

アルツハイマー病の病態に関連する液性因子の解析（20-21）

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

細胞老化の最新の研究では、老化細胞では Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) と呼ばれる現象が起こり、老化細胞によって炎症性サイトカインが分泌されることで、その近傍の細胞を次々に老化細胞へと変化させていくことが示されている。脳の老化によって徐々に形成された NFT に、AD 及び老化に特異的である老人斑による脳内炎症、さらには炎症性サイトカインによる液性因子の分泌等により、細胞内の環境変化が起こり、それらが海馬周辺に留まっていた NFT に影響を及ぼすことで、NFT が大脳辺縁系および大脳新皮質に広がっていくといった可能性も考えられる。本研究では AD の進行によって、ある特定の液性因子が変動するかについて解析を行う。具体的には、AD の血液中もしくは脳脊髄液中に分泌されているサイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ等の液性因子を解析し、健常人、軽度認知障害 (MCI) と較べて何か違いがないか解析を行う。これらの解析によって、AD 病態の進行とともに変化する液性因子が見つければバイオマーカーとして利用できる可能性があり、またそれらの機能解析によって治療薬のターゲットもしくは治療の評価の指標となる可能性がある。

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

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。当センターでは血液中の A β に着目し、現在用いられている脳脊髄液 (CSF) や PET イメージングの検査に匹敵する極めて高い精度の AD の病変 (アミロイド蓄積) 検出法を確立し、世界的にも評価されているが、アミロイドの検出だけでは十分とはいえない。そこで本研究では A β やタウ以外で特に細胞老化や脳内炎症に着目し、AD 病態の進行とともにどういった液性因子が変化していくかを調べ、AD の早期診断のための血液バイオマーカーを検索する。

B. 研究方法

1) 質量分析による微量タンパク質解析法の検討

アルツハイマー病の病態に関連する液性因子を解析するにあたり、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ことが必須となる。そのためには、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。

2) タンパク質の定量解析（定量プロテオミクス）の検討

アルツハイマー病の病態に関連する液性因子の変化を捉えるために、液性因子であるタンパク質の定量解析を手法の検討を行った。検体群の試料と対照群の試料をそれぞれトリプシンで消化を行った。対象群に関しては消化物を乾固した後に H_2^{18}O とトリプシンを加えることで、カルボキシル(-COOH)基の二つの ^{16}O が ^{18}O へと置き換えられ、質量数が4増えるトリプシンを加える際、通常の H_2^{16}O か H_2^{18}O かで total で 4 mass の差ができ、最C末以外の切断されたすべてのペプチドの量比の比較が可能となった。検体群に関しては通常の H_2O を用いた操作のままで、最終的にこれらを等量混ぜ、質量分析装置で解析することで、内部標準として用いた対照群に対して、各々検体群のペプチドの量比の比較さらにはタンパク質の同定を行った。

（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

質量分析による微量タンパク質解析法の検討

血液バイオマーカーの網羅的解析では、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数多くの研究が行われているが、違いが見られたタンパク質としてはトランスサイレチン、ハプトグロビン、補体タンパク質、アポリポプロテインといった血中に豊富に含まれているタンパク質であり、本来解析したい微量な分子は同定されていない。疾患特異的マーカーを検索するには、いかにして血液中で高濃度に含まれるタンパク質を分離し、マーカーとなりうる微量タンパク質を同定出来るかに懸かっている。これまでの研究から、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、 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ることでこれらの除去が可能であることを確認している。しかしながら、これらの前処理の後でも、まだ多くの血液中に豊富にあるタンパク質によって、血中に分泌されているサイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ等のごく微量液性因子を捉えるのは困難である。

これらのタンパク質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。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5-45% ACN,100min, 45-95% ACN, 20minといったグラジエントでペプチドの分離方法を確立した。この他にも質量分析装置はハード面でも進歩がめざましく、スキャンスピードも高速になり同定できるペプチドも格段に増加している。しかしながら、質量分析装置は高額であるため、それらの更新は困難である。現行の質量分析装置でペプチドの同定数を上げるには、よりペプチドの分離を行う必要があるため、0.1 x 2000 mmといった非常に長いカラム (MonoCap C18 High Resolution; GL Science Inc.)を用いて、これまでよりペプチドを分離し、さらに同定数を上げられないかについても検討を行っている。

タンパク質の定量解析 (定量プロテオミクス) の検討

これまで質量分析によってデータ依存的解析 (Data Dependent Acquisition ; DDA) による発現タンパク質の同定が行われて来たが、十分な定量を行うことは困難であった。定量を行うにあたっては iTRAQ 等のリポーターイオンをベースとした定量解析を行う必要があった。この方法では同定されたペプチド・タンパク質だけが定量解析の対象であり、さらには iTRAQ 等の試薬が高額なため、多数のサンプル処理は困難であった。そこで、安定同位体の ^{18}O を用いたプリカーサーイオンをベースとした定量解析を行うことにより極微量の変化も捉えることが可能となった。これらをもとに各検体の定量プロテオミクスを行う予定でいたが、ソフトウェアの進歩によってデータ依存的解析 (DDA) のデータから直接定量情報を得ることができる Label-free quantification (LFQ)ができる Proteome discoverer 2.3 software (Thermo Fisher Scientific)が開発された。これらによって複雑な操作なしで、安定同位体の標識試薬を使うことなく、サンプル間に共通したペプチド由来のプリカーサーイオンの量を用いて相対定量を行えるようになった。そこで、このソフト導入してこれまでに質量分析で得られた網羅的解析のデータを用い検討を行っている。今後、これらの解析から相対的な定量データが得られれば、パスウェイ解析などによって、疾患群でどのような経路が変化しているのかについての情報が得られ、これから解析を行う血液バイオマーカーや治療標的の開発に役立つことが期待される。

D. 考察と結論

最近 AD 患者脳と脳脊髄液の大規模プロテオーム解析によって、ミクログリアとアストロサイトの活性化に関わるエネルギー代謝の初期変化が明らかとなった (Johnson ECB et al, Nat Med, 2020)。これらの報告でも定量的質量分析法と共発現ネットワーク解析の手法が用いられ、今後バイオマーカーや治療標的の開発にはこれらの解析手法がより頻繁に用いられることが予想される。本研究においてもこの定量プロテオミクスとパスウェイ解析によって、AD 病態に関連する液性因子からバイオマーカーの同定を試みる。AD 病態の進行とともに変化する液性因子が見つければ、診断のためのバイオマーカーとなる可能性がある。もし、それらが血液で検出できれば、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、治療薬の評価にも利用できる可能性がある。また、全ての医療機関で、正確な鑑別診断ができ、今までより早期に治療を開始することで、患者の増加を抑えることが可能となる。さらに、AD を正確に診断、評価することで、無駄な投薬をなくし、効果的な治療を行うことで高騰する医療費の削減ができる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究は初年度で、また、ヒト試料を用いた研究であるため、臨床試料の解析については、倫理・利益相反委員会で審査・承認を得たばかりであり、今年度における論文発表の実績はまだありません。

2. 学会発表

1) Zhou CY, Jung CG, **Watanabe A**, Ferdous T, Abdelhamid M, Michikawa M.

Sirt2 increases tau phosphorylation via ERK activation.

第 39 回日本認知症学会学術集会, 2020 年 11 月 (名古屋)

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