

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告

生体試料を用いたアルツハイマー病の診断法の開発に関する研究 (課題番号 26-26)

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

高齢化社会の進行に伴い、認知症患者の急速な増加が予想される。現在、認知症の正確な鑑別診断は非常に難しい。プロテオーム解析によって、認知症に関連する分子を同定できれば、診断のためのバイオマーカーとなる可能性がある。もし、それらが血液等で検出できれば、安価で迅速に診断する方法を確立できるばかりでなく、発症前に予知することも可能となる。本年度は、質量分析装置で解析するにあたり最適なペプチドの分離条件の検討及び前処理法の検討を行い、質量分析によるペプチドの解析・同定システムを確立した。また、アルツハイマー病患者血漿及び認知機能正常者の血漿を用いたプロテオーム解析によって血漿中のタンパク質の検索を行った。

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

今後高齢者が爆発的に増加することが推測され、同時に認知症の患者の急速な増加も予想される。よって認知症を正確に診断し、治療を開始することが患者の増加を抑える上で必要となる。認知症はアルツハイマー病、血管性認知症、前頭側頭型認知症等、様々なタイプが存在し、病因・病態に応じた治療が必要である。しかしながら、これらを正確に鑑別診断できる高度な専門知識と経験を持った臨床医の数は十分とはいえず、また、明確な診断基準が確立されていない疾患も多い。本研究は特にアルツハイマー病に着目し、生体試料を用いたアルツハイマー病の診断法の開発を試みる。特に認知症などの疾患のバイオマーカーの検索と新しい診断法の開発には質量分析は必要不可欠であることから、nanoLC-MS/MSを用いた解析によって、血漿サンプル中の微量タンパク質のプロファイリングを行い、アルツハイマー病のバイオマーカーを同定することを目的とした。

B. 研究方法

1) ApoE の翻訳後修飾の解析

リコンビナントタンパク質ApoE2、ApoE3、ApoE4をそれぞれ酵素と基質の比率1:100でトリプシン消化した。消化物は、C18 column (2× 50 mm; Cadenza CD-C18)を用い、水/アセトニトリルの溶媒系で流速及びグラジエント等、HPLCのパラメーターの条件検討も行き、解析方法の最適化を試みた。また逆相HPLCで分離された各画分は質量分析によって、どのピークがどのペプチドに対応するか同定を行い、ペプチドマップの作製を行った。

2) 血中タンパク質の網羅的解析

患者の血液の網羅的解析でマーカー候補となるペプチドの同定率を上げるには、液体クロマトグラフィー(HPLC)でのペプチドの分離条件の検討が必要不可欠であることから、標品である BSA のトリプシン消化物を用いて、カラムの選択や流速及びグラジエントなど HPLC のパラメーターの条件検討も行き、解析方法の最適化を試みた。

倫理・利益相反委員会で審査・承認を得て、まずアルツハイマー病患者 20 例及び認知機能正常者 20 例の血漿を当センターのバイオバンクから提供して頂き解析を行った。血漿 40 μ l をリン酸バッファーで5倍に希釈し、0.22 μ m のスピニングフィルターで 16,000 x g で1分間遠心し、夾雑物を除去した。得られたサンプルはアルブミン IgG、IgA、 α 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノゲン、 α 2-マクログロブリン、 α 1-酸性糖タンパク質、補体タンパク質 C3、IgM、アポリポプロテイン AI、アポリポプロテイン AII、トランスサイレチンといった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、素通り画分は遠心フィルターによって 3 kDa 以上の分子量のタンパク質を集め、各々のサンプルの一部 (10ug) を直接トリプシンで消化を行った。各消化物のうち 1ug を低流量で流せる HPLC を用いた nanoLC/MS/MS を用いたショットガン分析に供した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針に従い、以下の方法により実施する。

- ①研究等の対象とする個人の人権擁護：臨床研究の倫理指針を遵守して研究を行う。
- ②研究等の対象となる者（本人又は家族）の理解と同意：長寿バイオバンクによる包括的同意を行って採取した検体を用いる。
- ③研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性と医学上の貢献の予測：長寿バイオバンクに保管されている既存試料を用い、また、臨床情報、生体試料の解析は全て匿名化された符号を用いて行うので、研究に参加する被験者個人に生じる不利益はない。

C. 研究結果

1. ApoE の翻訳後修飾の解析

これまでの研究によって、アルツハイマー病の危険因子であるApoEについて注目し解析を行ったところ、ApoEには3つのアイソフォームが存在するが、アルツハイマー病患者群及び非アルツハイマー病患者群の脳脊髄液の2次元電気泳動で、若干の違いが見られ、何らかの翻訳後修飾があるものと考えられた。そこで、患者血漿を用いてこれらの翻訳後修飾等の変化があるか検討することにした。

本年度はリコンビナントタンパク質ApoE2、ApoE3、ApoE4のトリプシン消化物を用いて、液体クロマトグラフィー(HPLC)でのペプチド分離条件の検討を行い、また各画分は質量分析によって、どのピークがどのペプチドに対応するか同定を行い、ペプチドマップの作製を行った。その結果、トリプシン消化によって、ジペプチドやトリペプチド等の低分子のペプチドの同定は困難であったが、それ以外のペプチドはほとんど同定が可能であり、ApoE2特異的ペプチドやApoE4特異的ペプチドも同定が可能となった。今後、患者の血液からApoEを精製して、今回作製したペプチドマップと比較して、各々のピークのパターンに変化がないか確認を行う。変化があるピークについては、そのペプチド内に何らかの翻訳後修飾の可能性があるので、そのペプチドを質量分析することによって、どのような修飾がなされているのかを同定する予定である。

2. 血中タンパク質の網羅的解析

患者の血液の網羅的解析でマーカー候補となるペプチドの同定率を上げるには、HPLCでのペプチドの分離条件の検討が必要不可欠であることから、標品であるBSAのトリプシン消化物を用いて、カラムの選択や流速及びグラジエントなどHPLCのパラメーターの条件検討を行い、解析方法の最適化を試み、質量分析タンパク質が最も多く同定出来る方法を確立した。また、アルツハイマー病患者血漿及び認知機能正常者の血漿を用い、アフィニティーカラムで精製することで質量分析にかける前処理を行った。その結果、各血漿をアフィニティーカラムで精製することによって、ターゲットとなりうる微量タンパク質の同定を行う際に、大きな妨げとなっていた大部分を占めるアルブミン等の血液中の主要なタンパク質はカラムに吸着し、除去することが可能となり、より微量のタンパク質の同定が可能となった。同定されたタンパク質のリストをもとにアルツハイマー病患者血漿に特異的な蛋白質のプロファイリングを行っている。今後解析する症例を増やし、バイオマーカーとなるタンパク質もしくはその翻訳後修飾等を同定する予定である。結果次第では、血清もしくは脳脊髄液の解析が必要となる可能性もある。いずれもアルツハイマー病患者群と認知機能正常者群で男女比、年齢層を出来るだけ合わせた症例を用いる予定である。

D. 考察と結論

アルツハイマー病患者の血漿を用いたバイオマーカーの検索は、国内のみならず世界中で試みられているが、未だ有効なマーカーは見つかっていない。現在これらの研究は主として質量分析装置を用いたプロテオーム解析によってなされているが、これらが成功するためにはいかにして血液中に高濃度に含まれるタンパク質を除き、マーカーとなりうる微量タンパク質を同定するかに懸かっている。今回の前処理法によって主要なタンパク質の除去が可能となり、さらにカラムの選択やグラジエントなど HPLC のパラメーターの改良によって、最適なペプチドの分離条件を確立できた。今回の解析では各検体の血漿 40 μ l を用いて前処理を行ったが、そのうち質量分析に供した量は 1 μ g であり血漿では 0.1 μ l 以下に相当し極微量である。サンプルは十分にあることから、各検体の前処理を工夫して、更なる解析条件の改良によって、今まで同定が出来なかった極微量のタンパク質を同定する余地は十分にある。今後これらを利用して、アルツハイマー病患者の血漿のプロテオーム解析によって、バイオマーカー候補となるタンパク質もしくは治療薬のターゲットとなるタンパク質の同定を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 永田有希, 紙田正博, 谷口美也子, 服部功太郎, 吉田寿美子, 後藤雄一, 渡邊 淳, 檜垣小百合, 神徳好美, 有馬邦正, 徳田治彦, 文堂昌彦, 櫻井孝, 浦上克哉, 尾野雅哉, 新飯田俊平: 認知症患者由来の髄液を用いたプロテオーム解析. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 (横浜)
- 2) 渡邊 淳, 國本正子, 高橋慶吉: 変異型 Notch3 ノックインマウス脳のプロテオーム解析. 第 33 回日本認知症学会, 2014 年 12 月 (横浜)

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