

長寿医療研究委託事業  
総括報告書

高齢者の健康及び疾病状態の把握のための  
新たなマーカー(遺伝子・蛋白等)の探索と分析に係る研究

研究代表者 新飯田俊平(国立長寿医療センター)

体内分子を網羅的に探索する各種 Omics 法や血中マイクロパーティクル(MP)の解析から、加齢や疾患に関わるバイオマーカー分子の探索を進めている。本年度は、疾患モデル動物の血液や脳組織等を中心に解析を行った。その結果、脳血管障害のモデルラット脳のプロテオミクスから数個、アルツハイマー病モデルマウス血漿のメタボロミクスから 7 個のマーカー候補分子が同定された。血中 MP 解析では、炎症ラットにおいて MP 数が有意に増加することが示された。また、ヒト歯周炎歯肉溝液のプロテオミクスでは疾患群で有意に増加する蛋白質が 10 個程度確認された。

研究分担者

滝川 修 国立長寿医療センター室長  
渡邊 淳 同上  
徳田治彦 同臨床検査部長  
松原悦朗 弘前大学大学院准教授  
山本誠士 富山大学大学院助教  
松田直之\* 京都大学大学院准教授  
高田 隆 広島大学大学院教授

研究協力者

脇田英明 国立長寿医療センター室長  
本山 昇 同上  
森脇佐和子 同研究員  
宮内睦美 広島大学大学院准教授  
服部裕一 富山大学大学院教授  
中嶋康文 京都府立医科大学助教

A. 研究目的

高齢社会では、介護費用を含めた高齢者医療に掛かる経費は膨大で、少子化が深刻な我が国においては、将来的にも厳しい医療財政が予測される。こうした背景から、高齢者の

健康を長く維持することが重要な課題となっている。

ポストゲノム時代の有望技術である質量分析装置の進歩からプロテオミクスやメタボロミクスによる病気の診断や病態解析、あるいは将来における疾病への罹患や罹患後の病態変動・予後を予測する新しいタイプのバイオマーカー(BM)探索に期待が寄せられている。また、small RNA と呼ばれる核酸群や small RNA を内包すると考えられている血液中のマイクロパーティクル(MP)とよばれる細胞由来の小胞が新たなマーカー分子として注目されている。

長寿医療研究にあつては、認知症や高齢で重篤となりやすい肺炎、歯牙喪失の原因となる歯周炎など、高齢者の QOL を著しく低下させる疾患の新しい BM が出現すれば、これらの疾病の予防対策や悪化抑制を目的とした早期の医療介入が可能となり、高齢者一人一人の健康及び病態管理において有益なものとなる。本研究では、認知症などの罹患患者や疾患のモデル動物の血液や病理組織等を材料とした Omics 解析等による新たなマーカー分子の探

\* 現職：名古屋大学大学院医学研究科教授

索を行う。また、これまでの研究から疾患マーカーとしての可能性が示唆されたものについてはヒト検体を材料等に用いてその評価を行った。

## B. 研究方法

### 1) 対象とする疾患

認知症（脳血管性認知症、アルツハイマー病(AD)）、肺炎、歯周炎など高齢者のQOL、ADLの低下をもたらす疾患について検討を行うほか、年齢層別（加齢変化）のOmics解析を行う。

### 2) 材料

患者及び健常人、長寿ドック受診者等の血清、血漿、脳脊髄液、歯肉溝液、あるいは疾患モデルマウス及びラット、加齢育成ラットの血清、血漿、脳組織等を材料とした。加齢育成ラットは、9～27月齢のF344/N及びSDの2系統を用いた。

### 3) 解析方法

加齢の指標となる分子の探索については、micro RNA(miRNA)を標的としたトランスクリプトームにて解析した。加齢育成ラットの血清または血漿を材料とし、total RNAの抽出後、miRNAのマイクロアレイチップによる発現解析を行った。

脳血管性障害及び歯周炎のBM探索については、プロテオーム解析を実施した。脳血管性認知症の原因となる脳虚血のモデルラットを作製し、虚血側の脳組織と反対側のものと比較検討した。歯周炎患者の歯肉溝液を採取し、健常人のものと比較した。

血中に浮遊する血管内皮細胞由来のMP(CEM)や脱落した血管内皮細胞(CEC)は、急性及び慢性炎症のBMになる可能性が示唆されている。これらについて、炎症のモデルマウス及びヒト動・静脈血を材料としてFACS解析あるいは免疫沈降法による解析を行った。

また、炎症モデルの血漿を分画し、CEMが存在する高分子領域のSDS-PAGEを行い、銀染色法によるCEM由来蛋白質の解析についても検討を行った。

アルツハイマー病(AD)のBM探索においては、AD様の変性を示すモデルマウスと正常マウスの脳組織と血漿を材料とし、CE-MSを用いたメタボローム解析を行った。

血中VEGF濃度と疾患との関連性については、国立長寿医療センター病院で実施している長寿ドック受診者の検診データと連結させて分析し、VEGFのBMとしての有効性を検討した。

各種神経変性疾患のBMとして、疾患の発症基盤となる原因蛋白質の重合体がBM候補となるか検討した。合成ペプチドを重合させ、分担研究者の松原らが開発したAβ重合体の高次構造を認識する抗体を用い、ドット・プロット法による検討を行った（各々の解析法の詳細については、各研究分担報告書を参照）。

### (倫理面への配慮)

各分担研究とも、研究者の所属する研究機関における当該倫理委員会の承認を得て実施されているものである。

## C. 研究結果

加齢育成ラットの血中miRNA解析では、一定量のsmall RNAが抽出された。miRNAマイクロアレイ解析では、SDラットの加齢変化において80個程度のmiRNAの発現低下が示された。

脳血管障害ラットの脳組織のプロテオーム解析から、数個のマーカー候補蛋白質が同定された。ヒト歯周炎患者の歯肉溝液プロテオーム解析では、炎症に関わる10個程度の蛋白質の発現上昇が確認された。しかし、TNF- $\alpha$ やIL-1など、主要な炎症性サイトカインは同定されなかった。

血中CEM/CEC探索では、炎症モデルマウス

の血漿から正常血漿の場合より多くの CEM が検出された。また、健常人のヒト静脈血からは数個の CEC が検出され、動脈血では皆無であった。今回、CEM/CEC を効率よく検出できたことで、CEM/CEC を BM として利用することが可能と思われた。

AD モデルマウスの血漿を用いたメタボローム解析では発症早期において7つの代謝産物の増加が確認され、発症後期では2つの代謝産物の増量が起こることが示された。

血中 VEGF は女性では骨密度と負の相関があり、T-Bil、TSH と正の相関が示された。一方、男性の場合 VEGF 濃度は、うつろの指標である GDS15 や動脈硬化と関連する BNP、UA と正の相関が認められた。

A $\beta$ 重合体特異的抗体は、A $\beta$ 以外のペプチドや蛋白質単量体を認識しなかったが、これらで形成された重合体を認識することが示された。

#### D. 考察

各解析から、認知症の BM 候補分子や、歯周炎で上昇する蛋白質群、加齢で減少する miRNA などが同定された。血中の MP は炎症で上昇することも示された。また、血中 VEGF は骨量減少のマーカーとして、A $\beta$ 重合体認識抗体は AD 以外の神経変性疾患の診断ツールになる可能性が示唆された。

加齢によって発現が低下する血中の miRNA は、それらが関与する蛋白質をコードする遺伝子の翻訳抑制が緩和されることを示唆する。今後、加齢によって上昇する蛋白質との整合性をプロテオームで検討することで加齢によって変化する蛋白質を特定できるかもしれない。脳血管障害ラットで同定された蛋白質の一つはすでに創薬候補となっているものであった。このことは、プロテオーム解析が BM 探索のみならず治療薬の標的を見出すにも有効な手段であることを示唆する。また、歯周炎の歯肉溝液で同定された発現上昇蛋白質はこ

れまで特に歯周炎との関連性が言及されていないものが多かった。歯周炎では組織の深部と表層では異なるスケードが働いている可能もある。今後、解析例数を増やすことで、歯周炎の歯肉溝特異的蛋白質が絞り込まれば同疾患の BM 候補としての可能性が高まると考えられる。

