

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

質量分析を用いたアルツハイマー病のバイオマーカー開発  
（課題番号 29-28）

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

現在アルツハイマー病治療薬に関しては、その多くが有効な結果が得られなかったとして、臨床試験が中止となっている。その原因の一つとしてアルツハイマー病の発症段階において、既に老人斑と神経原線維変化といったアルツハイマー病の病理が形成されており、たとえ老人斑の形成が抑えられたとしても、既に形成された神経原線維変化によって、その進行が抑えられないという可能性が考えられる。今後より早期、つまりプレクリニカルでの臨床試験が行われることも予想され、アルツハイマー病発症前の徴候を捉えることの重要性はよりいっそう増すものと考えられる。もし血液でのバイオマーカーが確立されれば、画像診断と比較して、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。当センターでも  $A\beta$  に着目した血液バイオマーカーを同定しているが、それ以外にも確実性の高い血液バイオマーカーを同定して組み合わせていくことで、より正確かつ早期の診断に役立つと思われる。

本研究では質量分析による血漿中の微量タンパク質解析法の開発を行い、これらを用いて、これまでの研究でアルツハイマー病と健常人の血漿中で違いが見られた ApoE の糖鎖やプロセッシングに特に注目して解析を行った。これ以外にも翻訳後修飾等の変化を同定し、それらがアルツハイマー病の早期診断に利用できないか、さらには、患者の重篤度の評価に利用できないか検討を行った。

### 2019年度について

質量分析によってアルツハイマー病患者群と認知機能正常群で変化が見られた ApolipoproteinB、Kelatin、Haptoglobin 及び Clusterin について、ウェスタンブロットによって確認を行ったが、顕著な違いは見られなかった。これらの結果から単なるタンパク質の量的な違いだけではなく、特定の部位での翻訳後修飾等の質的变化が起こっていないかについても解析する必要があると考えられた。

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 2017年4月1日～2020年3月31日

## A. 研究目的

アルツハイマー病を正確かつ早期に診断し、治療を開始することが患者の増加ならびに病気の進行を抑える上で、極めて重要である。しかしながら、現在十分な早期診断法は確立されていない。もし血液バイオマーカーでアルツハイマー病発症前の徴候を捉えることが出来れば、予防的介入を行うことで、高齢者の認知能やADL (Activities of Daily Living) 低下を抑制することが期待できる。そこで、本研究は質量分析を用いて、血液中のアルツハイマー病関連タンパク質の解析を行う。これらによって、バイオマーカーを探索し、アルツハイマー病の早期診断法の開発を目的とした。

## B. 研究方法

年間全体について

### 1) 質量分析による微量タンパク質解析法の開発

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、カラムの選択や流速及びグラジエント等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た。標品としてリコンビナント ApoE を用い、SDS 電気泳動後ゲルを銀染色し、得られた ApoE のバンドを切り出し、還元アルキル化後、トリプシンで消化した。得られた消化物は C18 column (Magic C18AQ, 0.1 x 300 mm; Michrom Bioresources, Inc.)を用いて、500nl/min といった低流量で流せる HPLC を連結し、高感度質量分析装置 LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific)によるショットガン分析に供した。質量分析によって得られたデータは Proteome discoverer1.3 software (Thermo Fisher Scientific)で mascot 検索を行いタンパク質の同定を行った。

### 2) 血漿中の変性 ApoE の解析

アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿を用い、プロテオーム解析を試みた。全処理として、アルブミン、IgG、IgA 等の主要な 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 3 kDa 以上の分子量

のタンパク質を集め、各検体の素通り画分と吸着した画分の各々1ug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。さらに、各々の画分 2ug をそれぞれ直接トリプシンで消化し、ショットガン分析でタンパク質の同定を行った。

また、ApoE の蓄積による変化をみるため、リコンビナント ApoE を用い、ApoE3 (0.1ug/ul) 及び ApoE4 (0.1ug/ul) を 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 中で1ヶ月(1M)、2ヶ月(2M)、3ヶ月(3M)と 37°Cでインキュベートとし、ApoE にどのような変化が起こるかについて抗 ApoE 抗体を用いたウエスタンブロット及び質量分析装置を用いたプロテオーム解析を行った。

### 3) ヒト血漿中の ApoE の翻訳後修飾及び結合タンパク質の解析

アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿中 ApoE を調べることで、ApoE の翻訳後修飾や結合タンパク質の同定を試みた。Dynabeads ProteinG (VERITAS)を用い、アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿 100ul から、ApoE 抗体 (A299; IBL) による免疫沈降によって各々ApoE を精製し、さらに ApoE とともに溶出されたタンパク質を SDS 電気泳動で分離した。ゲルは銀染色し、得られたバンドは切り出し、還元アルキル化後、トリプシンで消化した。得られた消化物は上記で構築したシステムを用い、質量分析装置によるショットガン分析に供した。質量分析によって得られたデータは mascot 検索を行いタンパク質の同定を行った。

## 2019年度について

### 4) アルツハイマー病の血漿中の変動タンパク質の解析

アルツハイマー病患者 20 例及び認知機能正常者 20 例の血漿を用い、網羅的プロテオーム解析を試みた。全処理として、アルブミン等の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。各々の画分はそれぞれ直接トリプシンで消化し、質量分析を行った。得られたデータは Proteome discoverer で検索を行った。

#### (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. 質量分析による微量タンパク質解析法の開発

質量分析による条件検討を行った結果、リコンビナントApoE 0.25ugからApoEの配列のほぼ80%の領域をカバーすることが出来た。アルツハイマー病の早期診断法の開発を目的として、先ず、nano-LC/MS/MSをベースとする微量蛋白質の解析・同定システムを構築した。また、リコンビナントApoE2、ApoE3、ApoE4をそれぞれトリプシンで消化し、各アイソフォーム特異的なペプチドLGADMEDVCGR(104-114) [ApoE2及びE3]、LGADMEDVR(104-112) [ApoE4]、CLAVYQAGAR(158-167) [ApoE2]、LAVYQAGAR(159-167) [ApoE3及びE4]を質量分析によって同定出来た。これらの標品の解析データを参考に、血漿中のApoEに関しても、SDS電気泳動のゲルからApoEのバンドを切り出し、トリプシン消化物の質量分析からアイソフォームを同定することが可能となった。

### 2. 血漿中の変性 ApoE の解析

これまでアルツハイマー病患者と認知機能正常者の血漿を用いた解析から、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 ApoE は素通り画分に回収される。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ごく一部変性した ApoE があり、それらは ApoE4 を持つ検体で多く見られた。変性した ApoE は ApoE の C 末の抗体を用いたウエスタンブロットによって、モノマーから高分子領域までスメアを呈した。一方で ApoE の C 末以外の抗体ではこのような変化は見られなかった。それらの変化を調べるために、アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿の各々の画分を質量分析した結果、アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿の素通り画分からそれぞれ ApoE の配列の約 76%及び約 66%の領域をカバーすることが出来た。一方で、アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿の吸着画分からはそれぞれ ApoE の配列の約 27%及び約 18%の領域しかカバー出来なかった。量的な問題に加えて、ヒト ApoE では、glycosylation や sialylation 等の修飾が報告されていることから、アミノ酸そのものの変化に加えて、同定出来なかった領域については翻訳後修飾を加味した解析が必要であると考えられた。

ApoE の蓄積による変化をみるため、リコンビナント ApoE を用い、リン酸緩衝液中、長時間インキュベートとすることで、ApoE がどのように変化するかを SDS 電気泳動及び抗 ApoE 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した結果、ApoE3 及び ApoE4 は分解とともに、重合がおこり、変性したスメア状の ApoE が観察されたが、ApoE3 と ApoE4 では分解と重合のパターンは異なっていた。そこで、これら変性した ApoE の違いを質量分析装置で解析した結果、ApoE3 では1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月とインキュベート時間の増加に伴い、VRAATVGS LAGQPLQERAQAWGERLR [207-215]の領域のペプチドが同定されなくなった。ApoE4 についてはインキュベートに伴い、AWGERLRARMEEMGSRTR[190-226]のペプチド

が同定されなくなった。これらの領域で、アミノ酸側鎖の変化及び切断が起きている可能性が示唆された。

### 3. ヒト血漿中の ApoE の翻訳後修飾及び結合タンパク質の解析

アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿 100ul からそれぞれ ApoE の配列の約 65%及び約 70%の領域をカバーすることが出来た。逆に同定出来なかった領域については翻訳後修飾の可能性があり、特に ApoE の N 末側の同定率が低かったので、アルツハイマー病患者及び認知機能正常者で違いがないか、さらなる解析を試みている。ApoE とともに溶出されたタンパク質については、Immunoglobulin、Complement C1q、Serum albumin、Coiled-coil domain-containing protein、Probable ATP-dependent RNA helicase、Syntaxin-binding protein、Apolipoprotein L domain-containing protein、Tyrosine-protein kinase Fes/Fps、Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member、Protein virilizer homolog といったタンパク質が同定されたが、Immunoglobulin が多く同定されており、ProteinG にヒト血液由来の Immunoglobulin が結合し、ApoE とは無関係に溶出された可能性もあるので、今後 Immunoglobulin をアフィニティーカラムで除いた上で解析する必要があると考えられた。

### 2019年度について

#### 4. アルツハイマー病の血漿中の変動タンパク質の解析

アルツハイマー病患者 20 例及び認知機能正常者 20 例の血漿を用い、網羅的プロテオーム解析を試みた。全処理として、アルブミン等の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。各々の画分はそれぞれ直接トリプシンで消化し、質量分析を行った。得られたデータは Proteome discoverer で検索を行い、同定されたタンパク質を Scaffold ソフトウェアのスコアをもとにリストを作成した。アルツハイマー病患者で認知機能正常者よりスコアが高かったのは、Apolipoprotein B や Kelatin 等で、逆に低かったのは Haptoglobin や Clusterin 等であった。質量分析によってアルツハイマー病患者群と認知機能正常群で変化が見られた ApolipoproteinB、Kelatin、Haptoglobin 及び Clusterin について、ウェスタンブロットによって確認を行ったが、顕著な違いは見られなかった。これらの結果から単なるタンパク質の量的な違いだけではなく、特定の部位での翻訳後修飾等の質的变化が起こっていないかについても解析する必要があると考えられた。

#### D. 考察と結論

血漿中の ApoE の C 末の抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、ApoE4 を持つ検体では高分子領域までスメアを呈した。C 末以外の抗体ではこのような変化は見られなかったことから、ApoE の C 末側がこれらの変化に関わっていると考えられた。また、リコン

ビナント ApoE を長時間インキュベートとすることでもスメアが観察された。このことから、蓄積された ApoE が一部血漿中に存在することが考えられる。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。また、アルツハイマー病脳の前頭皮質の質量分析によって ApoE の C 末領域 (224-299) が蓄積しているという報告があり、特に ApoE4 を持つ検体では C 末領域の蓄積が多いことが示されている(Wang M and Turko IV, PLoS One, 2013)。このことから、おそらく血漿中に見られる変性した ApoE は脳内の ApoE の一部が血漿中に混在している可能性が推測された。これら変性した ApoE の違いをさらに詳細に質量分析装置で解析し、変化がみられる領域を絞り込んでいるが、正確な修飾の同定までには到っていない。これらの変化を特定することで、アルツハイマー病の早期診断に利用できる可能性がある。

アルツハイマー病患者および認知機能正常者の血漿を用いた質量分析によって、変化が見られた幾つかのタンパク質を、免疫化学的な解析で確認を行ったが、同様の結果が得られなかった。最初に行った質量分析による網羅的な解析では、タンパク質にリン酸化や糖鎖等の修飾による変化を考慮に入れずに解析するため、このような結果が出たものと考えられる。今後、単なるタンパク質の量的な変化だけではなく、タンパク質が修飾を受けたことによる質的变化に着目したマーカー分子の解析を行っていくことが必要であると考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

2017年度

なし

2018年度

##### 1) Matsuoka K, Kohara Y, Naoe Y, **Watanabe A**, Ito M, Ikeda K, Takeshita S.

WAIF1 is a cell-surface CTHRC1 binding protein coupling bone resorption and formation.

*J. Bone. Miner. Res.*, 33, 1500-1512, 2018.

##### 2) Kameyama A, Yamakoshi K, **Watanabe A**.

A rapid separation and characterization of mucins from mouse submandibular glands by supported molecular matrix electrophoresis analysis.

*Biochim. Biophys. Acta. Proteins. Proteom.*, 1867(1), 76-81, 2019.

- 3) Iida M, Matsuno YK, **Watanabe A**, Maruyama M, Kameyama A, Yamakoshi K.  
A sialo-oligosaccharide-rich mucin-like molecule specifically detected in the submandibular glands of aged mice. *Arch. Oral. Biol.*, 97, 52-58, 2019.
- 4) Mikawa R, Okuno A, Yoshimi T, **Watanabe A**, Maruyama M, Takikawa O.  
Partial Identification of Amyloid- $\beta$  Degrading Activity in Human Serum.  
*Nagoya J. Med. Sci.*, 81, 55-64, 2019.

2019年度

- 1) Takahashi Y, Wakita H, Mizutani K, **Watanabe A**, Sonoda S, Tomimoto H.  
Selective accumulation of adiponectin in the cerebral cortex under chronic cerebral hypoperfusion in the rat.  
*NeuroReport.*, 31, 148-155, 2020.
- 2) 亀山昭彦, 松野裕樹, 飯田真由, 丸山光生, 渡邊 淳, 山越貴水.  
分子マトリックス電気泳動で解明する唾液腺ムチンの老化に伴う変化.  
電気泳動, 63 (2): 55-61, 2019.

2. 学会発表

2017年度

- 1) 渡邊 淳  
血漿中の ApoE のプロテオーム解析.  
第 36 回日本認知症学会学術集会, 2017 年 11 月 (金沢)

2018年度

- 1) Takahashi Y, **Wakita H**, Mizutani K, **Watanabe A**, Sonoda S, Tomimoto H.  
Accumulation of adiponectin trimer in the rat brain under chronic cerebral hypoperfusion.  
第 59 回日本神経学会学術大会 2018 年 5 月 24 日 (札幌)
- 2) Iida M, Matsuno Y, **Watanabe A**, Maruyama M, Kameyama A, Yamakoshi K.  
A sialo-oligosaccharides rich mucin-like molecule is especially detected in the submandibular glands of aged mice.  
第 41 回日本基礎老化学会大会, 2018 年 6 月 (東京)
- 3) Kohara Y, **Watanabe A**, Ogiso N, Takeshita S.  
Macrophage-secreted Emilin2 Stimulates Chemotaxis and Differentiation in Stromal/Osteoblastic Cells. ASBMR: The American Society for Bone and Mineral Research, Canada, Sep.28-Oct.1, 2018.
- 4) 渡邊 淳  
血漿中の変性 Apolipoprotein E の解析.

第 37 回日本認知症学会学術集会, 2018 年 10 月 (札幌)

2019 年度

- 1) Takahashi Y, Wakita H, Mizutani K, **Watanabe A**, Sonoda S, Tomimoto H.  
Accumulation of adiponectin in the cerebral cortex under chronic cerebral hypoperfusion in the rat.  
第 60 回日本神経学会学術大会 2019 年 5 月 (大阪)
- 2) 渡邊 淳  
アルツハイマー病患者の血漿タンパク質の変動解析.  
第 38 回日本認知症学会学術集会, 2019 年 11 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