

## 長寿医療研究開発費 平成27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) 血中タンパク質の網羅的解析

アルツハイマー病 (AD) 患者 20 例、認知機能正常 (Normal) 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。検体は男女比、年齢層を出来るだけ合わせた症例を用いた。また、AD の危険因子 ApoE4 も偏りが無い検体で解析を行った。血漿40 $\mu$ lをリン酸バッファーで5倍に希釈し、0.22 $\mu$ mのスピンフィルターを用いて、16,000 x gで2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、 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 2-マクログロブリン、 $\alpha$ 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、各々の画分は遠心フィルターによって3kDa以上の分子量のタンパク質を集め、それぞれ直接トリプシンで消化を行った。各消化物は低流量で流せるHPLCを用いたnanoLC/MS/MSによるショットガン分析に供した。

### 2) アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の ApoE の解析

各血漿を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、素通り画分と吸着した画分に分離した。その後、各検体の素通り画分と吸着した画分の各々1 $\mu$ gをSDS-電気泳動を行い、抗ApoE抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

(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. 血中タンパク質の網羅的解析

各画分の質量分析によって得られたデータはProteome discovererでmascot 検索を行い、同定されたタンパク質はScaffoldソフトウェアを用い、スコアをもとにタンパク質のリストを

作成した。その結果、各血漿をアフィニティーカラムで分離を行うことによって、微量タンパク質の同定を行う際の大きな妨げとなっていたアルブミン等の主要なタンパク質を除き、よりマイナーなタンパク質を同定することが可能となった。しかしながら、一部の Haptoglobin や Keratin に違いが見られたものの、上位にリストアップされたタンパク質のほとんどは血漿由来のタンパク質であり、大きな違いは見られなかった。現在、さらに下位にリストアップされたタンパク質について違いがないか解析している。

## 2. アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の ApoE の解析

ApoE 抗体はアフィニティーカラムには固定化されていないので、本来ならば素通り画分に回収される。実際、素通り画分では AD 検体、認知機能正常検体ともに約 35kDa に ApoE の強い反応性を示すバンドが確認できた。これらは ApoE のアイソフォームに関係はなかった。一方で、素通り画分ほど量は多くないが、アフィニティーカラムに吸着した画分に AD 検体、認知機能正常検体ともに約 35kDa に ApoE の反応性を示すバンドが確認でき、AD 検体の方が強い反応性が見られた。更に興味深いのは ApoE4 を持つ検体はすべて、約 35kDa のバンドに加えて、約 50kD にブロードなバンド、更には高分子領域までスメアを呈したことである。これらも AD 検体の方が強い反応性を呈した。ApoE4 保有者は認知機能正常の段階からこのような変化がみられ、AD を発症すると更にその変化が大きくなることが推測された。これらのことから、各血漿のアフィニティーカラムに吸着した画分及び素通り画分に回収される ApoE の違いを更に解析することで、アルツハイマー病の早期診断ができないか、さらには、患者の重篤度の評価に利用できないか検討している。

## D. 考察と結論

質量分析装置を用いたプロテオーム解析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。今回の解析では各検体の血漿 40  $\mu$ 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 2ug 程度であり、血漿では 1ul 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出来ると考えられる。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。

## E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Allele comparative analysis of type 2 diabetes-associated SNPs identifies allele-specific DNA-binding proteins for the *KCNQ1* locus. Hiramoto M, Udagawa, H, **Watanabe A**, Miyazawa K, Ishibashi N, Kawaguchi M, Uebanso T, Nishimura W, Nammo T, Yasuda K. *Int. J. MOL. MED.*, 36, 222-230, 2015
- 2) Arginine-induced insulin secretion in endoplasmic reticulum Umeda M, Hiramoto M, **Watanabe A**, Tsunoda N, Imai T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 466, 717-722, 2015

2. 学会発表

- 1) **渡邊 淳**: アルツハイマー病患者の血漿を用いたプロテオーム解析. 第34回日本認知症学会, 2015年10月(青森)

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