

長寿医療研究開発費 2022年度 総括研究報告

長寿医療研究のための技術基盤形成に資する基礎技術研究

①老年病のプロテオミクス（21-27-1）

主任研究者 渡邊 淳 国立長寿医療研究センター 共同利用推進室（室長）

研究要旨

研究推進基盤センターは、国立長寿医療研究センター（以下 NCGG）内で実施される研究を技術的に支援する組織である。網羅的な生体分子解析技術や遺伝子改変技術等の向上は日進月歩で、老年病に関する高度専門医療に資する研究開発を推進する NCGG としては、常に新しい技術の情報収集とそれらの可能な限りの実装を行なっているだけでなく、NCGG 独自の研究にマッチした既存技術の創意工夫なども行なっている。

本研究では、老年病患者試料等の解析や、その解析から得られた疾患関連候補分子の性状分析、機能解析などを実施し、既存技術の有用性を立証して研究支援に応用できる基盤を構築する。現在、分析機器の性能向上により、疾患バイオマーカーの探索研究が盛んとなっており、NCGG では認知症の血液マーカー分子の探索研究が複数進行している。そこで本研究では質量分析装置を用い、アルツハイマー病における血中タンパク質の網羅的解析手法を構築し、特定の因子の変動解析を行った。

主任研究者

渡邊 淳 国立長寿医療研究センター 共同利用推進室（室長）

A. 研究目的

加齢による身体機能の低下や疾患は、年齢とともに生体内で生ずる様々な変化が積み重なった結果として引き起こされる。そこで、これら疾患の発症原因や病態を解明し、その理解に立脚して予防法や治療法を開発するにあたり、加齢に伴う生体内の変化を分子レベルで正確に解析する必要がある。本研究では、老年病患者試料等の解析を通して研究支援に応用できる基盤を構築する。分析機器の性能向上により、疾患バイオマーカーの探索研究が盛んとなっており、NCGG では認知症の血液マーカー分子の探索研究が複数進行している。今年度は質量分析装置を用いたアルツハイマー病（AD）の血中タンパク質の網羅的解析と血中タンパク質の変動解析を行った。

B. 研究方法

1) 血中タンパク質の網羅的解析

AD 患者及び認知機能正常者の血漿を用い、血液中に高濃度に含まれる主要な 14 種類のタンパク質の抗体が固定化されたアフィニティーカラムを用いて、液体クロマトグラフィーで分離を行った。素通り画分と吸着した画分に分けた後、各々の画分はトリプシンで消化し、質量分析を行った。同定されたタンパク質はリスト化し、AD 及び認知機能正常者の比較で、ApoB 等のタンパク質に違いがみられたことから、AD、血管性認知症 (VD)、レビー小体型認知症 (DLB)、前頭側頭型認知症 (FTLD)、正常圧水頭症 (NPH) といった認知症のみならず、その他の疾患、認知症の前段階である軽度認知障害 (MCI) 及び認知機能正常者 (CN) の血漿を用いて、ウェスタンブロットにより確認を行った。質量分析では捉えることが困難なタンパク質に関しては、サンドイッチ ELISA やウェスタンブロットを用いた解析を行った。AD では脳内炎症が起こっていることから、sTREM2、MCP-1/CCL2、YKL-40 と Clusterin、fractalkine、Free BDNF、TNF- α 、IL-1 β /IL-1F2、IL-6、IL-8/CXCL8、IL-10、C-Reactive Protein/CRP、GFAP の解析を行った。

2) 液性因子の変動解析

AD、VD、DLB、FTLD、NPH といった認知症のみならず、その他の疾患、認知症の前段階である MCI 及び認知機能正常者 (CN) の血漿を用いて、AD に密接に関連するタンパク質で血液中に分泌されている可溶性の APP である sAPP や ApoE、ニューロフィラメント L (NfL) といったタンパク質についても、それらの抗体を用いたウェスタンブロットによる解析を行った。

3) ApoEの生化学的解析

血漿中のApoEの解析から、ApoE4を持つ検体では、ごく微量であるが、C末の抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、スメアを呈する変性したApoEが見られた。このことから、ApoE4の特徴を調べるために各リコンビナントApoE (rApoE) を用いて生化学的解析を行った。初めにApoEの蓄積による変化をみるため、rApoEを用い、リン酸緩衝液中、長時間インキュベートとすることで、ApoEがどのように変化するかをSDS電気泳動及び抗ApoE抗体を用いたウェスタンブロットで解析を試みた。ApoE3 (0.1 μ g/ul) 及びApoE4 (0.1 μ g/ul) を0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) 中で3日 (3D)、7日 (7D)、10日 (10D)、20日 (20D)、1ヶ月 (1M)、2ヶ月 (2M)、3ヶ月 (3M) と37°Cでインキュベートを行った。また、等量のrApoE2、rApoE3、rApoE4を用いて、各種プロテアーゼに対する反応性の違いを調べた。各rApoE (0.8 μ g/ul) を0.1MTris-HCl (pH7, 8, 9) 中、リシルエンドペプチターゼ (Lys-C) (0.02 μ g/ul) を用い、37°Cにおいてovernightで反応させた。各々の消化物はSDS電気泳動後、それぞれCBB染色、銀染色及びエピトープが異なる抗ApoE抗体を用いたウェスタンブロットで解析を試

みた。同様に各rApoE (0.8ug/ul) を0.1MTris-HCl (pH7,8,9) 中、トリプシン (0.02ug/ul) を用い、37°Cにおいてovernightで反応させた。各々の消化物はSDS電気泳動後、CBB染色、銀染色及び抗ApoE抗体を用いたウェスタンブロットで解析を試みた。

(倫理面への配慮)

臨床試料の解析については、倫理・利益相反委員会によって法令（人を対象とする医学系研究に関する倫理指針）に定められた基準への適合性について審査・承認を得たうえで行った。また、当センターのバイオバンクに保存されている生体試料は既に研究に利用することを許可され、番号化されており、研究者が患者の個人情報を知ることができないようになっている。

C. 研究結果

1. 血中タンパク質の網羅的解析

AD 患者及び認知機能正常者の血漿を用いた質量分析によって同定されたタンパク質のリストを作成し、変化が見られたタンパク質について、AD、VD、DLB、FTLD、NPH、MCI 及び認知機能正常者 (CN) の血漿を用いて、各々それらの抗体を用いたウェスタンブロットにより、変化がないか確認を行った。AD 及び認知機能正常者の比較で、ApoB のタンパク質に違いがみられたことから、ApoB 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、AD と NPH で増加していた。今後、他のタンパク質での検討及び検体数を増やし変化がないかさらに解析を行う予定である。

ミクログリア活性化マーカーの sTREM2、ミクログリア炎症反応マーカーの MCP-1/CCL2、アストロサイト活性化マーカー YKL-40 と Clusterin、神経細胞-ミクログリア相互コミュニケーションマーカーの fractalkine、抗炎症メディエータ Free BDNF、また、炎症系サイトカインとして TNF- α 、IL-1 β /IL-1F2、IL-6、IL-8/CXCL8、IL-10、C-Reactive Protein/CRP、さらに神経炎症関連蛋白として GFAP の血清を用いたサンドイッチ ELISA を用いた解析で、MCP1 と TREM2 が脳内炎症と特に相関するという結果が出ており、更なる解析を行っている。

2. 液性因子の変動解析

AD の初期の病理学的変化である老人斑の構成タンパク質は A β である。このアミロイド β タンパク質前駆体をコードする APP は、 α セクレターゼもしくは β セクレターゼによって切断され、可溶性の APP である sAPP α もしくは sAPP β が細胞外に分泌する。 β セクレターゼによって切断された C 末端側の APP 切断産物はさらに γ セクレターゼ (プレセニリン) によって切断され A β を産生する。これらによって、脳内からさまざまなアミロイドベータ (A β) ペプチドおよびその他の APP 切断産物が産生される

(図1)。

APP 抗体 (22C11) を用いたウエスタンブロットで脳脊髄液(CSF)中の約 100kDa の sAPP は 5ul もあれば容易に検出することが可能である (図2)。一方で、約 4kDa の Aβ に関しては、CSF5ul では Aβ 抗体 (6E10) を用いたウエスタンブロットで全く検出できず、共通のエピトープ部分を有する sAPP α のみが検出されている (図2)。Aβ を検出するには大量の CSF を用いた免疫沈降で濃縮するか、高感度のサンドイッチ ELISA で検出するしかない。CSF 中の Aβ 42 はおよそ 100pM 程度、一方 sAPP は数 10nM 程度であるとされており圧倒的に量が異なる (Olsson A et al Exp Neurol. 74-80, 2003)。

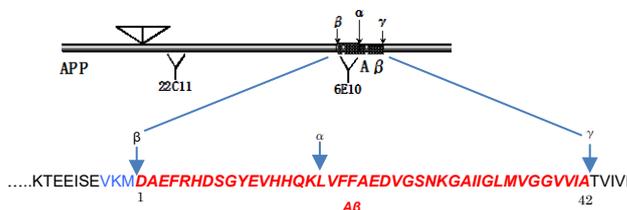


図1. APPの切断部位とAβ

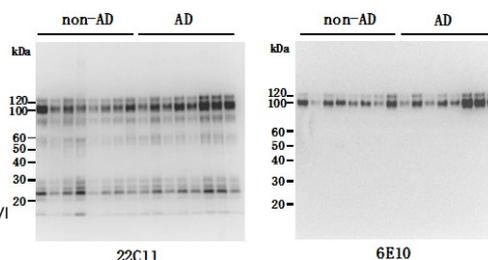


図2. CSF 中の sAPP のウエスタンブロット

すなわち Aβ を検出するよりも sAPP を検出する方が遥かに容易である。血漿中でも検討の結果、僅か 1ul で sAPP を検出できることを確認しており、AD、VaD、DLB、FTLD、NPH、その他、MCI 及び CN の血漿を用いてウエスタンブロットによって比較を試みた。APP 抗体 (22C11) で反応する sAPP は MCI 及び CN と比較して AD、VaD、DLB、FTLD、NPH で増加しており (図3)、6E10 で反応する sAPP は AD、VaD、NPH、MCI で増加していることが判明した (図4)。

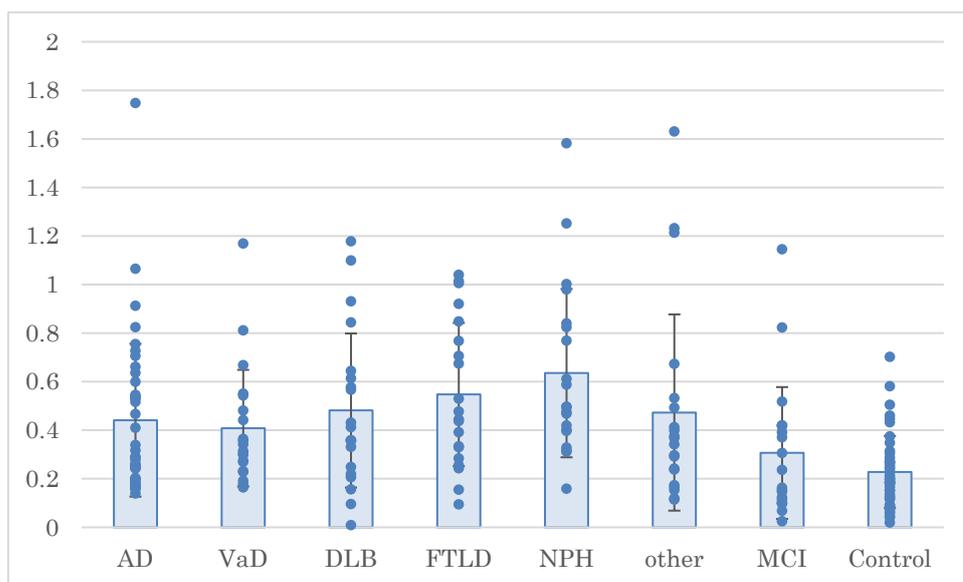


図3.血漿中の APP 抗体 (22C11) を用いたウエスタンブロットによる sAPP の比較

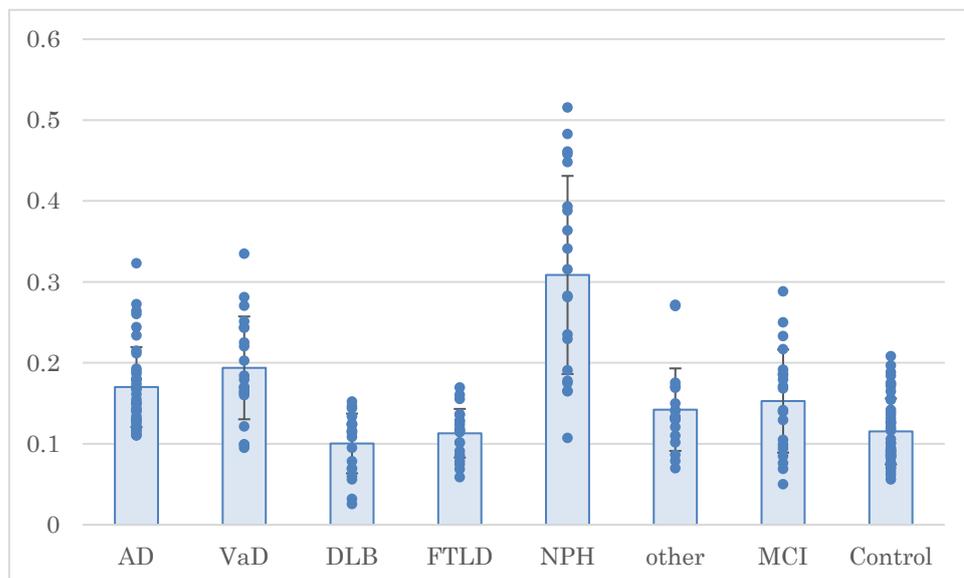


図4.血漿中の 6E10 を用いたウエスタンブロットによる sAPP α の比較

その他、AD の危険因子である ApoE 抗体を用いたウエスタンブロットでは、AD と DLB で増加していた。また、神経変性のマーカーであるニューロフィラメント L (NfL) では AD と FTLD で増加していた。このように血中で変動している幾つかのタンパク質を比較定量することによって、認知症の鑑別診断ができる可能性があることが分かった。今後、他のタンパク質での検討及び検体数を増やし変化がないか解析を行う予定である。

3. ApoE の生化学的解析

ApoE の蓄積による変化をみるため、rApoE3 及び rApoE4 を用い、リン酸緩衝液中、長時間インキュベートとすることで、ApoE3 及び ApoE4 は分解とともに、重合がおこり、変性したスメア状の ApoE が観察された。しかしながら、ApoE3 と ApoE4 では分解と重合のパターンは異なっていた。

さらに、ApoE のプロテアーゼに対する反応性をみるため、等量の各 rApoE を Lys-C やトリプシンで消化し、各々の消化物を SDS 電気泳動後、CBB 染色、銀染色もしくはエピトープの異なる ApoE 抗体を用いたウエスタンブロットによってその反応性を比較した。その結果、CBB 染色により、ほとんどの ApoE が Lys-C によって分解されているが、銀染色では、約 30kDa の Lys-C と消化物が、pH9 で約 35kDa に ApoE4 のモノマーが観察された。また、ApoE4 の pH9 で ApoE の C 末の抗体 (A299) を用いたウエスタンブロットにおいて、重合がおこり、スメア状の ApoE が観察された。同様にトリプシン消化では、CBB 染色により、ほとんどの ApoE がプロテアーゼによって分解されているが、銀染色では、25kDa のトリプシンと消化物が見られた。ウエスタンブロットでは、pH7 で ApoE2 の重合とスメアがみら

れ、pH9 で約 35kDa に ApoE4 のモノマーが観察された。

D. 考察と結論

AD を始めとする認知症は、脳内の神経細胞が変性もしくは脱落しており、認知症が進行した段階では、治療が困難であると思われる。出来る限り早期に神経の変性の兆候を見つけておくことができれば、適度な運動や十分な睡眠とり、生活習慣病（高血圧、肥満など）の予防に気をつけるとともに、様々な介入によって、発症のリスクを減らすことが期待される。もし将来的な発症リスクを健康診断等の血液検査でモニターできれば、患者数の増加を抑えることが期待できる。例えば AD の場合、80 歳で発症するならば、その 20-30 年前には A β が主な構成成分である老人斑が、また、10-15 年前には微小管結合タンパク質タウが主な構成成分である神経原線維変化が脳内に形成されることが明らかになっている。すなわち 20-30 年前から脳内の変化は始まっている。ただ血液中の A β やタウはごく微量であり、それらの検出には質量分析装置もしくは SIOMA 等の高感度 ELISA の精密機器による分析が必要で費用も高額となる。

血液バイオマーカーは様々な疾患で注目されていることから、質量分析を用いた血中タンパク質の網羅的解析は研究者に有用な情報となり、同様の解析を必要とする研究にとって基盤となる技術である。しかしながら、現在まで質量分析によって得られた結果が、ApoB 以外ではウェスタンブロットによって確認できていない。質量分析では翻訳後修飾や変異によりペプチドの同定率が低下した結果、スコアが変動した可能性が考えられる。また、ウェスタンブロットにおいても抗体のエピトープ部分が何らかの翻訳後修飾や変異によって反応性に違いが出ることも考えられる。血漿タンパク質は特に糖鎖等の修飾がなされているので、今後これらの修飾も考慮に入れ、解析を行っていく予定である。しかしながら、本研究で解析した ApoB、sAPP、ApoE、NfL に関しては量も多く、ウェスタンブロット等の簡易な方法で検出が可能であり、これらを組み合わせることで、AD の早期診断が出来ないか検討している。

これまでの血漿中の ApoE の解析から、ApoE4 を持つ検体では、ごく微量であるが、C 末の抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、スメアを呈する変性した ApoE が見られた。このことから、ApoE4 の特徴を調べるために各 rApoE を用いて生化学的解析を行った。rApoE を長時間インキュベート、すなわち、長期間の蓄積でもスメア状の ApoE が観察された。また、各種 rApoE のプロテアーゼに対する感受性を調べることで、ApoE4 の特性を解析したところ、Lys-C を用いた pH9 の消化条件下で、大部分は消化されるが、ごく一部は ApoE4 の重合とスメアが観察された。一方でトリプシンを用いた pH7 の消化条件下では、大部分は消化されるが、ごく一部は ApoE2 の重合とスメアが観察された。すなわち、pH の変化によって ApoE の構造が変化し、酵素消化でできる ApoE のフラグメントのパターンがアイソフォームで異なることが予想される。これらごく一部のフラグメントが重合のコアとなり、スメアを呈するのではないかと考えられた。現在、これらの条件下でできたフラグメントの質量分析を行い、それらが重合のシードにならないか解析を行っている。また、今

後患者の検体からも、生体内でできたごく一部のフラグメントを解析し、rApoE と類似のフラグメントが同定できないか解析を行っている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhou C, Jung CG, Kim MJ, Watanabe A, Abdelhamid M, Taslima F, Michikawa M. Insulin Deficiency Increases Sirt2 Level in Streptozotocin-Treated Alzheimer's Disease-Like Mouse Model: Increased Sirt2 Induces Tau Phosphorylation Through ERK Activation. *Molecular Neurobiology*, 2022; Sep;59(9):5408-5425.
- 2) Yasuno F, Watanabe A, Kimura Y, Yamauchi Y, Ogata A, Ikenuma H, Abe J, Minami H, Nihashi T, Yokoi K, Hattori S, Shimoda N, Kasuga K, Ikeuchi T, Takeda A, Sakurai T, Ito K, Kato T. Estimation of blood-based biomarkers of glial activation related to neuroinflammation. *Brain Behav Immun Health.*, 2022 Nov 5;26:100549.
- 3) Yasuno F, Kimura Y, Ogata A, Ikenuma H, Abe J, Minami H, Nihashi T, Yokoi K, Hattori S, Shimoda N, Watanabe A, Kasuga K, Ikeuchi T, Takeda A, Sakurai T, Ito K, Kato T. Involvement of inflammation in the medial temporal region in the development of agitation in Alzheimer's disease: an in vivo positron emission tomography study. *Psychogeriatrics*. 2022 Nov 20.

2. 学会発表

- 1) 武倉アブドグプル, 鈴掛雅美, 篠原充, 人見淳一, 渡邊 淳, 新堂晃大, 富本秀和, 長谷川成人, 里直行. DS タウを用いたタウ伝播における慢性脳低灌流の影響の解明 第41回日本認知症学会学術集会 2022年11月26日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし