

長寿医療研究開発費 平成28年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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

年間全体について

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た。

アルツハイマー病の早期診断法としては、アミロイドイメージングによる画像診断や脳脊髄液中の  $A\beta 42$ 、total タウ、リン酸化タウの量を ELISA で測定することにより診断するといった方法が開発されているが、未だ十分とは言えない。そこで、当センターのバイオバンクから血漿を提供して頂き、質量分析装置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試みた。アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿をアルブミン、IgG、IgA といった血液中に高濃度に含まれる主要な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、それぞれ直接トリプシンで消化、さらには nanoLC/MS によるショットガン分析に供し、タンパク質をリストアップした。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、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が、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、両方で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。また、素通り画分と吸着した画分の Apolipoprotein E (ApoE) を調べることで、吸着した画分において、アルツハイマー病患者と認知機能正常者で変化が見られることが判明した。吸着した画分の ApoE4 は、ウェスタンブロットで約 35kDa のバンドに加えて、約 50kDa 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。今後これらの ApoE の更なる解析によって、アルツハイマー病のバイオマーカーとなる可能性がある。

平成28年度について

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ついて、ApoE抗体を用いたウエスタンブロットによって解析すると、ApoEのC末の抗体を用いた場合に、アルツハイマー病の危険因子であるApoE4保有者と非保有者で変化が見られることが判明し、変性したApoEが観察された。

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 平成26年4月1日～平成29年3月31日

#### 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

年間全体について

##### 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、認知機能正常者 (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 のスピンド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 (Flow-through) 画分と吸着した (Bound) 画分に分けた後、各々の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、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。

平成 28 年度について

アルツハイマー病患者、認知機能正常者の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ついて、様々なエピトープを持つ抗 ApoE 抗体を用いたウエスタンブロットを行うことによって比較を試みた。

(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

年間全体について

### 1. 血中タンパク質の網羅的解析

素通り (Flow-through) 画分と吸着した (Bound) 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 (表 1, 2)。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け、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、両者に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。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 2 $\mu$ g 程度であり、解析量を増やすことにより、さらに極微量のタンパク質の同定が必要と考えられた。

## 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 (Flow-through) 画分と吸着した (Bound) 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 (図 1)。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 50kDa 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。今後、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 を精製し、プロテオーム解析を行い、これら ApoE の違いを明らかにすることで、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する必要がある。

### 平成 28 年度について

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ついて、様々な ApoE 抗体を用いたウエスタンブロットによって解析すると、ApoE の C 末の抗体を用いた場合に、アルツハイマー病の危険因子である ApoE4 保有者と非保有者で変化が見られることが判明し、変性した ApoE が観察された。

表 1 . Flow-through (low-abundant proteins) fraction list

#	Protein	Accession Number	Molecular Weight	AD	Normal
1	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	APOB_HUMAN	516 kDa	155	133
2	Cluster of Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2 (CO4B_HUMAN [2])	CO4B_HUMAN [2]	193 kDa	72	80
3	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	HEMO_HUMAN	52 kDa	20	20
4	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	AACT_HUMAN	48 kDa	23	25
5	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	CERU_HUMAN	122 kDa	44	49
6	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITH2 PE=1 SV=1	ITH2_HUMAN	106 kDa	36	40
7	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3	APOA4_HUMAN	45 kDa	38	40
8	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITH4 PE=1 SV=1	ITH4_HUMAN	103 kDa	33	37
9	Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	CFAB_HUMAN	86 kDa	27	34
10	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	ALBU_HUMAN	69 kDa	28	25
11	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	A1BG_HUMAN	54 kDa	11	14
12	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo sapiens GN=ITH1 PE=1 SV=1	ITH1_HUMAN	101 kDa	22	26
13	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	CLUS_HUMAN	52 kDa	13	18
14	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	GELS_HUMAN	86 kDa	32	35
15	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	KNG1_HUMAN	72 kDa	14	16
16	Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	ANGT_HUMAN	53 kDa	14	15
17	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	FIBA_HUMAN	95 kDa	16	23
18	Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4	CO5_HUMAN	188 kDa	25	32
19	Cluster of Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4 (CFAH_HUMAN [3])	CFAH_HUMAN [3]	139 kDa	19	20
20	Fibrinectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4	FINC_HUMAN	263 kDa	25	31
21	Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	CO9_HUMAN	63 kDa	15	13
22	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2	THRB_HUMAN	70 kDa	15	15
23	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1	VTDB_HUMAN	53 kDa	13	14
24	Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3	FIBG_HUMAN	52 kDa	14	15
25	Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7 PE=1 SV=2	CO7_HUMAN	94 kDa	16	16
26	Cluster of Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2 (PLMN_HUMAN)	PLMN_HUMAN	91 kDa	9	9
27	Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	APOE_HUMAN	36 kDa	19	20
28	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	VTNC_HUMAN	54 kDa	7	9
29	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2	A2GL_HUMAN	38 kDa	9	13
30	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	FETUA_HUMAN	39 kDa	2	3
31	Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	LUM_HUMAN	38 kDa	11	13
32	Corticosteroid-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA6 PE=1 SV=1	CBG_HUMAN	45 kDa	10	11
33	Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=1	PDF_HUMAN	46 kDa	14	17
34	Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3	HEP2_HUMAN	57 kDa	13	12
35	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FBG PE=1 SV=2	FIBB_HUMAN	56 kDa	16	19
36	Complement C2 OS=Homo sapiens GN=C2 PE=1 SV=2	CO2_HUMAN	83 kDa	16	16
37	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITH3 PE=1 SV=1	ITH3_HUMAN	100 kDa	17	18
38	Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2	CFAI_HUMAN	66 kDa	9	9
39	Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7 PE=1 SV=2	THBG_HUMAN	46 kDa	4	4
40	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	APOA1_HUMAN	31 kDa	19	19
41	Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3	CO6_HUMAN	105 kDa	15	15
42	Cluster of Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1 (SC1S_HUMAN)	SC1S_HUMAN	77 kDa	14	14
43	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens GN=PGLYRP2 PE=1 SV=1 (SGRP2_HUMAN)	SGRP2_HUMAN	62 kDa	10	10
44	Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B PE=1 SV=3 (CO8B_HUMAN)	CO8B_HUMAN	67 kDa	10	8
45	Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens GN=C8A PE=1 SV=2 (CO8A_HUMAN)	CO8A_HUMAN	65 kDa	9	10
46	Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC PE=1 SV=1 (C1QC_HUMAN)	C1QC_HUMAN	26 kDa	5	4
47	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	APOA2_HUMAN	11 kDa	6	5
48	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB PE=1 SV=1 (C1QB_HUMAN)	C1QB_HUMAN	27 kDa	5	6
49	Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2 (C1R_HUMAN)	C1R_HUMAN	80 kDa	9	7
50	Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1	AFAM_HUMAN	69 kDa	8	8
51	C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA PE=1 SV=2 (C4BPA_HUMAN)	C4BPA_HUMAN	67 kDa	5	6
52	Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1 SV=1 (APOC3_HUMAN)	APOC3_HUMAN	11 kDa	3	4
53	Beta-2-glycoprotein I OS=Homo sapiens GN=APOH PE=1 SV=3 (APOH_HUMAN)	APOH_HUMAN	38 kDa	3	3
54	Apolipoprotein C-II OS=Homo sapiens GN=APOC2 PE=1 SV=1 (APOC2_HUMAN)	APOC2_HUMAN	11 kDa	5	5
55	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3 (A2AP_HUMAN)	A2AP_HUMAN	55 kDa	7	9
56	Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1 (KLKB1_HUMAN)	KLKB1_HUMAN	71 kDa	8	8
57	Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2 (IC1_HUMAN)	IC1_HUMAN	55 kDa	9	8
58	Glutathione peroxidase 3 OS=Homo sapiens GN=GPX3 PE=1 SV=2 (GPX3_HUMAN)	GPX3_HUMAN	26 kDa	3	3
59	Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1 (HRG_HUMAN)	HRG_HUMAN	60 kDa	10	10
60	Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1 (PROS_HUMAN)	PROS_HUMAN	75 kDa	8	9
61	Cluster of Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 (HBB_HUMAN [2])	HBB_HUMAN [2]	16 kDa	11	12
62	Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPN2 PE=1 SV=3 (CPN2_HUMAN)	CPN2_HUMAN	61 kDa	7	6
63	Tetranectin OS=Homo sapiens GN=CLEC3B PE=1 SV=3 (TETN_HUMAN)	TETN_HUMAN	23 kDa	2	4
64	Serum amyloid P-component OS=Homo sapiens GN=APCS PE=1 SV=2 (SAMP_HUMAN)	SAMP_HUMAN	25 kDa	7	7
65	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 (HBA_HUMAN)	HBA_HUMAN	15 kDa	5	8
66	Cluster of Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 (ACTB_HUMAN [9])	ACTB_HUMAN [9]	42 kDa	12	9
67	Ficolin-3 OS=Homo sapiens GN=FCN3 PE=1 SV=2 (FCN3_HUMAN)	FCN3_HUMAN	33 kDa	4	7
68	Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=3 (PON1_HUMAN)	PON1_HUMAN	40 kDa	7	7
69	Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1 PE=1 SV=1 (APOC1_HUMAN)	APOC1_HUMAN	9 kDa	4	4
70	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 (NUCL_HUMAN-DE[?])	NUCL_HUMAN-DE[?]	2	1	1
71	Cluster of Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 (HPT_HUMAN)	HPT_HUMAN [2]	45 kDa	2	15
72	Coagulation factor XII OS=Homo sapiens GN=F12 PE=1 SV=3 (FA12_HUMAN)	FA12_HUMAN	68 kDa	2	2
73	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1 (AMBP_HUMAN)	AMBP_HUMAN	39 kDa	3	5
74	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens GN=IGFBP3 PE=1 SV=2 (ALS_HUMAN)	ALS_HUMAN	66 kDa	11	13
75	Sex hormone-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SHBG PE=1 SV=2 (SHBG_HUMAN)	SHBG_HUMAN	44 kDa	6	6
76	Platelet basic protein OS=Homo sapiens GN=PPBP PE=1 SV=3 (CXCL7_HUMAN)	CXCL7_HUMAN	14 kDa	2	2
77	Coagulation factor XIII A chain OS=Homo sapiens GN=F13A1 PE=1 SV=4 (F13A_HUMAN)	F13A_HUMAN	83 kDa	8	7
78	Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4 (FBLN1_HUMAN)	FBLN1_HUMAN	77 kDa	6	5
79	Titin OS=Homo sapiens GN=TTN PE=1 SV=4 (TTIN_HUMAN)	TTIN_HUMAN	3816 kDa	2	2
80	Coagulation factor X OS=Homo sapiens GN=F10 PE=1 SV=2 (FA10_HUMAN)	FA10_HUMAN	55 kDa	3	2
81	Cluster of Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=1 (K2C1_HUMAN)	K2C1_HUMAN	66 kDa	16	0
82	Apolipoprotein(a) OS=Homo sapiens GN=LPA PE=1 SV=1 (APOA_HUMAN)	APOA_HUMAN	501 kDa	1	4
83	Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Homo sapiens GN=CPN1 PE=1 SV=1 (CBPN_HUMAN)	CBPN_HUMAN	52 kDa	4	4
84	ERC protein 2 OS=Homo sapiens GN=ERC2 PE=1 SV=3 (ERC2_HUMAN-DE[?])	ERC2_HUMAN-DE[?]	1	2	2
85	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D OS=Homo sapiens GN=GPLD3 PE=1 SV=1 (PHLD_HUMAN)	PHLD_HUMAN	92 kDa	3	2
86	Protein Z-dependent protease inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINA10 PE=1 SV=1 (ZPL_HUMAN)	ZPL_HUMAN	51 kDa	3	3
87	Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=ECM1 PE=1 SV=2 (ECM1_HUMAN)	ECM1_HUMAN	61 kDa	1	3
88	Complement C1r subcomponent-like protein OS=Homo sapiens GN=C1RL PE=1 SV=1 (C1RL_HUMAN)	C1RL_HUMAN	53 kDa	4	5
89	Monocyte differentiation antigen CD14 OS=Homo sapiens GN=CD14 PE=1 SV=2 (CD14_HUMAN)	CD14_HUMAN	40 kDa	2	1
90	Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3 (KAIN_HUMAN)	KAIN_HUMAN	49 kDa	6	5
91	Fetuin-B OS=Homo sapiens GN=FETUB PE=1 SV=2 (FETUB_HUMAN)	FETUB_HUMAN	42 kDa	4	4
92	Arfaptin-1 OS=Homo sapiens GN=ARFIP1 PE=1 SV=2 (ARFP1_HUMAN)	ARFP1_HUMAN	42 kDa	2	2
93	Complement C1q subcomponent subunit A OS=Homo sapiens GN=C1QA PE=1 SV=1 (C1QA_HUMAN)	C1QA_HUMAN	26 kDa	2	1
94	Coagulation factor IX OS=Homo sapiens GN=F9 PE=1 SV=2 (FA9_HUMAN)	FA9_HUMAN	52 kDa	3	3
95	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 (K1C9_HUMAN)	K1C9_HUMAN	62 kDa	12	1
96	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3 (A1AT_HUMAN)	A1AT_HUMAN	47 kDa	7	4
97	Lipopolysaccharide-binding protein OS=Homo sapiens GN=LBP PE=1 SV=3 (LBP_HUMAN)	LBP_HUMAN	53 kDa	3	2
98	Carboxypeptidase B2 OS=Homo sapiens GN=CPB2 PE=1 SV=2 (CPB2_HUMAN)	CPB2_HUMAN	48 kDa	2	4
99	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 (TRFE_HUMAN)	TRFE_HUMAN	77 kDa	7	3
100	Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4 PE=1 SV=2 (SAA4_HUMAN)	SAA4_HUMAN	15 kDa	3	2

表 2. Bound (high-abundant proteins) fraction list

Protein	Accession Number	Molecular Weight	AD	Normal
1 Cluster of Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 (A2M)	A2MG_HUMAN [2]	163 kDa	60	63
2 Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	APOA1_HUMAN	31 kDa	38	38
3 Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	A1AT_HUMAN	47 kDa	30	31
4 Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	FIBA_HUMAN	95 kDa	34	36
5 Cluster of Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	IGHG1_HUMAN [2]	36 kDa	17	17
6 Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_HUMAN	187 kDa	66	64
7 Cluster of Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 (HPT_HUMAN)	HPT_HUMAN [2]	45 kDa	23	22
8 Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	ALBU_HUMAN	69 kDa	26	29
9 Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FBG PE=1 SV=2	FIBB_HUMAN	56 kDa	22	22
10 Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3	FIBG_HUMAN	52 kDa	19	18
11 Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	IGKC_HUMAN	12 kDa	5	5
12 Cluster of Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3 (IGHM)	IGHM_HUMAN [2]	49 kDa	14	14
13 Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	IGHG2_HUMAN	36 kDa	10	11
14 Cluster of Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1	LAC2_HUMAN [2]	11 kDa	5	7
15 Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	TRFE_HUMAN	77 kDa	21	24
16 Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	APOA2_HUMAN	11 kDa	7	7
17 Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_HUMAN	16 kDa	11	11
18 Cluster of Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 (IGHA1_HUMAN [2])	IGHA1_HUMAN [2]	38 kDa	7	9
19 Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	IGHG4_HUMAN	36 kDa	9	9
20 Apolipoprotein C-II OS=Homo sapiens GN=APOC2 PE=1 SV=1	APOC2_HUMAN	11 kDa	5	5
21 Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1 SV=1	APOC3_HUMAN	11 kDa	3	3
22 Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=1	IGLL5_HUMAN	23 kDa	4	4
23 Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	HV305_HUMAN	13 kDa	2	1
24 Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1 PE=1 SV=1	APOC1_HUMAN	9 kDa	6	5
25 Cluster of Ig kappa chain V-III region HAH OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 (KV31)	KV312_HUMAN [2]	14 kDa	4	4
26 Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SA4 PE=1 SV=2	SA44_HUMAN	15 kDa	3	3
27 Ig kappa chain V-TV region Len OS=Homo sapiens PE=1 SV=2	KV402_HUMAN	13 kDa	2	2
28 Cluster of Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 (HE)	HBB_HUMAN [2]	16 kDa	5	7
29 Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=3	PON1_HUMAN	40 kDa	8	7
30 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	APOB_HUMAN	516 kDa	15	9
31 Cluster of Ig lambda chain V-I region HA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 (LV102)	LV102_HUMAN	12 kDa	3	3
32 Cluster of Ig kappa chain V-III region VH (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1 (KV310)	KV310_HUMAN [2]	13 kDa	1	3
33 Cluster of Ig kappa chain V-II region Cum OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 (KV20)	KV201_HUMAN	13 kDa	2	2
34 Cluster of Ig heavy chain V-I region EU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 (HV101)	HV101_HUMAN [2]	12 kDa	2	3
35 Cluster of Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1	A1AG1_HUMAN	24 kDa	2	2
36 Ig heavy chain V-III region CAM OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	HV307_HUMAN	14 kDa	2	2
37 Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2	IC1_HUMAN	55 kDa	7	5
38 Ig heavy chain V-III region BUT OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	HV306_HUMAN	12 kDa	1	2
39 Ig heavy chain V-III region GAL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	HV320_HUMAN	13 kDa	2	2
40 Cluster of Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=2 (CO4A)	CO4A_HUMAN [2]	193 kDa	4	5
41 Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	CLUS_HUMAN	52 kDa	4	5
42 E3 SUMO-protein ligase PIAS4 OS=Homo sapiens GN=PIAS4 PE=1 SV=1	PIAS4_HUMAN-DE(?)		2	1
43 Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	APOE_HUMAN	36 kDa	7	6
44 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA PE=1 SV=2	C4BPA_HUMAN	67 kDa	2	2
45 Ig heavy chain V-I region V35 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	HV103_HUMAN	13 kDa	2	2
46 Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	HBA_HUMAN	15 kDa	1	3
47 Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	HV303_HUMAN	13 kDa	1	2
48 Ig kappa chain V-I region CAR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	KV104_HUMAN	12 kDa	1	2
49 Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	AACT_HUMAN	48 kDa	2	1
50 Ig lambda chain V-I region YOR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	LV101_HUMAN	12 kDa	2	2
51 Ig kappa chain V-I region Kue OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	KV112_HUMAN	12 kDa	2	1
52 Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP PE=1 SV=1	LG3BP_HUMAN	65 kDa	3	2
53 Cluster of Ig kappa chain V-III region Ti OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 (KV304)	KV304_HUMAN [2]	12 kDa	2	2
54 Ig lambda chain V-I region NIG-64 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	LV104_HUMAN (+1)	11 kDa	1	2

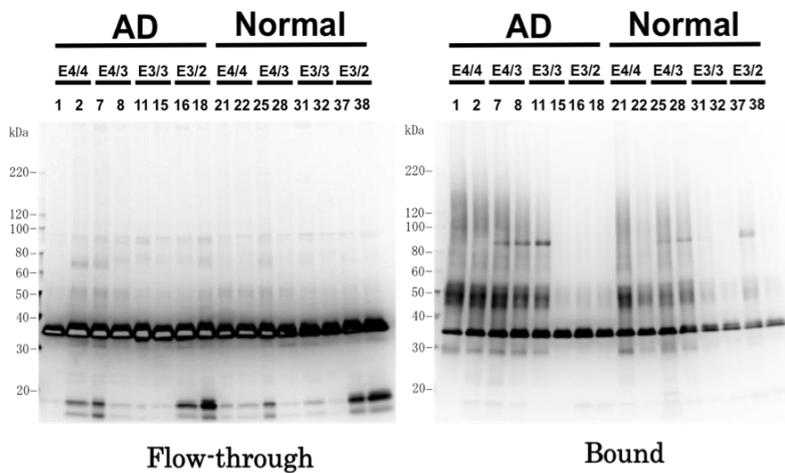


図1. 素通り画分と吸着した画分の抗ApoE抗体を用いたウエスタンブロット  
数字は各検体の番号、その上は ApoEのアイソフォームを示す。

#### D. 考察と結論

血中タンパク質の網羅的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。今後解析する量と症例を増やすことによって、アルツハイマー病の早期診断に有用となる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できる可能性がある。また、アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の ApoE の解析によって、素通り画分と吸着した画分の ApoE を調べることで、吸着した画分において、アルツハイマー病患者と認知機能正常者で変化が見られることが判明した。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、ApoE の違いをさらに質量分析によって分子レベルで解析することで、ApoE4 保有者のような発症リスクの高い方の早期の兆候を知る手がかりとなるかも知れない。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

平成 26 年度

なし

平成 27 年度

- 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

平成28年度

- 1) Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice.

Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, Connor L, Kumar V, Miura I, Suzuki T, **Watanabe A**, Abe M, Sugiyama F, Takahashi S, Sakimura K, Hayashi Y, Liu Q, Kume K, Wakana S, Takahashi JS, Yanagisawa M. *Nature*, 539, 378-383, 2016

## 2. 学会発表

平成26年度

- 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)

平成27年度

- 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)

平成28年度

**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.

- 1) **渡邊 淳**: アルツハイマー病患者の血漿中の ApoE の解析. 第35回日本認知症学会, 2016年12月(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