

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 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 β ）が凝集・蓄積することからタウ病態等が進み、その結果、神経変性が起こり、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 β の蓄積が脳内で慢性炎症を誘導し、炎症に伴う分子がタウのリン酸化や異常なタウの伝播、蓄積を誘導する機序に関与していることが報告されている。一方、神経原線維変化型認知症（SD-NFT）はADと異なり、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、老人斑はほとんど出現せず、NFTの伝播や認知症の進行は緩徐である。この知見に基づき、アミロイド病理とタウ病理が共存することが、AD病態を促進すると考えられている。脳虚血による神経細胞障害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ことが報告されており、脳虚血、慢性炎症のアミロイド病理、タウ病理における役割を調べることは、ADの病態進行メカニズムの解明につながると考えられる。

脳虚血では、虚血導入後に神経細胞障害とともに、脳内に炎症反応が誘導されること、誘導された炎症反応が組織修復のみならず、細胞障害にも働くことが明らかとなっている。脳虚血とAD病理との関係については、ヒト剖検脳の解析結果から、脳血管障害とAD病理の高い共存率が報告され、脳虚血モデル動物を用いた実験では、慢性脳虚血がA β の沈着を促進する、脳虚血後にタウの過剰なリン酸化が誘導されるなど、脳虚血とそれに誘導される炎症反応がAD病理の促進因子であることが報告されている。ヒト剖検脳の解析では横断的な結果しか得られないが、動物モデルを用いることで、時間経過を追った病理変化を捉えることができ、縦断的な検討もできるため、A β 病理、タウ病理間の因果関係を明らかにしやすいことは最大の利点の一つである。

本研究では、脳虚血により神経細胞障害と脳内炎症が誘導され、認知機能低下を発症した認知症モデル動物を用いて、A β 、タウ等の変化に加え、炎症で変化するタンパク質の解析を行う。特にカニ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 β 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、蓄積及び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 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の血漿、血清及び脳脊髄液（CSF）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る。これらの解析によって AD の早期診断のためのバイオマーカーを探索する。

主任研究者

渡邊 淳 国立長寿医療研究センター 室長

分担研究者

脇田 英明 三重大学 寄付講座教授

研究期間 2024年4月1日～2026年3月31日

A. 研究目的

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 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。しかしながら、現在バイオマーカーとされる AD の血液中で変動する A β やタウは極微量で、免疫沈降後の質量分析、もしくは SIMOA 等の超高感度の装置を用いなければ検出できない。A β やタウは脳内に蓄積するタンパク質の解析から得られた結果であり、脳内の病態特異的タンパク質の解析は血中でのバイオマーカー探索に重要な知見をもたらすことが期待される。

本研究では、AD 病理の促進因子である脳虚血、脳内炎症とタウ病態に着目し、脳虚血を負荷し認知機能低下を発症したカニクイザルの脳を用いて A β 、タウや AD 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、ヒトの血漿、血清及び CSF 中での A β オリゴマー形成実験を試み、オリゴマー化に関連する因子の解析を試みる。これらの解析によって AD 病態の進行に関与する A β 、タウ及び関連タンパク質を調べ、神経変性メカニズムの解明と AD の早期診断のためのバイオマーカーを探索する。

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 (脇田)

脳虚血によって神経細胞障害と脳内炎症が誘導され、認知機能低下を起こしたカニクイザルの脳を用いて、病理学的、生化学的解析を行い、AD 関連タンパク質と炎症関連タンパク質の変化について解析する。具体的には活性化ミクログリアで発現が増加する Iba-1 や脳内のアストロサイトマーカーの GFAP、アミロイド前駆体蛋白質 (APP695) や Aβ (4G8)、アミロイドフィブリルに対する抗体及び AT8 や AT100 などのリン酸化タウに対する抗体を用いて、脳内変化についての免疫組織化学による病理解析を行う。

2) ヒトの血漿、血清及び CSF を用いた Aβ オリゴマーの解析 (渡邊)

Aβ1-40 合成ペプチドを用いて、ヒトの血漿、血清及び CSF 中で Aβ オリゴマー形成実験を行い、電気泳動及び Aβ 抗体 (6E10) もしくは Aβ オリゴマー抗体 (A11) を用いたウェスタンブロットで解析を試みた。さらに、AD 関連タンパク質の影響を明らかにするため、それらのリコンビナントタンパク質を用いた Aβ オリゴマー形成実験を行い、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る。

(倫理面への配慮)

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実施した (承認番号は、医 19-028、医 20-018、医 20-028、医 21-021、医 21-022)。本研究では、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所と国立大学法人三重大で研究試料提供契約を締結し、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よりカニクイザルの研究試料の提供を受けた。研究は、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た。

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「人を対象とする生命科学・医学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。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。

遺伝子操作や疾患モデル動物については、当センターの各専門委員会の審査、承認を得て実施した。動物実験では、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」等の遵守、遺伝子組換え実験では、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」等の法令を遵守して研究を行った。

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

脳虚血によって神経細胞障害と脳内炎症が誘導されたカニクイザルの脳を用いて、脳内における変化についてアミロイド、タウと炎症マーカーについて、免疫組織化学による病理学的解析を行った。具体的には活性化ミクログリアで発現が増加する Iba-1 や脳内のアストロサイトマーカーの GFAP、アミロイド前駆体蛋白質 (APP695) や Aβ (4G8)、アミロイドフィブリルに対する抗体および AT8 や AT100 などのリン酸化タウに対する抗体を用いて、病理解析を行った。

脳虚血処置後 3 ヶ月を経過した慢性期の非高齢カニクイザルの脳梗塞巣とその周辺領域でアミロイド前駆体蛋白 (APP695) や Aβ (4G8)、アミロイドフィブリルに対する抗体陽性の血管、神経細胞、顆粒状構造物が認められた (図 1)。同領域では、リン酸化タウに対する抗体 AT8、AT100 などが陽性の神経細胞や顆粒状構造物、アストロサイトも認められた (図 2)。また、ユビキチン陽性の神経細胞、顆粒状構造物が認められた。さらに、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た (図 3)、脳梗塞後の慢性期の炎症反応と Aβ の蓄積、タウのリン酸化、ユビキチン化が脳梗塞巣および周辺領域で共存していることが明らかとなった。

非高齢カニクイザルでは、脳虚血負荷がない場合、Aβ の蓄積や脳内タウのリン酸化は認めず、カニクイザルが高齢となってから認められると報告されており、脳虚血、虚血後炎症反応と脳内 Aβ の蓄積、脳内タウのリン酸化との因果関係が明らかとなった。

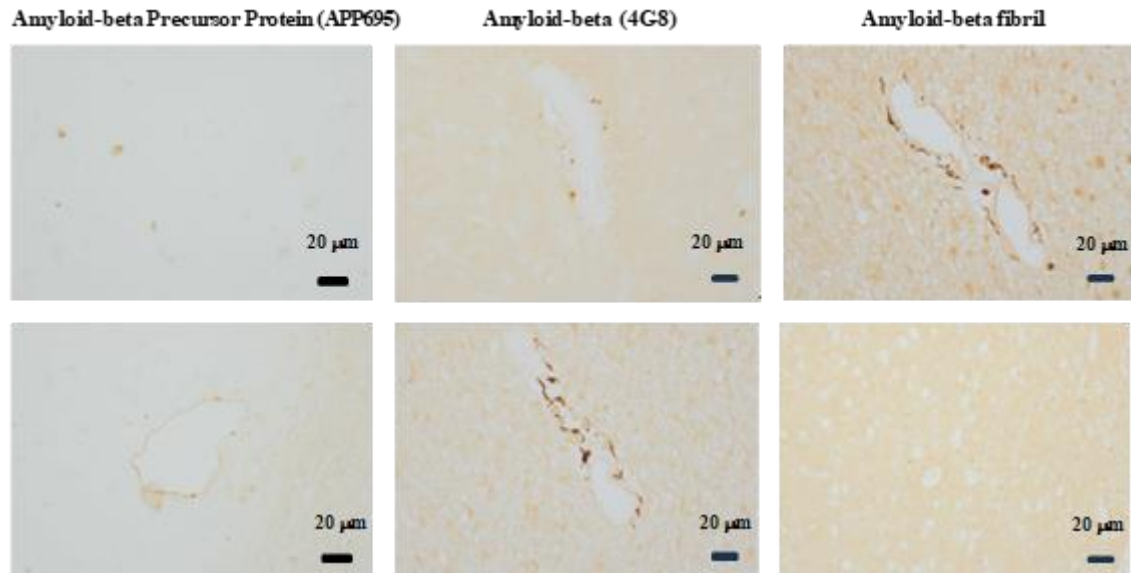


図 1. 脳内 β アミロイド蛋白の蓄積 (脳梗塞巣とその周辺領域)

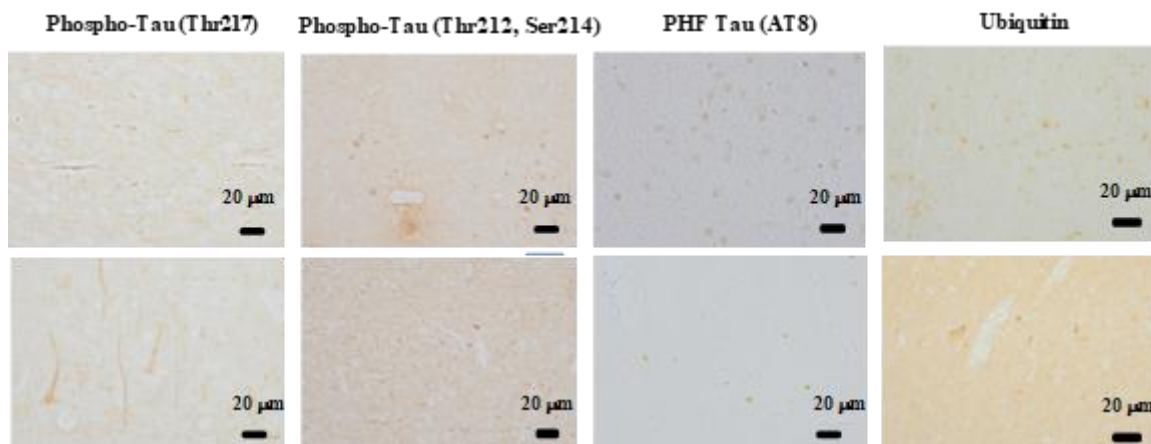


図 2. 脳内タウのリン酸化（脳梗塞巣とその周辺領域）

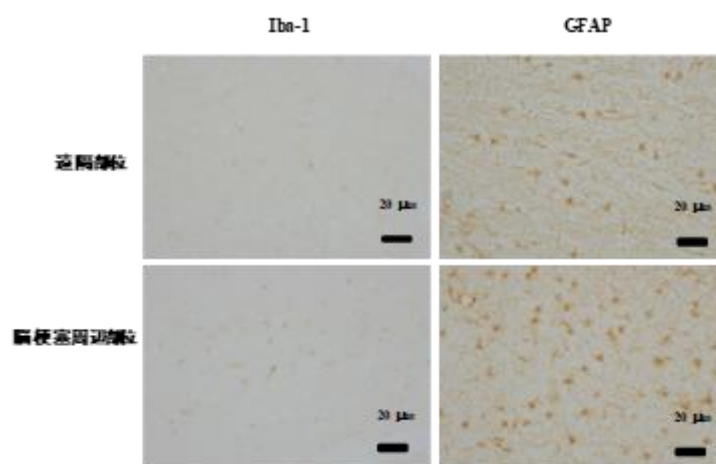


図 3. 脳内炎症反応

2) ヒト血漿を用いた病態に関連するタンパク質の解析（渡邊）

AD では Aβ が何らかの要因で凝集・蓄積する過程において、脳内炎症さらには神経変性を引き起こすとされている。そのなかでも特に Aβ 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 Aβ 合成ペプチドを用いて、ヒト血漿中で Aβ 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。

Aβ1-40 合成ペプチド単独では、37℃でインキュベートしても Aβ オリゴマー化があまり起きなかった。ヒト血漿に Aβ1-40 合成ペプチドを加えたところ、Aβ 抗体（6E10）及び Aβ 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 4）。ヒト血漿中には ApoE が豊富に存在することから、Aβ1-40 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。

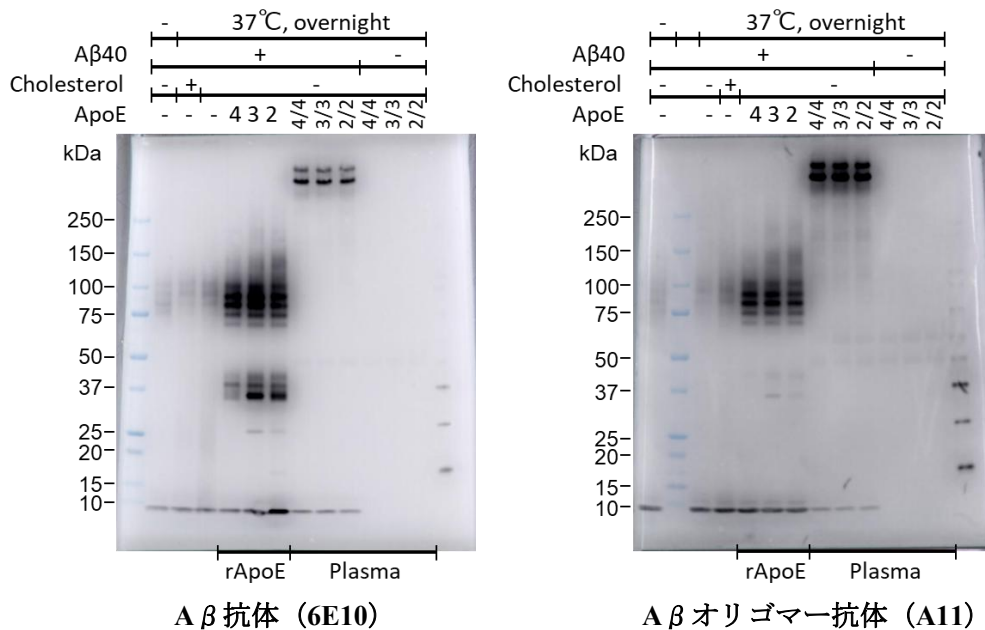


図 4. rApoE の添加もしくはヒト血漿中での Aβ1-40 の変化

さらに、血漿、血清、CSF それぞれで同様に Aβ オリゴマー形成実験を行ったところ、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。CSF 中では Aβ オリゴマーが形成されなかったことから、血液中に含まれる分子が Aβ オリゴマー形成に関与していると考えられる (図 5)。

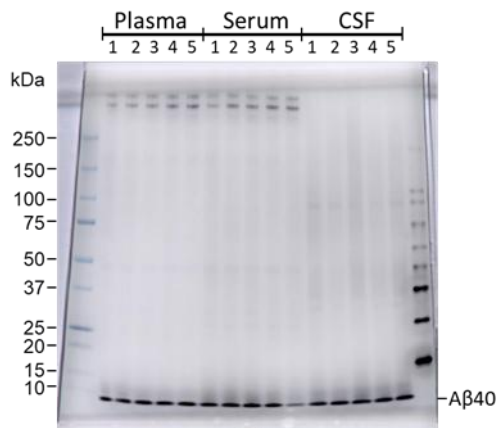


図 5. 血漿、血清もしくは CSF 中での Aβ1-40 合成ペプチドの変化

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 6)。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。

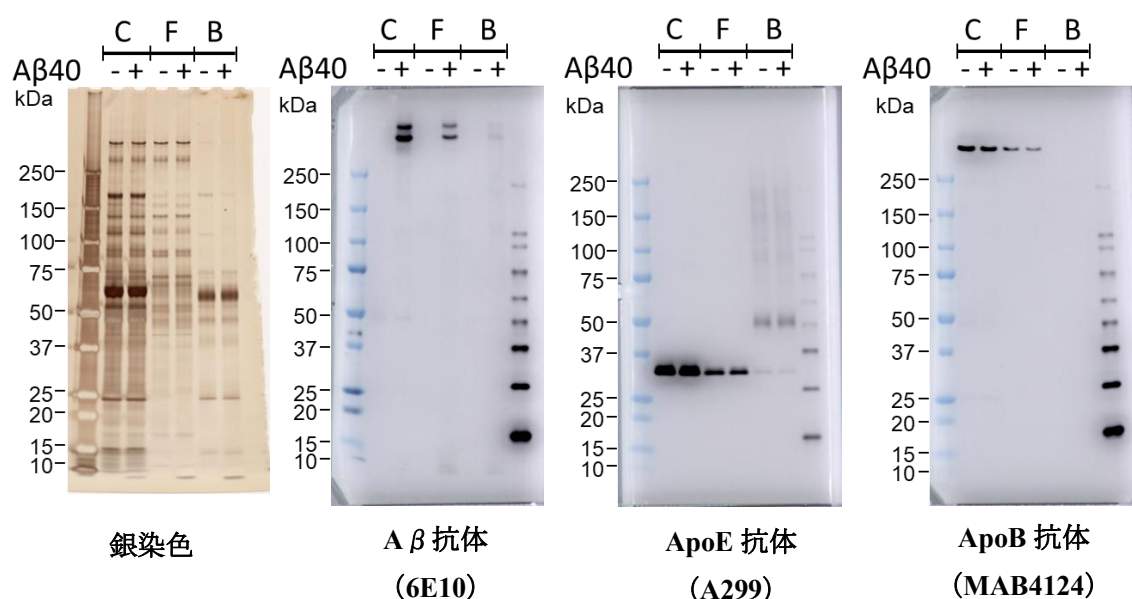


図 6. ヒト血漿 (認知機能正常、ApoE3/E3) の各画分と A β 1-40 とのインキュベーション

D. 考察と結論

脳虚血後慢性期の非高齢カニクイザルの脳梗塞巣及び周辺領域に Iba-1 陽性ミクログリア、GFAP 陽性アストロサイトの増加が認められ、同じ部位にアミロイド前駆体蛋白 (APP695) や A β (4G8)、アミロイドフィブリルに対する抗体陽性の血管、神経細胞、顆粒状構造物が認められた。同領域には、リン酸化タウに対する抗体 AT8、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、ユビキチン陽性の神経細胞、顆粒状構造物が認められた。これらのことから、脳虚血、虚血後炎症反応と脳内 A β の蓄積、脳内タウのリン酸化との空間的関連を確認した。さらに、カニクイザルの自然経過を検討した研究 (Oikawa et al. Brain Res. 2010) では、非高齢群では A β の蓄積や脳内タウのリン酸化は認めなかったと報告されており、本研究でも非虚血部位では A β の蓄積やタウのリン酸化の存在は確認できなかった。以上より、脳虚血、虚血後炎症反応と、A β の蓄

積や脳内タウのリン酸化は単なる共存ではなく、脳虚血、虚血後炎症反応を誘導することにより A β の蓄積や脳内タウのリン酸化が生じたと考えられ、時間的な因果関係も確認された。

A β 合成ペプチドを用いて、A β オリゴマー形成実験を行ったところ、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。ヒト血漿では 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。さらに、血清、CSF においても同様の実験を行ったところ、血清では 250kDa 以上の高分子のバンドが形成されたが、CSF においては形成されなかった。これらの結果から、血液中に含まれる分子が A β オリゴマー形成に関与していると考え、ヒト血漿を 14 種類のタンパク質の抗体が結合したフィルターを用いて分画し、同様の実験を行った。その結果、14 種類のタンパク質を除いた画分において 250kDa 以上の高分子のバンドが見られた。そのため、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。

(参考文献)

Oikawa N, Kimura N, Yanagisawa K. Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition. *Brain Res.* 2010 Feb;1315: 137-149.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2024年度

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;38: 100795.

2) 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.

3) 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: 69-85.

2025年度

- 1) Nishigaki A, Ishikawa H, Nishiguchi Y, Tachibana K, Kato N, Matsuda K, Mori Y, Matsuyama H, Matsuura K, Ii Y, Wakita H, Oikawa S, Tomimoto H, Shindo A. Alpha-1-acid glycoprotein as a potential serum biomarker for cerebral amyloid angiopathy. J Alzheimers Dis. 2025 Jun;105: 1007-1016.
- 2) Yasuno F, Watanabe A, Kimura Y, Yamauchi Y, Ogata A, Ikenuma H, Abe J, Minami H, Nishihashi T, Yokoi K, Shimoda N, Kasuga K, Ikeuchi T, Takeda A, Sakurai T, Ito K, Kato T. