

알츠하이머병 환자 혈청에서의 베타 아밀로이드 단백질에 대한 특이 항체량 측정: 알츠하이머병의 생화학적인 진단지표 개발

소정은 · 허지연 · 심혜진 · 김종원*
나덕렬[§] · 이필휴[†] · 정선주[‡] · 박문호[¶]
주인수[‡] · 송미숙[‡] · 김영호^{**} · 묵인희

서울대학교 의과대학 생화학교실
성균관대학교 의과대학 진단검사의학교실*
신경과학교실[§], 아주대학교 의과대학
신경과학교실[†], 간호학교실[‡], 울산대학교
의과대학 신경과학교실[‡], 분당구 보건소[¶],
(주)디지털 바이오텍 중앙연구소^{**}

Address for correspondence

Inhee Mook-Jung, Ph.D.
Department of Biochemistry,
Seoul National University College of Medicine,
28 Yongon-dong, Chongno-gu,
Seoul 110-799, Korea
Tel: +82-2-740-8245
Fax: +82-2-744-4534
E-mail: inhee@snu.ac.kr

Measurement of Anti-amyloid Beta Antibody in Serum of Alzheimer's Disease Patients: Development of Biomarker for Alzheimer's Disease Diagnosis

Jung On So, Ji Yeon Huh, Hea Jin Sim, Jong Won Kim, M.D.* , Duk L. Na, M.D. [§],
Phil Hyu Lee, M.D. [†], Sun Joo Jung, M.D. [‡], Munoo Park, M.D. [¶], Insoo Joo, M.D. [‡],
Mi-sook Song, Ph.D. [‡], Youngho Kim, Ph.D. ^{**}, Inhee Mook-Jung, Ph.D.

Department of Biochemistry, Seoul National University College of Medicine, Department of Neurology[†] and Department of Nursing[‡], Ajou University School of Medicine, Department of Laboratory Medicine* and Department of Neurology[§], Sung Kyun Kwan University School of Medicine, Department of Neurology[‡], Ulsan University College of Medicine, Bundang Health Center[¶], Digital Biotech, Inc.^{**}, Korea

Background: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that is rapidly increasing with the aging society, requiring a need for early diagnosis and prevention. However, diagnosis on AD has only been possible through limited methods such as neuropsychological examination or MRI. AD is characterized by deposition of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brain. A β peptide in senile plaques seems to play a central role in the neuropathology of AD. Several biochemical markers for AD are available, including reduced A β protein, a change in ratio between A β 40 and 42 and increased level of tau protein in the cerebrospinal fluid (CSF). **Methods:** This study analyzes anti-A β antibody from serums of AD patients using the ELISA. The levels of anti-A β antibody from patients with idiopathic Parkinson's disease or stroke and from normal control were compared to that of AD patients. **Results:** Our results showed a significantly lower anti-A β antibody level in AD compared to those with other neurological diseases or control. **Conclusion:** These data showed that the anti-A β antibody level in the serum may be used to diagnose the presence of AD.

Key Words: Alzheimer's disease, A β peptide, Anti-A β autoantibody, Biomarker

서론

알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD)은 유전적 변이에 의해 발병하는 가족성 AD (familial AD: FAD)와 그 원인이 밝혀지지 않은 산발성 AD (sporadic AD: SAD)로 나눌 수 있고, 병리학적인 특징으로는 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle)와 노인반(senile plaque)을 들 수 있다[1]. 세포내부의 응집체인 신경섬유덩어리는 cell body, dendrite, filament에 위치하며, microtubule-associated protein인 tau가 응집되어 나타난다. 또, 세포외부의 단백질 축적은 노인반이라는 특징적인 구조를 형성하며 이는 주로 베타 아밀로이드 단백질(A β peptide)로 구성되어 있다. 이 A β peptide는 AD의 주요 원인으로 알려져

있으며 아밀로이드 전구 물질인 amyloid precursor protein (APP)이 amyloidogenic pathway를 거치면서 베타, 감마 시크리타아제에 의해 절단되어 형성된다[2-4].

퇴행성 신경질환의 하나인 AD는 사회의 노령화에 따라 급속하게 증가되어지고 있는 추세로서 AD의 조기진단 및 예방의 필요성이 시급해지고 있다. 하지만, 이러한 AD의 진단은 현재까지 신경심리학적 검사나 특화된 MRI 촬영과 같은 많은 시간과 경비가 소요되는 방법들이 가능하였다. 생화학적인 방법을 사용한 진단으로 사용되는 것으로는 뇌척수액에서 AD의 지표로 베타 아밀로이드 단백질의 감소와 베타 아밀로이드 40형에 대한 42형의 비율, tau 단백질 농도, 혈청내에서 베타 아밀로이드 단백질의 증가와 glial fibrillary acidic protein (GFAP)-

항체의 증가 등이 가능성을 나타내고 있으나 진단의 간편성과 정확도 등에 문제가 제기 되고 있다. 또한 최근 수행된 일련의 AD에 대한 면역학적 접근 과정에서 베타 아밀로이드 단백질에 대한 특이 항체가 존재하며 이 특이 항체가 AD의 병인기전과 밀접하게 연관되어져 있을 것이라는 보고가 있다[5-8].

본 연구에서는 이러한 여러 가지 면역학적 실험 결과들을 바탕으로 하여 정상인의 경우, 혈액 내에 베타 아밀로이드를 특이적으로 인지하는 항체가 존재하는 것을 확인하였다. 또한 정상 쥐와 사람의 돌연변이 APP를 과발현하여 사람의 뇌에서 생기는 노인반과 유사한 베타 아밀로이드 침착을 일으키는 AD 동물모델 쥐의 경우, 정상 쥐에 비하여 AD 동물모델 쥐에서 베타 아밀로이드 특이 항체의 농도가 현저히 저하되어 있는 것을 발견하였다. 이러한 결과로부터 AD 환자의 경우, 정상인 보다 베타 아밀로이드 특이 항체의 양이 감소되어 있을 것이라는 가설을 세웠다. 이에 본 연구에서는 AD 환자와 특발성 파킨슨병 환자 및 뇌졸중 환자와 정상인의 혈청으로부터 효소면역분석법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)을 통하여 베타 아밀로이드 단백질에 대한 특이 항체의 정도를 측정하여 비교 해 봄으로써 혈청 내 $A\beta$ peptide에 대한 항체가 AD의 진단 지표로 사용될 수 있는지 알아보려고 하였다.

AD 환자의 혈청 내에서 베타 아밀로이드 항체 정도를 ELISA를 이용해 정상인과 비교하여 보았을 때, 환자의 혈청에서 베타 아밀로이드 항체의 농도가 정상인에 비해 통계적으로 유의하게 낮음을 확인하였다. AD가 아닌 신경질환인 뇌졸중과 파킨슨병 환자들 중 치매 증상이 없는 환자 군에서 베타 아밀로이드 항체 정도를 측정하였을 때 정상인과 비교하여 유의한 차이를 얻지 못하였다. 이러한 베타 아밀로이드 항체의 감소 현상은 AD 환자에게서만 유의하게 나타나는 결과로서 AD의 새로운 생화학적 진단 지표로서의 가능성을 보여준다고 할 수 있겠다.

대상 및 방법

1. ELISA Method

0.1 M bicarbonate-carbonate solution (Sigma)에 $A\beta$ 1-42를 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 농도로 ELISA plate (NUNC)에 하루밤 동안 코팅시켰다. PBST (PBS+tween 20, 0.05%)로 3-4회 auto-washer (Thermo LabSystems, Finland)를 이용하여 세척한 후 PBS로 희석한 10% fetal bovine serum (FBS)으로 한 시간 blocking 하였다. 다시 3-4회 정도 세척한 후 human serum을 1:100으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. PBST로 5회 정도 세척하고 이차항체를 1:2,000으로 10% FBS로 희석하여 한 시간 실온에서 반응시킨 후 PBST로 5회 세척하였다. 마지막으로 peroxidase substrate인 3,3',5,5' tetramethyl benzidine (TMB)와 peroxide solution인 hydrogen peroxide (Pierce)를

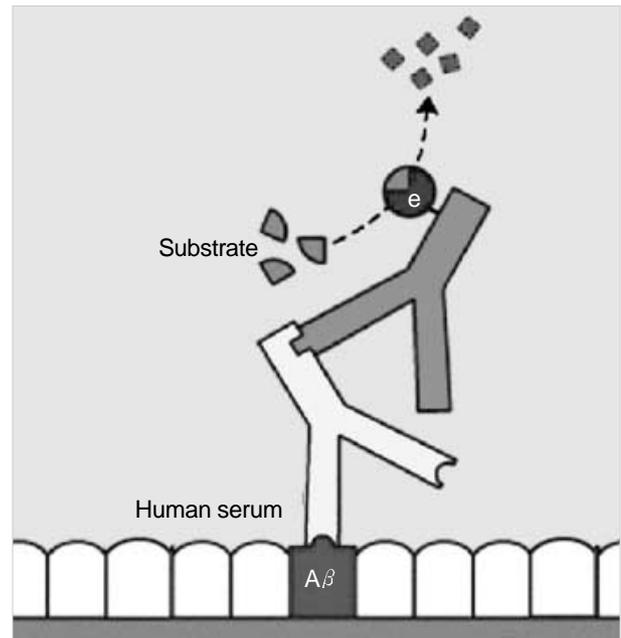


Fig. 1. Schematic figure for ELISA.

$A\beta$ 1-42 was coated on the plate and human serum was incubated to make $A\beta$ -antibody complex. Secondary antibody and substrate for detection were used to amplify $A\beta$ -antibody complex binding signal.

1:1로 혼합한 혼합물을 100 μL 씩 넣고 1M H_2SO_4 를 넣어 반응을 정지 시킨 후 450 nm 파장으로 발색정도를 측정하였다. ELISA 방법의 대략적인 모식도를 Fig. 1에 첨부하였다.

2. Patient information

AD환자의 대조 군으로 사용된 정상인 수는 166명이고, AD 환자는 삼성서울병원에 내원한 환자로 32명의 환자 혈청을 사용하였다. 알츠하이머 병으로 진단된 환자들은 모두 National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)의 probable 알츠하이머병 척도에 합당하였다[9]. 또한 이들은 문진, 신경학적 진찰, 뇌 촬영(CT 또는 MRI), 혈액검사(일반혈액검사, 일반화학 검사, 매독반응검사, 갑상선 기능검사, 비타민 B12/엽산 검사 등)를 통하여 치매를 일으키는 다른 병인(예를 들어 혈관성치매, 알코올 치매 등)은 없음을 확인되었다. Stroke 환자의 대조 군으로 사용된 정상인 수는 22명이고, stroke 환자는 아주대학교 병원에 내원한 환자로 그 수는 16명이었다. 이들 환자 군은 10시간 이내의 acute stroke 환자로 dementia가 발견되지 않은 환자이다. Idiopathic Parkinson's disease (IPD)의 경우 대조 군으로 사용된 정상인 수는 28명, IPD 환자 수는 11명으로 이들 환자는 서울아산병원 신경과에 내원한 환자로서 Mini-Mental State Examination (MMSE) test 결과가 24점 이상이고 Hoen & Yahr stage 2

Table 1. Demographic characteristics of normal control & AD patients

Patients	Age		30-39		40-49		50-59		60-69		70-79		80-89	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Alzheimer's Disease (n=32)				1	2	1	3	5	4	10	1	5		
Normal control (n=166)			2	4	12	5	28	25	44	22	8	10		

AD, Alzheimer's disease.

Table 2. Demographic characteristics of normal control & stroke patients

Patients	Age		30-39		40-49		50-59		60-69		70-79		80-89	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Stroke (n=16)	1			1			7	2	3	2				
Normal control (n=22)			1	2	4	4	6	3		2				

Table 3. Demographic characteristics of normal control & IPD patients

Patients	Age		30-39		40-49		50-59		60-69		70-79		80-89	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
IPD (n=11)				1		1	5	3	1					
Normal control (n=28)				1	3		14	9	1					

*IPD, Idiopathic Parkinson's disease.

이하 이며 치매 증상을 보이지 않는 환자군이었다(Table 1-3). 각 환자 군에 대한 정상 군은 age-matched control을 하기 위하여 각 병원에서 신경질환과 관련이 없는 건강한 성인들의 혈액을 채취하여 형성하였다.

3. 통계 처리

각 환자군 및 대조군의 OD 값을 근거로 mean±SEM을 구하였고 t-test를 통하여 두 군간의 통계적 유의성을 조사하였다.

결 과

AD 환자의 혈청 내에서 베타 아밀로이드 특이 항체 정도를 ELISA 방법을 이용해 정상인과 비교하여 보았을 때 AD 환자의 혈청에서 베타 아밀로이드 특이 항체의 양이 유의하게 낮았음을 확인하였다(Fig. 2). AD의 대조군인 정상인 군의 경우 베타 아밀로이드 항체 측정값이 1.75±0.04이고 AD 환자의 경우 1.28±0.06으로 통계적으로 유의한 차이 값을 나타내었다(t-test,

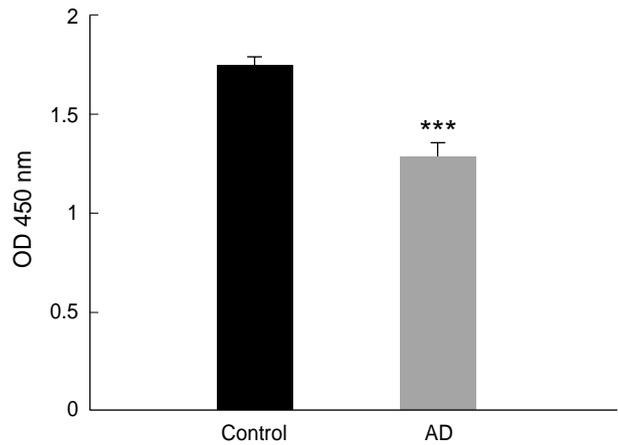


Fig. 2. Measurement of Aβ specific antibody in serum of AD patients. The levels of anti-Aβ antibody was significantly lower in AD compared to those with control (***: p<0.0001).

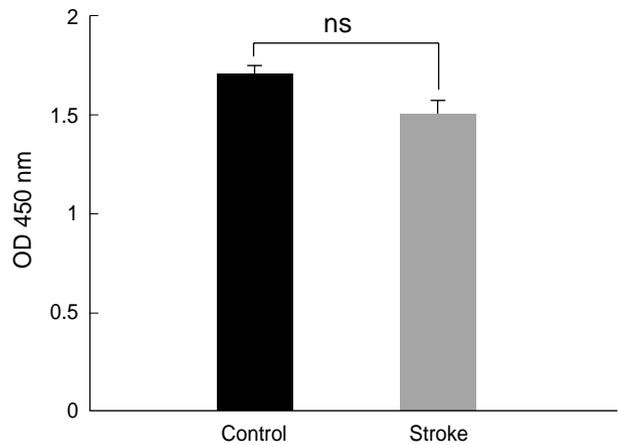


Fig. 3. Measurement of Aβ specific antibody in serum of acute stroke patients. There was no significant difference of Aβ specific antibody level in serum of acute stroke patient and normal control (ns: non significant).

p<0.0001). 이때 사용한 정상인 군은 AD 환자 군의 age matched control을 사용하여 AD 환자 군과 유사한 60-70대가 주요 연령 군이었다(Table 1).

AD가 아닌 뇌졸중 환자에서 베타 아밀로이드 특이 항체 정도를 측정하였을 때, 정상인 군은 1.70±0.04이고 뇌졸중 환자는 1.51±0.07로 정상인 대조 군과 비교하였을 때 유의한 값의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3). 또 다른 신경질환인 특발성 파킨슨병 환자의 경우에도 대조 군은 0.56±0.02이고, IPD 환자는 0.53±0.05로 뇌졸중 환자의 경우와 비슷하게 대조 군과 비교하였을 때 유의한 값의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4). 이때 사용한 뇌졸중 및 특발성 파킨슨병 환자들의 경우 치매 증상을 나타내지 않는 환자들만을 선별하여 사용하였다(Table 2, 3). 이때 그림에서 표시한 Y-축의 값은 OD 450 nm에서 읽은 수치를 직접적으로 표시한 것이며 각 실험군마다 서로 상이한 값을

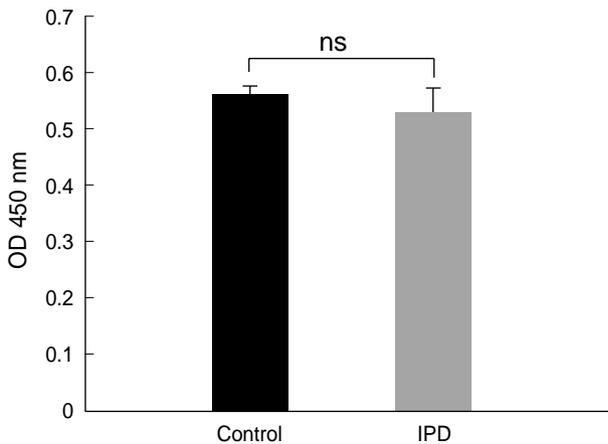


Fig. 4. Measurement of $A\beta$ specific antibody in serum of IPD patients. There was no significant difference of $A\beta$ specific antibody level in serum of IPD patient and normal control (ns: non significant).

나타내는 것이므로 각 실험 군 간의 비교는 적절하지 않으며 동일 실험 조건 하에서 대조 군과의 비교가 적절하다.

이러한 결과들은 혈청내의 베타 아밀로이드 특이 항체 양의 감소는 AD 환자에게서만 특이적으로 나타나는 현상임을 알 수 있었다.

고 찰

Schenk 등이 AD의 치료방법으로 vaccine의 개념을 도입하여 동물실험 결과를 발표하면서 AD의 치료와 진단을 위한 면역학적 접근 방법들이 시도되기 시작하였다[5-7]. 그 중 한 실험에 의해 사람의 APP의 돌연변이를 발현하는 AD 동물 모델에 노인반의 주요 구성 물질인 베타 아밀로이드를 복강 내로 투여하였을 때, 베타 아밀로이드 침착이 뇌의 해마 및 대뇌 피질 부위에서 관찰되지 않았다. 이들은 개체 내에 증가한 베타 아밀로이드에 의해 베타 아밀로이드 항체의 생성이 증가하여 이 항체에 의하여 노인 반에 있는 베타 아밀로이드가 제거되었을 것이라는 가설을 내세웠다[5, 6]. 그러나, Nicoll 등의 보고에 의하면 AD 환자에게 베타 아밀로이드(1-42 form) 50 μ g을 투여하여 임상실험을 실시하였을 때 심각한 과다 뇌 염증 반응을 일으키는 부작용을 발견하였다[10]. Bard 등은 passive vaccine의 개념을 도입하여 AD 동물 모델에 베타 아밀로이드의 항체를 투여하였을 때 대뇌피질과 뇌의 해마 부위에서 대조 군에 비해 노인 반이 감소하는 것을 보고하였다[6]. 또한 이렇게 베타 아밀로이드의 축적이 감소되었던 AD 동물 모델의 경우 visible platform test와 open field exploration test를 이용하여 공간학습 능력정도를 측정하였을 때, 공간학습 능력이 향상되어지는 결과를 보고하였다[11]. 이러한 결과는 베타 아밀로이드의 축적이 학습 및 인지기능 감소와 직접적으로 밀접한 연관이 있

다는 것을 보여주는 것이며, 베타 아밀로이드 항체가 이러한 베타 아밀로이드의 축적 혹은 제거에 관여할 것이라는 추측을 하게 되었다.

본 연구에서는 이러한 여러 가지 면역학적 실험 결과들을 바탕으로 하여 정상인의 경우, 혈액 내에 베타 아밀로이드를 특이적으로 인지하는 항체가 존재하는 것을 확인하였다. 또한 정상 쥐와 사람의 돌연변이 APP를 과 발현하여 사람의 뇌에서 생기는 노인 반과 유사한 베타 아밀로이드 침착을 일으키는 AD 동물모델 쥐의 경우, 정상 쥐에 비하여 AD 동물모델 쥐에서 베타 아밀로이드 특이 항체의 농도가 현저히 저하되어 있는 것을 발견하였다. 이러한 결과로부터 AD 환자의 경우, 정상인 보다 베타 아밀로이드 특이 항체의 양이 감소되어 있을 것이라는 가설을 세웠다. AD 환자의 혈청 내에서 베타 아밀로이드 항체 정도를 ELISA를 이용해 정상인과 비교하여 보았을 때 환자의 혈청에서 베타 아밀로이드 항체의 농도가 정상인에 비해 통계적으로 유의하게 낮음을 확인하였다. AD가 아닌 신경질환인 뇌졸중과 파킨슨병 환자들 중 치매 증상이 없는 환자 군에서 베타 아밀로이드 항체 정도를 측정하였을 때 정상인과 비교하여 유의한 차이를 얻지 못하였다. 이때 그림에서 표시한 Y-축의 값은 OD 450 nm에서 읽은 수치를 직접적으로 표시한 것이며, 각 실험군마다 서로 상이한 값을 나타내는 것이므로 각 실험군 간의 비교는 적절하지 않으며 동일 실험 조건 하에서 대조 군과의 비교가 적절하다. 향후 실험들간의 차이를 최소화하고 표준화하기 위한 방법적인 개선이 필요할 것이다.

이러한 결과로부터 AD 환자에서만 특이적으로 베타 아밀로이드 특이 항체가 감소하는 현상을 설명하기 위한 예측할 수 있는 가능한 기전 중의 하나로 정상인의 경우 혈액 내에 존재하는 자가항체인 베타 아밀로이드 항체가 systemic하게 생성되어지는 베타 아밀로이드와 결합하여 macrophage와 같은 대식세포에 의하여 제거되어서 전체 베타 아밀로이드의 양을 낮추게 될 것이라는 것이다. 또 다른 가능한 기전으로는 베타 아밀로이드-특이 항체 complex를 형성하여 혈액 내에 존재하더라도 complex의 size가 커서 베타 아밀로이드 단독으로 존재할 때보다는 BBB 투과율이 저하 될 것이므로 뇌 안으로 유입되는 베타 아밀로이드 양이 현저히 감소하게 되고 그 결과, 뇌 안의 베타 아밀로이드의 축적을 저지할 것으로 보인다. 그러나, AD 환자의 경우에는 자체 내 베타 아밀로이드 특이 항체의 양이 현저히 감소되어 있으므로 systemic하게 생성되어진 베타 아밀로이드를 충분히 제거하지 못해 남은 양의 베타 아밀로이드가 뇌 안으로 유입되어 축적되어질 것으로 보인다. 그러나, 본 연구 결과로부터 베타 아밀로이드 항체의 농도가 저하되어 나타나는 것이 AD의 원인이 되는 것인지 아니면 AD의 진전으로 인하여 나타나는 결과적인 산물인지는 알 수 없다. 이러한 것을 설명하기 위하여는 AD의 진행정도에 따라 베타 아밀로이드 항체의 양의 변화를 조사하여야 할 것이고 이를 위해서는 초기단계의 AD 환자(CDR 0.5)와 병이 어느 정도 진행되어진 AD 환자(CDR

2 이상)를 구분하여 베타 아밀로이드 항체를 측정하고 이들 간의 차이를 조사하여 보아야 할 것이다.

본 연구의 결과에서 나타나는 베타 아밀로이드 항체의 감소 현상은 AD 환자에게서만 유의하게 나타나는 결과로서 AD의 새로운 생화학적 진단 지표로서의 가능성을 보여준다고 할 수 있겠다. 이러한 연구 결과를 근간으로 하여 좀 더 임상과 연계된 연구들이 지속적으로 이루어진다면 AD의 진단에 이러한 지표를 사용할 수 있음은 물론 더 나아가 AD를 예방하는 기반을 가져다 줄 수 있으리라 기대한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 프론티어 사업의 일환인 뇌기능 활용 및 뇌질환 치료기술 개발 연구사업 및 프로테오믹스 이용기술 개발 사업의 연구비와 보건복지부 특정센터지원(치매 치료제 및 예방제 개발센터-디지털 바이오텍) 연구비로 수행되었습니다.

참고문헌

- Selkoe DJ. *The Molecular Pathology of Alzheimer's disease*. *Neuron* 1991; 6: 487-98.
- Clippingdale AB, Wade JD, Barrow CJ. *The amyloid- β peptide and its role in Alzheimer's Disease*. *J. Peptide Sci.* 2001; 7: 227-49.
- Selkoe DJ. *Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy*. *Physiological Reviews* 2001; 81: 741-66.
- Selkoe DJ. *The Cell Biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease*. *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 447-53.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. *Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse*. *Nature* 1999; 400: 173-7.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke R, Games D, Grajeda H, et al. *Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease*. *Nature Medicine* 2000; 6: 916-9.
- Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, et al. *Immunization reverses memory deficits without reducing brain A burden in Alzheimer's disease model*. *Nature neuroscience* 2002; 5: 452-7.
- Hampel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M, et al. *Value of CSF beta-amyloid (1-42) and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment*. *Mol Psychiatry*. advance online publication 30 Dec 2003.
- Mckhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease*. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
- Nicoll JAR, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. *Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report*. *Nature medicine* 2003; 9: 448-52.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, et al. *A β peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in model of Alzheimer's disease*. *Nature* 2000; 408: 979-82.