

アルツハイマー病の脳内炎症で変動するタンパク質の解析（24-18）

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

アルツハイマー病（AD）では β アミロイド蛋白（ $A\beta$ ）が凝集・蓄積する過程において、神経変性を引き起こし、認知機能が低下し、ADに至るといったアミロイド仮説が中心となって研究が行われているが、未だ完全な解明はなされていない。タウ病態に関しては、 $A\beta$ が蓄積することによって、脳内で慢性炎症が起こり、それらがタウのリン酸化さらには異常なタウの伝播、蓄積を誘導する機序が想定されている。ADと異なり、神経原線維変化型老年期認知症(SD-NFT)は海馬を中心に多数のNFTが認められ、その形態やタウのアイソフォームはADと同様であるが、老人斑をほとんど認めず、NFTの伝播や認知症の進行は緩徐である。そこで、アミロイド病理と神経原線維変化が共存することで、AD病態が促進すると想定されている。脳虚血とそれに伴う慢性炎症はアミロイド病理のみならず、タウ病理にも関与する事が報告されており、脳虚血、慢性炎症のタウ病理における役割を調べることは、AD病態の解明につながると考えられる。本研究では、脳虚血により脳内炎症が誘導され、認知症を発症したモデル動物を用いて、 $A\beta$ 、タウの変化の解析に加え、慢性炎症で変動するタンパク質の解析を行う。特にカンクイザルは、ヒトと同じ霊長類であり、タウもマウスとは異なり、ヒトと同じ3リピートタウと4リピートタウを有し、6アイソフォームである。霊長類脳虚血モデル動物では $A\beta$ 病理、タウ病理を自然発症するため、ヒトの病態に最も近い現象を捉えることが期待され、タウのリン酸化や伝播、蓄積、神経変性の新たなメカニズムの解明につながる可能性がある。

さらに脳内炎症の引き金となる $A\beta$ が凝集・蓄積する機構を解明するために、 $A\beta$ 合成ペプチドを用いて、ヒト血漿中で $A\beta$ オリゴマー形成実験を試み、どのような条件、どのような因子によってオリゴマー化が起こるのかをウエスタンブロットで解析を試みた。血漿中で $A\beta$ 1-40を加えたインキュベートで、低分子領域では $A\beta$ オリゴマー抗体との反応は見られなかったが、250kDa以上の高分子領域で2本のバンドが観察された。これらは $A\beta$ 1-40にリコンビナントApoBを添加することによって、血漿中で見られた2本のバンドが再現された。これらが $A\beta$ 単体で形成されているのか、ApoB、ApoE等、血漿中に含まれる分子が結合して構成されているのかについて、さらに解析を試みている。

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）

分担研究者

脇田 英明 三重大学 医学系研究科（プロジェクト研究員）

A. 研究目的

AD 病理の促進因子である脳虚血、脳内炎症と A β 病理、タウ病理を自然発症するカニクイザルに脳虚血を負荷し、認知機能低下を発症した認知症モデル動物脳の A β 、タウなどの AD 関連タンパク質と炎症反応関連タンパク質の解析を行う。さらに、脳内炎症の引き金となる A β が凝集・蓄積する機構を解明するために、A β 合成ペプチドを用いて、ヒト血漿中で A β オリゴマー形成実験を試み、どのような条件、どのような因子によってオリゴマー化が起こるのか解析を試みた。これらによって、A β 、タウなどの AD 関連タンパク質と炎症反応関連タンパク質の変化を解析する。また、AD 患者の血漿を用いて同定された AD 病態に関与するタンパク質が、モデル動物脳でどのように変化しているかを解析し、AD の早期診断のためのバイオマーカー探索を目的として研究を行う。

B. 研究方法

1) モデル動物を用いた脳虚血、脳内炎症の解析

5歳から10歳の非高齢カニクイザルに対して、カテーテル操作により中大脳動脈を3時間閉塞すると、動物は脳梗塞を発症する。本動物の治療研究でコントロール薬物を使用した群の発症後3ヶ月後の虚血後慢性期の脳について病理解析を行った。組織障害について、Hematoxylin Eosin 染色を行い、梗塞巣の周辺領域を決定した。周辺領域を中心に、リン酸化タウに対する抗体のAT8、AT100、さらにはユビキチン、Iba-1、GFAPについて免疫染色を行った。

2) AD患者の血漿を用いた病態に関連するタンパク質の解析

A β 1-40 合成ペプチド(ペプチド研) 5 μ M を 37°C で 50mM Tris-HCl(pH7 もしくは pH9)で一晩インキュベートし、その変化を SDS 電気泳動後、銀染色もしくは A β 抗体(6E10)もしくは A β オリゴマー抗体 (A11)を用いたウエスタンブロットによってその反応性を比較した。また、A β のオリゴマーを見るために、リコンビナント ApoE2、ApoE3、ApoE4 (和光純薬)や 5 μ M コレステロールの添加も試み、A β のオリゴマー形成実験を試みた。さらに、ヒト血漿中でのインキュベートも試み、A β のオリゴマー化の違いについて解析を行った。

(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全く知ることができないようになっている。カニクイザルを用いた脳虚血モデルに関する動物実験は平成 19 年度から 21 年度にかけて、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医科学研究センターにて実施し、霊長類医科学研究センターの委員会で承認を得て（承認番号は、医 19-028、医 20-018、医 20-028、医 21-021、医 21-022）実施した。本研究では、すでに脳組織として保管されている試料を用いて実施している。

C. 研究結果

1. モデル動物を用いた脳虚血、脳内炎症の解析

霊長類脳虚血モデル動物としてカニクイザルを用い、脳梗塞の周辺領域の脳切片をリン酸化タウ抗体AT8で染色すると、神経細胞や軸索、アストロサイトで陽性が認められ、タウのリン酸化が亢進していることが確認された（図1）。AT8に加えて、脳虚血処置を行った非高齢カニクイザルの脳梗塞および周辺領域でリン酸化タウに対する抗体AT100陽性の神経細胞や顆粒状構造物、アストロサイトが認められた。また、ユビキチン陽性顆粒状構造物が認められた。同部位にはIba-1陽性ミクログリア、GFAP陽性アストログリアの増加が認められ、脳梗塞後の慢性期の炎症反応とタウのリン酸化、ユビキチン化が梗塞巣や梗塞巣周囲で共存していることが明らかとなった。脳虚血負荷のない非高齢カニクイザルでは脳内タウのリン酸化は認めないと報告されており、脳虚血、虚血後炎症反応と脳内タウのリン酸化との関連が明らかとなった。さらにカニクイザルの脳をホモジェネートし、細胞分画を行い、SDS泳動後、ウエスタンブロットを行い、タウ抗体と各種リン酸化特異抗体を用いて脳虚血によって脳内炎症を引き起こしたカニクイザルの脳でどのように変化するかの条件検討を行っている。現在、他のリン酸化抗体での染色を試みるとともに、生化学的解析によって、リン酸化部位の同定も試みている。



図1. 虚血カニクイザルの脳切片の AT8 抗体染色

2. AD患者の血漿を用いた病態に関連するタンパク質の解析

ADではA β が何らかの要因で凝集・蓄積する過程において、神経変性を引き起こすとされている。そのなかでも特にA β オリゴマーが神経細胞のシナプスを傷害し、神経毒性を呈することが発症のトリガーになるとされている。本研究ではA β 合成ペプチドを用いて、ヒト血漿中でA β オリゴマー形成実験を試み、どのような条件、どのような因子によってオリゴマー化が起こるのかウエスタンブロットで解析を試みた。

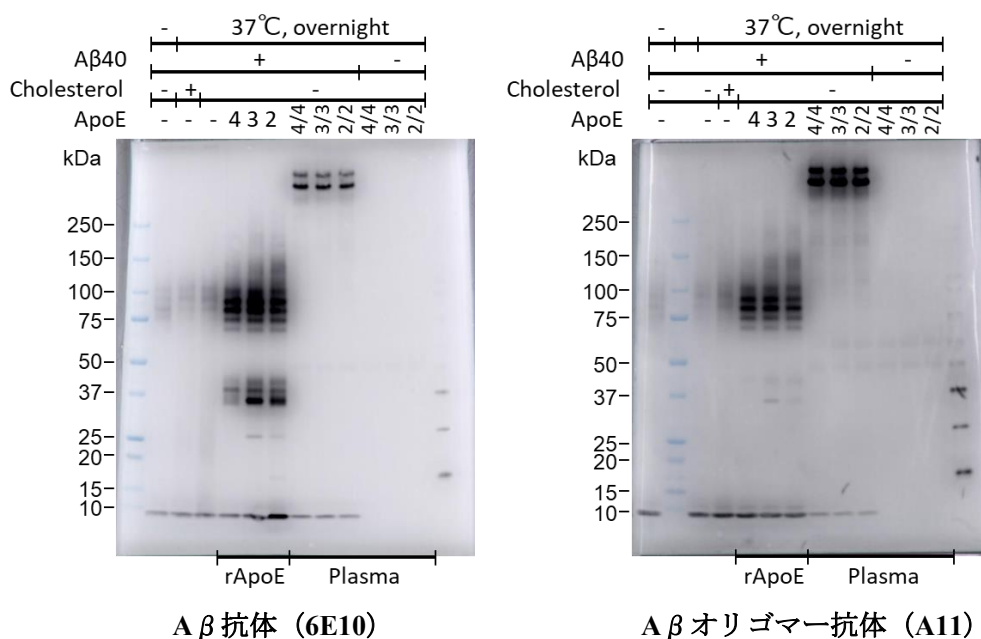


図2. rApoEの添加もしくは血漿中でのA β 1-40の変化

血漿にA β 1-40合成ペプチドを加えたところ、A β 抗体6E10及びA β オリゴマー抗体A11で反応する250kDa以上の高分子の2本のバンドが形成された(図2)。

血漿、血清、脳脊髄液(CSF)にA β 1-40を加え、PBS(pH7.4)中、一晚37℃でインキュベートし、6E10及びA11を用いたウエスタンブロットによってその反応性を比較した。その結果、血漿、血清では250kDa以上の高分子のバンドが形成されたが、CSFでは形成されなかった。そこで、250kDa以上の高分子のバンドはどのような因子によって形成されるのかを解析するために、血漿に高濃度で含まれる主要な14種類のタンパク質の抗体が結合した遠心フィルターを用いて分画を行った。血漿を遠心フィルターで精製し、高濃度に含まれる主要な14種類のタンパク質の抗体に結合するBound (high-abundant proteins; 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)画分と吸着しないFlow-through (low-abundant proteins)画分に分離した。分画前のCrudeな血漿(C)、Flow-through画分

(F)、Bound 画分 (B) にそれぞれ A β 1-40 を加え、pH7、一晚 37°C でインキュベートし、様々な抗体を用いたウエスタンブロットによってその反応性を比較した (図 3)。その結果、Bound 画分には 250kDa 以上の高分子のバンドが見られなかったことから、14 種類のタンパク質ではなかったことが判明した。一方、Flow-through 画分では A β 抗体でバンドが見られ、この画分中の何らかの因子が A β オリゴマー化に関与していることが判明した。

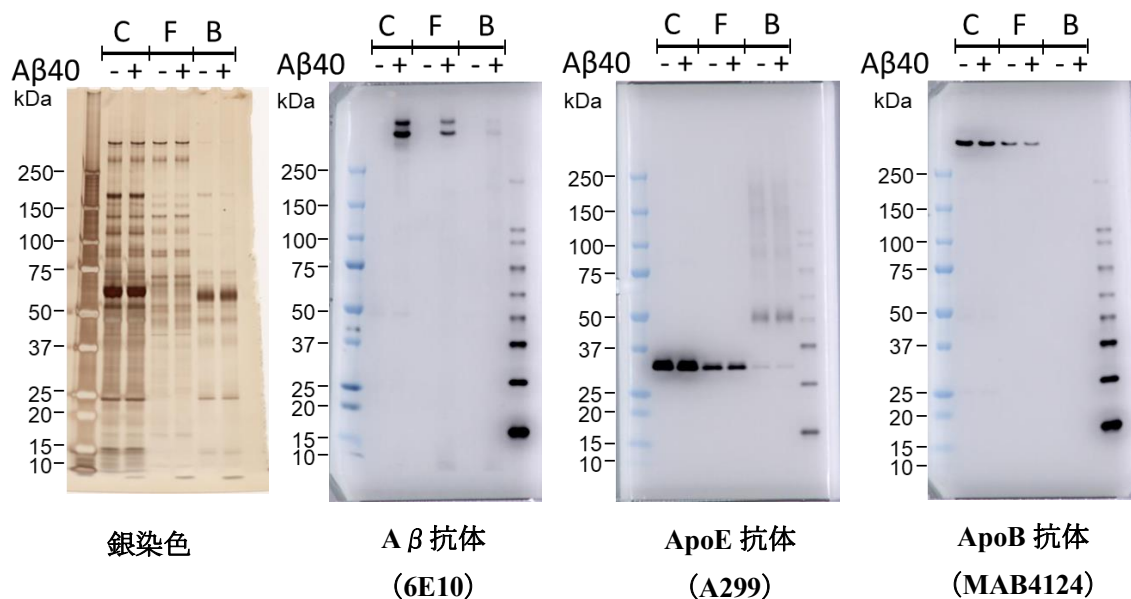


図 3. 血漿 (CN, ApoE3/E3) の各画分と A β 1-40 とのインキュベーション

合成 A β 1-40 ペプチド単独では 37°C でインキュベートしても A β オリゴマー化があまり起きなかった。ヒト血漿中には ApoE が豊富に存在することから、A β 1-40 合成ペプチドにリコンビナント (r) ApoE を加えたところ、オリゴマー化が促進されたものの 250kDa 以上の高分子のバンドは形成されなかった。また rApoE2、rApoE3、rApoE4 での違いは見られなかった。一方で rApoB と A β 1-40 を混合し、PBS (pH7.4) 中、一晚 37°C でインキュベートし、ウエスタンブロットによってその反応性を比較した結果、6E10 と A11 で 250kDa 以上の高分子の 2 本のバンドが確認された。ApoB の抗体では A β 抗体で確認されたバンドは見られなかったが、A β オリゴマー化に影響を及ぼすことが明らかとなった。これらが、A β 単体で形成されているのか、ApoB 等、血漿中に含まれる分子が結合して構成されているのかについて、さらに解析を試みている。

D. 考察と結論

5 から 10 歳の非高齢カニクイザルの脳梗塞後の慢性期で、炎症反応とタウのリン酸化、ユビキチン化が梗塞巣周囲で共存していた。高齢カニクイザルにおける脳内タウのリン酸

化の報告はあるが、非高齢カニクイザルでは脳内タウのリン酸化は認めないと報告されており、脳虚血、虚血後炎症反応が脳内タウのリン酸化を促進させることが明らかとなった。今後は、脳虚血負荷カニクイザル脳を用いて、虚血動物と sham、もしくは病変側と反対側の脳のプロテオーム解析を行い、タンパク質の変化を解析する。さらに、プロテオーム解析で得られた新規バイオマーカーの脳内分布や発現細胞を病理解析で同定する。

A β オリゴマー形成実験では、A β 1-40 合成ペプチド単独では 37°C でインキュベートしても A β オリゴマー化があまり起きなかったことから、リコンビナント ApoE を添加したところ、オリゴマー化が促進された。ヒト血漿中では ApoE が豊富に存在することから、血漿に A β 1-40 合成ペプチドを加えたところ、A β オリゴマー抗体 A11 で反応する 250kDa 以上の高分子の 2 本のバンドが形成された。しかしながら、ApoE については変化が見られなかった。この 2 本のバンドが血漿中のどの分子によってオリゴマー化されているのかを同定するために、高濃度に含まれる主要な 14 種類のタンパク質の抗体が結合したカラムを通して分離したところ、これらではなかったことが判明した。これまでの検索の結果、A β 1-40 にリコンビナント ApoB を添加することによって、血漿中で見られた 2 本バンドが再現された。これらが、A β 単体で形成されているのか、ApoB 等、血漿中に含まれる分子が結合して構成されているのかについて、さらに解析を試みている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuno F, Kimura Y, Ogata A, Ikenuma H, Abe J, Minami H, Nihashi T, Yokoi K, Hattori S, Shimoda N, **Watanabe A**, Kasuga K, Ikeuchi T, Takeda A, Sakurai T, Ito K, Kato T. Trait-anxiety and glial-related neuroinflammation of the amygdala and its associated regions in Alzheimer's disease: A significant correlation. *Brain Behav Immun Health*, 2024 May 14;38:100795, doi:10.1016/j.bbih.2024. 100795. eCollection 2024 Jul.
- 2) Gheni G, Shinohara M, Masuda-Suzukake M, Shindo A, **Watanabe A**, Kawai K, Bu G, Tomimoto H, Hasegawa M, Sato N. Cerebral hypoperfusion reduces tau accumulation. *Ann Clin Transl Neurol*, 2025 Jan;12(1):69-85. doi: 10.1002/acn3.52247. Epub 2024 Dec 2.
- 3) **Wakita H**, Takahashi Y, Masuzugawa S, Miyasaka H, Sonoda S, Shindo A, Tomimoto H. Alterations in driving ability and their relationship with morphometric magnetic resonance imaging indicators in patients with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*, 2024 Jul;24:830-837.

2. 学会発表

- 1) 山内夢叶, 渡邊 淳. $A\beta$ オリゴマー化を促進させる血中因子の解析. 6NC リトリート 2024. 2024 年 4 月 13 日, 東京.
- 2) 武倉アブドグプル, 篠原充, 鈴掛雅美, 渡邊 淳, 新堂晃大, 富本秀和, 長谷川成人, 里直行. タウをインジェクションした 5xFAD マウスにおける慢性脳低灌流の $A\beta$ やタウの蓄積に対する効果の解明. 第 66 回日本老年医学会学術集会, 2024 年 6 月 13 日, 名古屋.
- 3) 武倉アブドグプル, 篠原充, 鈴掛雅美, 新堂晃大, 渡邊 淳, 富本秀和, 長谷川成人, 里直行. 慢性脳低灌流はタウの蓄積を減少させる. 第 66 回日本老年医学会学術集会, 2024 年 6 月 13 日, 名古屋.
- 4) 安野史彦, 渡邊 淳, 木村泰之, 山内夢叶, 小縣 綾, 阿部潤一郎, 南 博之, 二橋尚志, 藤井克典, 服部沙織, 下田修義, 春日健作, 池内 健, 武田章敬, 櫻井 孝, 伊藤健吾, 加藤隆司. アルツハイマー型認知症における血漿 IL-6 濃度と精神行動症状の関係について. 第 39 回日本老年精神医学会, 2024 年 7 月 12 日, 札幌
- 5) 武倉アブドグプル, 篠原充, 鈴掛雅美, 渡邊 淳, 新堂晃大, 富本秀和, 長谷川成人, 里直行. タウを注入した 5FAD マウスにおける $A\beta$ 存在下で脳低灌流のタウ蓄積に対する効果の解明, 第 43 回日本認知症学会, 2024 年 11 月 22 日, 郡山.

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