion causes early onset autosomal dominant Alzheimer's disease by altering APP processing and increasing amyloid β fibril formation. *Science Translational Medicine*, 13, 2021.
- 28) Mitsui K, Doi H, Nukina N. Proteomics of polyglutamine aggregates. *Methods Enzymol*, 412: 63-76, 2006.
- 29) Park H, Yamanaka T, Nukina N. Proteomic analysis of heat-stable proteins revealed an increased proportion of proteins with compositionally biased regions. *Sci Rep*, 12: 4347, 2022.
- 30) Park H, Yamanaka T, Toyama Y, Fujita A, Doi H, Nirasawa T, Murayama S, Matsumoto N, Shimogori T, Ikegawa M, Haltia MJ, Nukina N. Hornerin deposits in neuronal intranuclear inclusion disease: direct identification of proteins with compositionally biased

- regions in inclusions. *Acta Neuropathol Commun*, 10: 28, 2022.
- 31) Claes BSR, Krestensen KK, Yagnik G, Grgic A, Kuik C, Lim MJ, Rothschild KJ, Vandenbosch M, Heeren RMA. MALDI-IHC-Guided In-Depth Spatial Proteomics: Targeted and Untargeted MSI Combined. *Anal Chem*, 95: 2329-2338, 2023.
- 32) Lim MJ, Yagnik G, Henkel C, et al. MALDI HiP-LEX-IHC: multiomic and multimodal imaging of targeted intact proteins in tissues. *Front Chem*, 11: 1182404, 2023.
- 33) Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63: 287-303, 2009.
- 34) Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaevea, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J. S., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pockock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J. C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., ... Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 368, 117-127, 2013.
- 35) Michno W, Bowman A, Jha D, Minta K, Ge J, Koutarapu S, Zetterberg H, Blennow K, Lashley T, Heeren RMA, Hanrieder J. Spatial Neurolipidomics at the Single Amyloid- β Plaque Level in Postmortem Human Alzheimer's Disease Brain. *ACS Chem Neurosci*, 15: 877-888, 2024.
- 36) Huang, H. X., Inglese, P., Tang, J., Yagoubi, R., Correia, G. D. S., Horneffer - van der Sluis, V. M., Camuzeaux, S., Wu, V., Kopanitsa, M. V., Willumsen, N., Jackson, J. S., Barron, A. M., Saito, T., Saido, T. C., Gentlemen, S., Takats, Z., & Matthews, P. M. Mass spectrometry imaging highlights dynamic patterns of lipid co-expression with A β plaques in mouse and human brains. *Journal of Neurochemistry*, 168: 1193-1214, 2024.
- 37) Chatterjee P, Pedrini S, Doecke JD, Thota R, Villemagne VL, Doré V, Singh AK, Wang P, Rainey-Smith S, Fowler C, Taddei K, Sohrabi HR, Molloy MP, Ames D, Maruff P, Rowe CC, Masters CL, Martins RN; AIBL Research Group. Plasma A β 42/40 ratio, p-tau181, GFAP, and NfL across the Alzheimer's disease continuum: A cross-sectional and longitudinal study in the AIBL cohort. *Alzheimers Dement*, 19: 1117-1134, 2023.
- 38) Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 554: 249-254, 2018.
- 39) Matsuzaki M, Yokoyama M, Yoshizawa Y, Kaneko N, Naito H, Kobayashi H, Korenaga A, Sekiya S, Ikemura K, Opoku G, Hirohata S, Iwamoto S, Tanaka K, Tomita T. ADAMTS4 is involved in the production of the Alzheimer disease amyloid biomarker APP669-711. *Mol Psychiatry*, 28: 1802-1812, 2023.
- 40) Johan Gobom, Ann Brinkmalm, Gunnar Brinkmalm, Kaj Blennow, and Henrik Zetterberg. Alzheimer's Disease Biomarker Analysis Using Targeted Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 23: 100721, 2024.
- 41) Huynh K, Lim WLF, Giles C, Jayawardana KS, Salim A, Mellett NA, Smith AAT, Olshansky G, Drew BG, Chatterjee P, Martins I, Laws SM, Bush AI, Rowe CC, Villemagne VL, Ames D, Masters CL, Arnold M, Nho K, Saykin AJ, Baillie R, Han X, Kaddurah-Daouk R, Martins RN, Meikle PJ. Concordant peripheral lipidome signatures in two large clinical studies of Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 11: 5698, 2020.
- 42) Santagata S, Eberlin LS, Norton I, Calligaris D, Feldman DR, Ide JL, Liu X, Wiley JS, Vestal ML, Ramkissoon SH, Orringer DA, Gill KK, Dunn IF, Dias-Santagata D, Ligon KL, Jolesz FA, Golby AJ, Cooks RG, Agar NY. Intraoperative mass spectrometry mapping of an onco-metabolite to guide brain tumor surgery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 11121-11126, 2014.

著者プロフィール



池川雅哉 Masaya Ikegawa

所属・職：同志社大学生命医科学部医生命システム学科・教授

略歴：1987年 京都大学医学部卒業・同付属病院内科研修医

1988年 市立舞鶴市民病院 内科医

1990年 第32次南極地域観測隊越冬隊随行医（国立極地研究所文部技官）

1994年 京都拘置所医務課長

1998年 京都大学大学院大学医学研究科環境医学専攻修了（医学博士）

1996年 京都大学大学院医学研究科・研修員（本庶 佑教授）

2004年 京都府立医科大学ゲノム医科学教室・准教授（田代 啓教授）

2013年 同志社大学生命医科学部・教授

2020年 同志社大学保健センター所長兼任

専門分野：質量分析科学・オミクス科学

最近興味のあること：質量分析イメージング法のバイオマーカー研究への応用

- 主な業績：1. Toyama Y, Nirasawa T, Morishima M, Saito Y, Irie K, Murayama S, Ikegawa M. Integrated Spatial Multi-Omics Study of Postmortem Brains of Alzheimer's Disease. *Acta Histochem Cytochem*, **57**: 119-130, 2024.
2. Ikegawa M, Kakuda N, Miyasaka T, Toyama Y, Nirasawa T, Minta K, Hanrieder J. Mass Spectrometry Imaging in Alzheimer's Disease. *Brain Connect*, **13**: 319-333, 2023.
3. Park H, Yamanaka T, Toyama Y, Fujita A, Doi H, Nirasawa T, Murayama S, Matsumoto N, Shimogori T, Ikegawa M, Haltia MJ, Nukina N. Hornerin deposits in neuronal intranuclear inclusion disease: direct identification of proteins with compositionally biased regions in inclusions. *Acta Neuropathol Commun*, **10**: 28, 2022.
4. Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, Nirasawa T, Wada-Kakuda S, Takahashi-Fijigasaki J, Murayama S, Ihara Y, Ikegawa M. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathologica Comm*, **5**: 73, 2017.
5. Ishigami N, Tokuda T, Ikegawa M, Komori M, Kasai T, Kondo T, Matsuyama Y, Nirasawa T, Thiele H, Tashiro K, Nakagawa M. Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's diseases and multiple system atrophy. *Movement Disorders*, **27**: 851-857, 2012.
6. Komori M, Matsuyama Y, Nirasawa T, Thiele H, Becker M, Alexandrov T, Saida T, Tanaka M, Matsuo H, Tomimoto H, Takahashi R, Tashiro K, Ikegawa M, Kondo T. Proteomic pattern analysis discriminates among multiple sclerosis-related disorders. *Annals of Neurology*, **71**: 614-623, 2012.
7. 池川雅哉 編：質量分析イメージング法を用いた創薬・医学研究—時空間マルチオミクスの力、別冊「医学のあゆみ」287巻、9号。東京、**医歯薬出版株式会社**。pp130, 2023.