CEM などの MP は細胞由来の小胞で、内部に miRNA、膜面には細胞特異的な蛋白質を含んでいると考えられている。今回 CEM の検出が実際に可能であることが示されたことは、CEM 自体が疾患の BM になりうることや、疾患特異的な miRNA の存在を裏付ける意味でも重要な所見であると考えられた。また、炎症性疾患における CEM の増加は、CEM の発現をコントロールすることが高齢者における各種疾患のコントロールにつながると考えられる。すなわち、CEM は新たな治療ターゲットと捉えることもできる。

AD モデルマウス血漿のメタボローム解析では AD の早期発見に役立つかもしれない7つの BM 候補代謝産物が同定された。今後これらの詳細な検討に期待している。

一方、個別の蛋白質に注目して行った検討では、VEGF が女性における骨代謝のマーカーになる可能性が示唆された。男性においても VEGF が BM として有効と思われた疾患があったが、多方面の解析から現段階ではさらなる検討が必要と思われた。

AD の病態と関連すると考えられている A $\beta$ 蛋白質の重合体を認識する抗体は、重合体の立体構造を認識し、A $\beta$ とは異なる蛋白質重合体をも認識することが明らかになった。このことから、例えばこの抗体を用いた ELISA を作製することで、他の神経変性疾患の診断ツールになる可能性が示された。

#### E. 結論

Omics 法による網羅的な分子探索から、複数の疾患 BM 候補分子を同定した。個別蛋白質

の解析では、血中 VEGF は女性の骨代謝マーカーとなること、 $A\beta$ 重合体認識抗体は AD 以外の神経変性疾患の診断ツールになる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Takai S, Matsushima-NR, Kato K, Minamitani C, Niida S, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T: Rho-kinase limits FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. Bone; doi:10.1016 (in press)

Yamano E, Miyauchi M, Furusyo H, Kawazoe A, Ishikado A, Makino T, Tanne K, Tanaka E, Takata T: Inhibitory effects of orally administrated liposomal bovine lactoferrin on the LPS-induced osteoclastogenesis in the periodontal tissue. Lab Invest. (in press)

Ekuni D, Yamanaka R, Yamamoto T, Miyauchi M, Takata T, Watanabe T: Effects of mechanical stimulation by a powered toothbrush on healing of periodontal tissue in rat model of periodontal disease. J Periodontol. Res. 45: 45-51, 2010

Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, Kunimoto S, Kalaria RN, Watanabe A: Mutations in Notch3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation. Hum. Mol. Genet. 19: 79-89, 2010

Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Sasaki A, Yamada S, Matsubara E, Murakami T, Tanaka Y, Kurata T, Wuhua X, Ueda K, Kuribara H, Ikarashi Y, Nakazato Y, Okamoto K, Abe K, Shoji M: Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human  $\alpha$ -synuclein A30P+A53T transgenic mice with  $\alpha$ -synuclein pathology. Brain Res. 1250: 232-241, 2009

Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T, Kurihara H: Brain-derived neurotrophic factor protects cementoblasts from serum starvation-induced cell death. J Cell Physiol. 221(3): 696-706, 2009

Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Häcker G, Bieber T, von Bubnoff D: Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. J. Immunol. 183: 145-154, 2009

Yamada A, Akimoto H, Kagawa S, Guillemin GJ, Takikawa O: Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases indoleamine 2,3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1-42: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. J. Neurochem. 110: 791-800, 2009

Ogasawara N, Oguro T, Sakabe T, Matsushima M, Takikawa O, Isobe K, Nagase F: Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PI3K, PKC, and NF-kappaB and the generation of

reactive oxygen species. *J. Cell Biochem.* 108: 716-725, 2009

Adachi S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O: Involvement of Rho-kinase in prostaglandin E(1)-stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 90: 1-6, 2009

Nisapakultorn K, Makrudthong J, Sa-Ard-Iam N, Rerkyen P, Mahanonda R, Takikawa O: Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and regulation in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 80: 289-297, 2009

Tsuji M, Mizorogi T, Kitamura I, Maeda Y, Nishijima K, Kuwahara S, Ohno T, Niida S, Nagaya M, Saito R, Tanaka S: Bone mineral analysis through dual energy X-ray absorptionmetry in laboratory animals. *J. Veterinary Med Sci.* 71: 1493-1497, 2009

Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, Azuma T, Tamaki N, Irie K, Maruyama T, Yamamoto T, Watanabe T, Miyauchi M, Takata T: Effects of improvement in periodontal inflammation by toothbrushing on serum lipopolysaccharide concentration and liver injury in rats. *Acta Odontologica Scandinavica* 67: 200-205, 2009

Natsume H, Adachi S, Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Yamauchi J, Kato K, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T: (-)-Epigallocatechin gallate attenuates the induction of HSP27

stimulated by sphingosine 1-phosphate via suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in osteoblasts. *Int J Mol Med.* 24: 197-203, 2009

Minamitani C, Otsuka T, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Hanai Y, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O: Involvement of Rho-kinase in sphingosine 1-phosphate-stimulated HSP27 induction in osteoblasts. *Int J Mol Med.* 24: 77-82, 2009

Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin accelerates vascular A $\beta$  deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 19: 48-57, 2009

## 2. 総説等

Sugimoto, H, Takikawa O, Shiro Y: Tryptophan catabolism by heme dioxygenases in *The Porphyrin Handbook* (Kadish et al., eds), Vol. 5, Heme Proteins, Academic Press (in press)

滝川 修、横山 祐一: Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の病態生理学的意義と阻害剤の開発 *ファルマシア*(日本薬学会誌) (in press)

## 3. 学会発表

Inubushi T, Rego EB, Eizo Y, Otani J, Miyauchi M, Takata T, Tanne K: Low-intensity Ultrasound Stimulation Inhibits Root Resorption Induced by the Application of Experimental Force: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009年2月7日 Hiroshima, Japan

Rego EB, Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi, M, Takata T, Tanne K: Ultrasound stimulation increases PGE2 production and induces mineral deposition via prostaglandin EP4 receptor activation in mouse cementoblasts: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009年2月7日 Hiroshima, Japan

Kawazoe Y, Miyauchi M, Takata T: Influence of elevation of GGT by cholestatic liver disease on bone and LPS induced alveolar bone destruction: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009年2月7日 Hiroshima, Japan

Imai H, Iizuka S, Miyauchi M, Takata T: Heparin derivative induces bone regeneration: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009年2月7日 Hiroshima, Japan

Takikawa O: Neurotoxin quinolinic acid produced in over-activated microglia may contribute to the progression of Alzheimer's disease, ISTRY2009 (Meeting of the international society for tryptophan research), 2009年7月9日 Florence, Italy

Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Seino Y, Takamura A, Nakahata N, Watanabe Y, Watanabe M, Matsubara E, Shoj M: Accumulation of protein in lipid rafts in mouse models of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2009, the Society for Neuroscience, 39<sup>th</sup> Annual Meeting, 2009年10月17日 Chicago, USA

松原悦朗: アルツハイマー病の予防・治療最

前線 Brain Science Conference 2009年10月10日 (京都)

松原悦朗: アルツハイマー病の発症病態解明に向けて. 特別講演会. 北海道大学 2009年11月2日 (札幌)

松原悦朗: アルツハイマー病の分子メカニズムと治療戦略 第18回東北老年期認知症研究会 2009年11月14日 (仙台)

渡邊 淳, 足立香代, 國本正子, 武田和也, 脇田英明, 高橋慶吉: 変異Notch3による重合体の形成と細胞増殖の低下 第28回日本認知症学会 2009年11月20日 (仙台)

國本正子, 足立香代, 吉崎嘉一, 武田和也, 脇田英明, 高橋慶吉, 渡邊 淳: 家族性脳血管性認知症 (CADASIL) モデル動物の作製と病態解析 第28回日本認知症学会 2009年11月20日 (仙台)

松原悦朗: アルツハイマー病 病態解明の現状 第16回東北脳循環カンファレンス 2009年11月28日 (仙台)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

発明の名称: ベンゾイミダゾール誘導体を有効成分とする IDO 阻害剤

発明者: 滝川 修, 浅井章良, 松野研司, 海野雄加

出願番号: 特願 2009-133633

出願日: 平成 21 年 6 月 3 日

発明の名称: 含硫化合物を有効成分として含有する IDO 阻害剤

発明者: 滝川 修, 浅井章良, 松野研司, 海野雄加

出願番号: 特願 2009-205484

出願日：平成21年9月7日

発明の名称：アルツハイマー病モデル動物及びその作成方法

発明者：滝川 修、香川正太

出願番号：PCT 出願 PCT/JP2009/006760

出願日：平成21年12月10日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし