

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

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。そこで本研究では質量分析装置を用いた血中タンパク質の網羅的解析とアルツハイマー病（AD）関連タンパク質の変動解析を行った。

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をとり、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。

これまで脳脊髄液（CSF）バイオマーカーでは、A β 42、タウ p-tau181、total-tau を測定し、アミロイド（A）、タウ（T）、神経変性（N）によって、ADの診断を行っていたが、タウ（T）には p-tau231 や p-tau217、神経変性（N）には neurofilamentL（NfL）等が加えられ、より精度の高い診断が可能となっている。しかしながら、脳脊髄液の採取は侵襲性が高いことから、血液バイオマーカーの開発が盛んに行われており、アミロイド（A）では A β 42/A β 40、タウ（T）では p-tau181、p-tau231 や p-tau217、神経変性（N）では total-tau、NfL を測定するといった、これまでのバイオマーカーに新たなバイオマーカーを加えた測定法の開発がなされている。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。そこで、本研究では量的に多く、ADに関連したタンパク質の測定によって、ADの早期診断が出来ないか検討を行った。解析した sAPP、ApoE、ApoB、ApoJ、Haptoglobin に関しては量も多く、ウエ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。また、ADの危険因子である ApoE が A β のオリゴマー化を促進し、ApoE のアイソフォームの違い

によって、プロテアーゼに対する反応性が異なることが判明した。

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)

研究期間 2021年4月1日～2024年3月31日

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。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、さらには AD の危険因子である ApoE の生化学的解析を行った。

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、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 を用いた解析を行った。特に 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 40 例、血管性認知症 (VD) 20 例、レビー小体型認知症 (DLB) 20 例、前頭側頭型認知症 (FTLD) 20 例、正常圧水頭症 (NPH) 20 例といった認知症のみならず、その他の神経変性疾患 20 例、認知症の前段階である軽度認知障害 (MCI) 20 例及び認知機能正常者 (CN) の血漿 43 例を用いて、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 といったタンパク質について、それらの抗体を用いたウエ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

リコンビナント (r) ApoE2、ApoE3、ApoE4 (和光純薬) を用いて、各アイソフォームと A β 1-40合成ペプチド(ペプチド研) との結合実験を行った。rApoEに各々5 μ MのA β 1-40を加え、37°Cで50mM Tris-HCl (pH7もしくはpH9)で18時間反応させた。その変化をSDS電気泳動後、銀染色もしくはA β 抗体(6E10)、もしくは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。また、A β のオリゴマー化を見るために、rApoEや5 μ Mコレステロールの添加も試み、A β オリゴマー抗体 (A11)を用いたウエスタンブロットにより、A β のオリゴマー形成実験を試みた。さらにApoE2、ApoE3、ApoE4の違いを明らかにするために、プロテアーゼに対する反応性の違いを解析した。各rApoE (0.8ug/ul) を0.1MTris-HCl (pH7, 8, 9) 中、Lys-C (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、それぞれCBB染色、銀染色及びエピトープが異なる抗ApoE抗体を用いたウエ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、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抗体を用いたウエ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が必要である。

ウエスタンブロット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を用いた解析を行った。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していた。

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 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)。

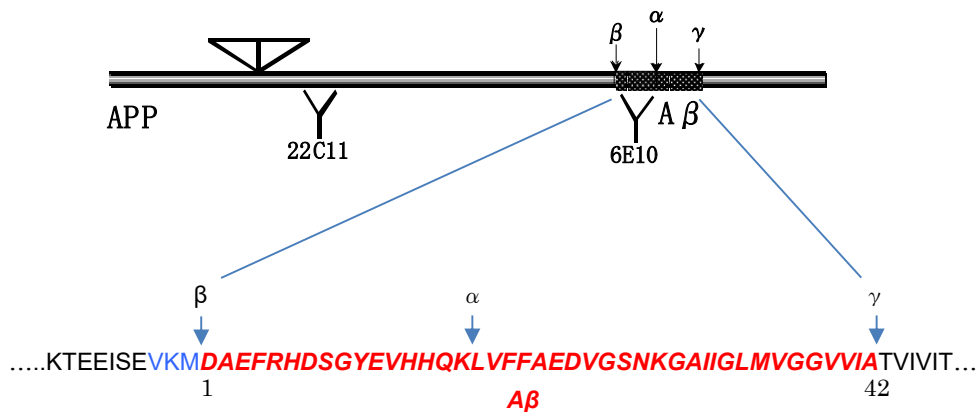


図1. APPの切断部位とA β

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 5 μ l 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 A β に関しては、CSF 5 μ l では A β 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)。

A β 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 A β 42 はおおよそ 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)。すなわち A β 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 1 μ l 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。

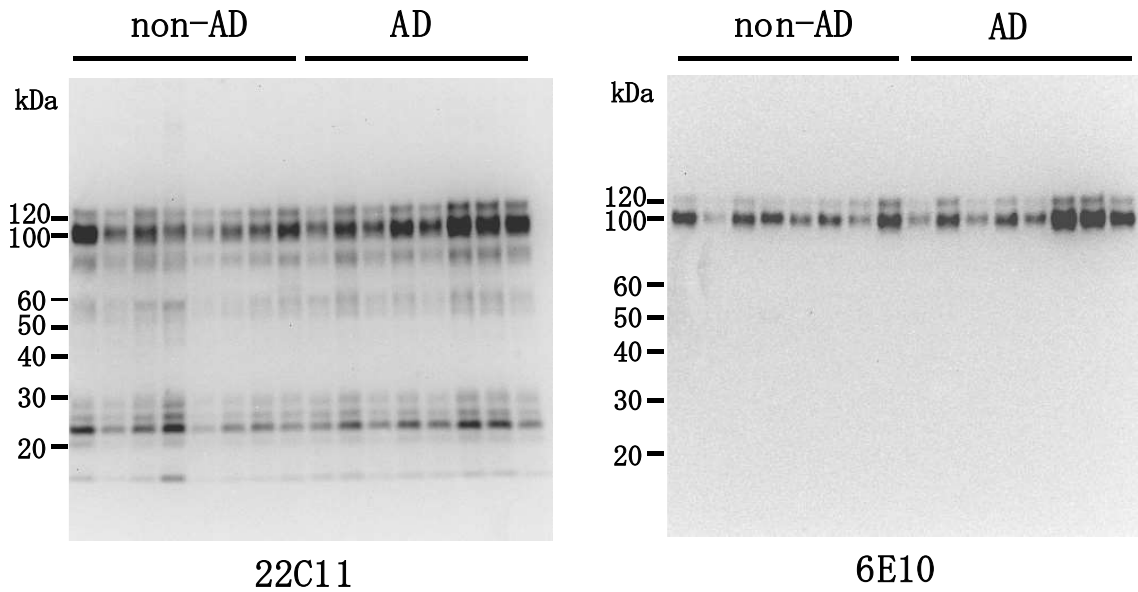


図 2. CSF 中の sAPP のウエスタンブロット

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 左)、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 3 右)。

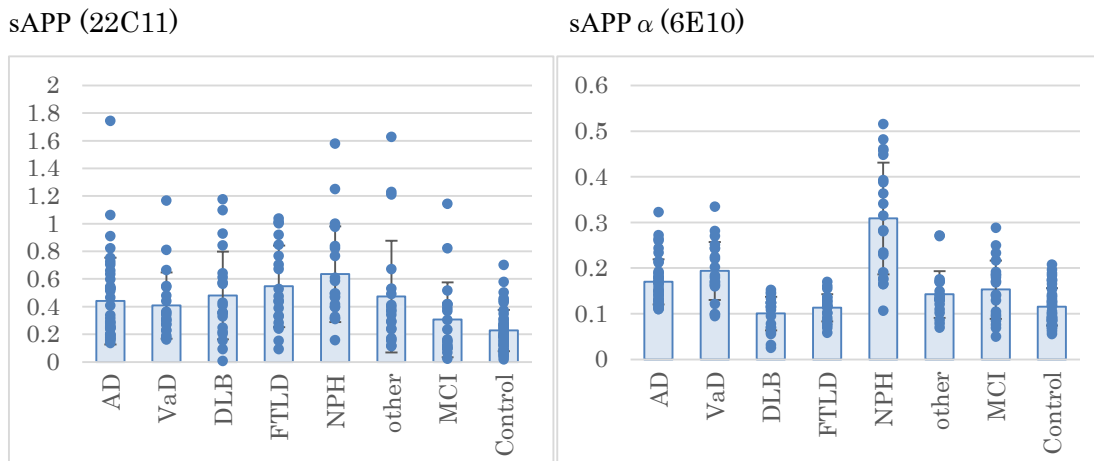
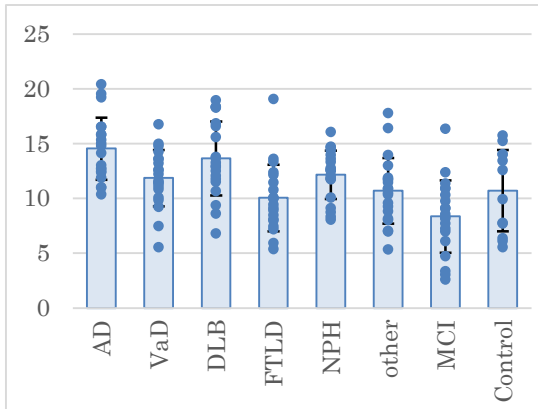


図 3. 血漿中のウエスタンブロットによる sAPP (左) と sAPP α (右) の比較

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 (図 4 左)。また、ApoB 抗体を用いたウエスタンブロットでは、AD と NPH で増加し、VaD、DLB、FTLD、other、MCI で減少していた (図 4 右)。

ApoE



ApoB

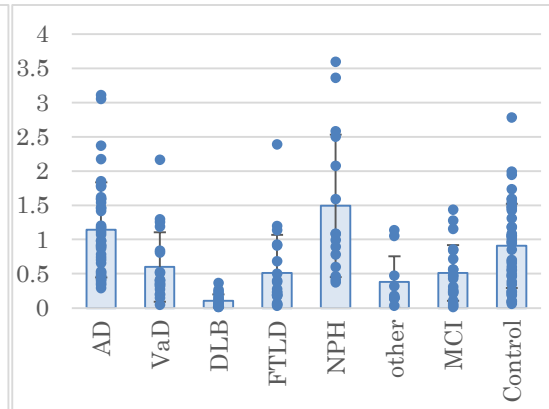
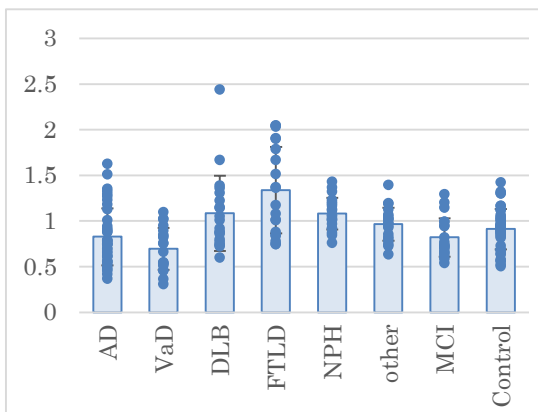


図4. 血漿中のウエスタンブロットによる ApoE (左) と ApoB (右) の比較

さらに ApoJ 抗体を用いたウエスタンブロットでは FTLD, NPH で増加し、VaD で減少していた (図5左)。Haptoglobin に関しては、AD で減少していた (図5右)。

ApoJ



Haptoglobin

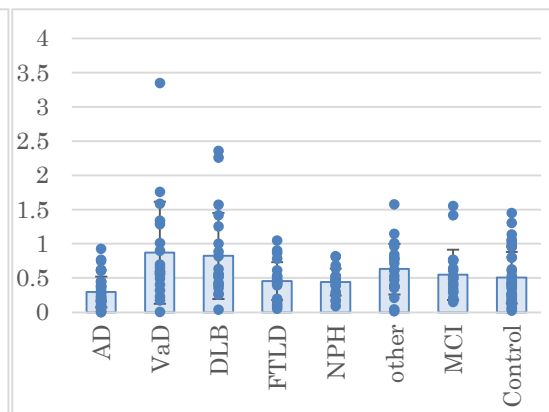


図5. 血漿中のウエスタンブロットによる ApoJ (左) と Haptoglobin (右) の比較

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する必要がある。

3. ApoE タンパク質の生化学的解析

ApoE の 1 アミノ酸置換によって AD 病態が進行することから、大多数の孤発性の遅発性 AD で、ApoE のアイソフォームの違いによって、A β の重合にどのように影響するかを調べることは重要である。これまで、ApoE が A β と結合することが報告されているため、リコンビナント ApoE (rApoE) を用いて、各アイソフォームと A β 1-40 との結合実験を行った。

A β 1-40 合成ペプチドを pH7 もしくは pH9、一晩 37°C でインキュベートし、A β 抗体(6E10) もしくは A β オリゴマー抗体 (A11)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 (図 6)。その結果、Tris-HCl(pH9) の条件下で、A β 1-40 単独でオリゴマー抗体 A11 は反応せず、rApoE2、rApoE3、rApoE4 を添加した場合でも、ほとんど反応しなかった。Tris-HCl(pH7) の条件下では A β 1-40 単独で若干反応し、rApoE の添加によって 80-100kDa 付近にブロードな強い反応性を示した。また、コレステロールの添加についてはほとんど影響がなかった。

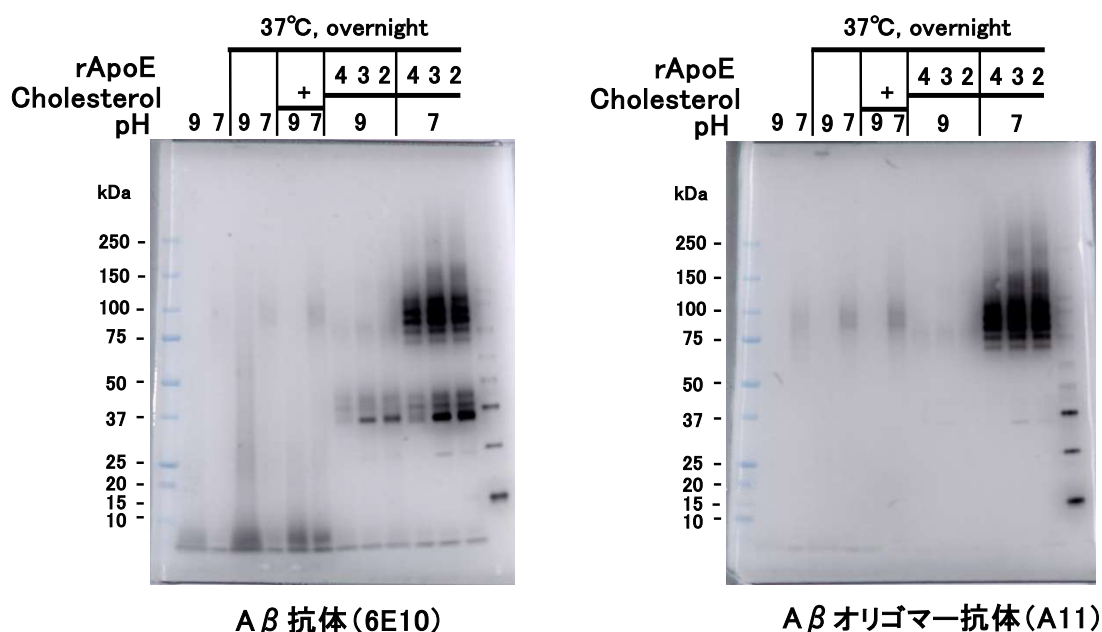


図 6. ApoE のアイソフォーム添加による A β の重合

次に rApoE のプロテアーゼに対する反応性を調べることで、ApoE4 の特性の解析を試みた。各 rApoE をプロテアーゼ Lys-C を用い消化し、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 抗体を用いたウエスタンブロットで解析を試みた (図 7)。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、重合がおこりスミア状の ApoE が観察された。(上図の左上は 0.04ug/ul (反応に用いた rApoE の 1/20) の未反応の rApoE である。) 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 の重合とスミアが観察された。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た。

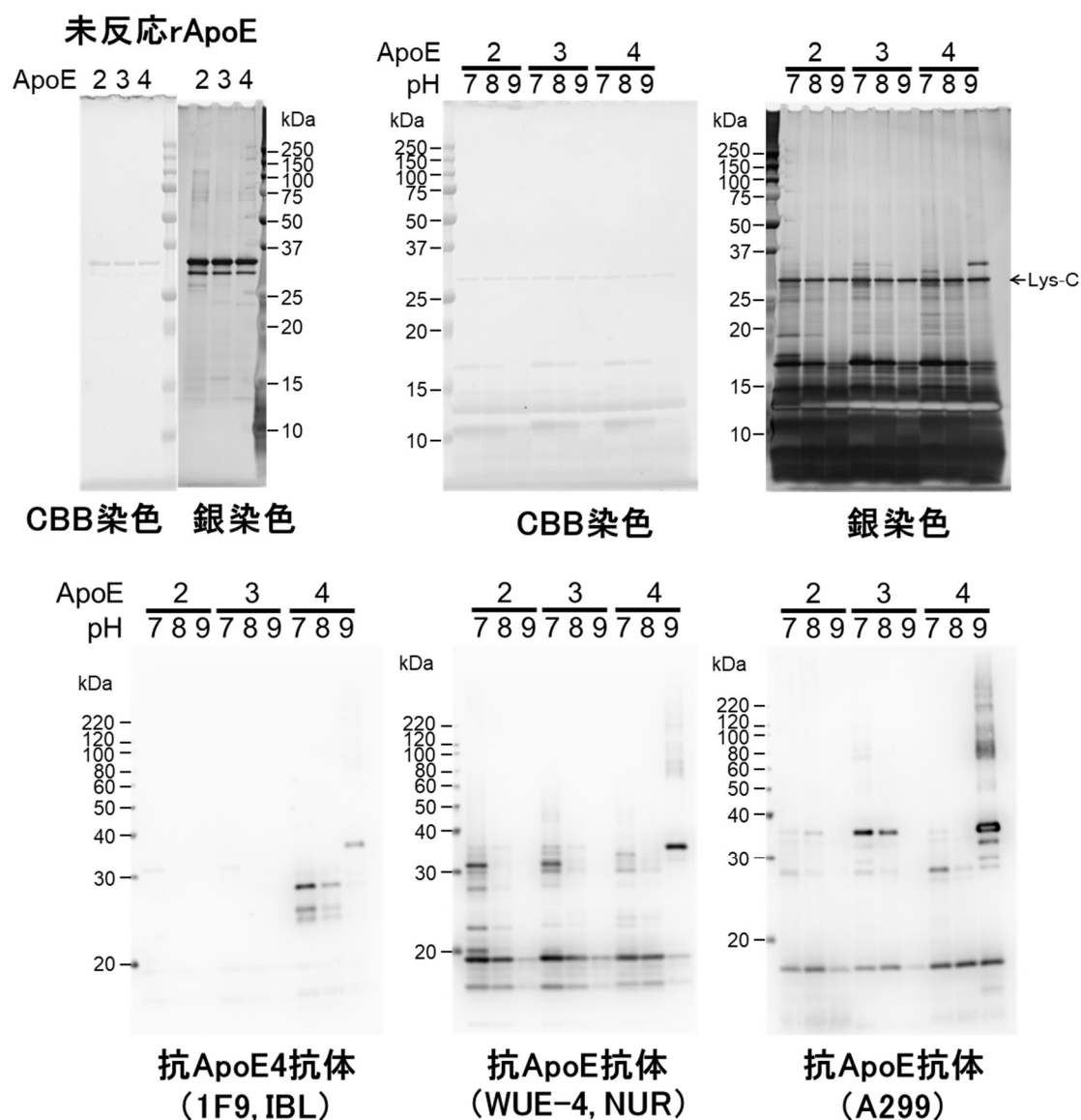


図 7. ApoE のアイソフォームの Lys-C プロテアーゼに対する反応性の違い

D. 考察と結論

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、解析を行うことが必要である。しかしながら、本研究で解析した ApoB、sAPP、ApoE に関しては量も多く、ウエ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。

ADの治療薬として日本でも「LEQEMBI」（レカネマブ）が正式承認された。レカネマブはAD患者の脳内に蓄積するA β を除去する抗体薬であり、記憶障害や理解力の低下などが起こる軽度認知障害（MCI）や軽度認知症の患者の症状の進行を平均2～3年遅らせる効果があるとされている。ただし、これまでにレカネマブで治療を受けたApoE4ホモ接合体である患者は、ヘテロ接合体や非保有者の患者と比較して、症候性や重篤、および画像判定による重度を含むアミロイド関連画像異常（ARIA）の発現率が高くなるとされている。おそらく、ApoE4によってA β 凝集体が高度に蓄積している、もしくは何らかの凝集パターンの変化があることが推測される。

本研究では、各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異なることが予想された。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。今後、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が必要である。また、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が必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2021年度

なし

2022年度

- 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. *Mol Neurobiol*,

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.

2023年度

- 1) 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. Neuroimaging biomarkers of glial activation for predicting the annual cognitive function decline in patients with Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun.*, 2023 Aug 28;114:214-220. doi: 10.1016/j.bbi.2023.08.027.
- 2) Sakamoto S, Nagasaki A, Shrestha M, Shintani T, **Watanabe A**, Furusho H, Chayama K, Takata T, Miyauchi M. Porphyromonas gingivalis-odontogenic infection is the potential risk for progression of nonalcoholic steatohepatitis-related neoplastic nodule formation. *Sci Rep.* 2023 Jun 8;13(1):9350. doi: 10.1038/s41598-023-36553-y.
- 3) Panahi M, Hase Y, Gallart-Palau X, Mitra S, **Watanabe A**, Low RC, Yamamoto Y, Sepulveda-Falla D, Hainsworth AH, Ihara M, Sze SK, Viitanen M, Behbahani H, Kalaria RN. ER stress induced immunopathology involving complement in CADASIL: implications for therapeutics. *Acta. Neuropathol. Commun.*, 2023 May 8;11(1):76. doi: 10.1186/s40478-023-01558-1.

2. 学会発表

2021年度

なし

2022年度

- 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 (ハイブリッド開催) .
- 2) 安野史彦, 木村泰之, 小縣 綾, 阿部潤一郎, 南 博之, 二橋尚志, 横井克典, 服部沙織, 下田修義, **渡邊 淳**, 春日健作, 池内 健, 武田章敬, 櫻井 孝, 伊藤健吾, 加藤隆司. 神経炎症と認知症アジテーション症状との関係:生体内 PET イメージング研究. 第41回日本認知症学会学術集会. 2022年11月26日. 東京 (ハイブリッド開催) .

2023年度

- 1) 山内夢叶, 渡邊 淳. ApoE のアイソフォームのプロテアーゼに対する反応性の違い. 第31回日本医学会総会 6NC リトリートポスターセッション, 2023年4月22日. 東京
- 2) Effects of chronic cerebral hypoperfusion on tau propagation, Gheni G, Shinohara M, Suzukake M, Shindo A, Tomimoto H, Watanabe A, Hasegawa M, Sato N, IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, Yokohama, Japan, June 14, 2023
- 3) Involvement of inflammation in the medial temporal region in the development of agitation in Alzheimer's disease: an in vivo positron emission tomography study, 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, IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, Yokohama, Japan, June 14, 2023
- 4) 武倉アブドグプル, 篠原充, 鈴掛雅美, 篠原充, 新堂晃大, 渡邊 淳, 富本秀和, 長谷川成人, 里直行. 慢性脳低灌流はタウの蓄積伝播を抑制する. 第42回日本認知症学会学術集会, 2023年11月25日. 奈良.
- 5) 安野史彦, 渡邊 淳, 木村泰之, 山内夢叶, 小縣 綾, 阿部潤一郎, 南 博之, 二橋尚志, 藤井克典, 服部沙織, 下田修義, 春日健作, 池内 健, 武田章敬, 櫻井 孝, 伊藤健吾, 加藤隆司. アルツハイマー型認知症における精神行動症状と血漿 IL-6 濃度の関係について. 第42回日本認知症学会学術集会. 2023年11月24日. 奈良.

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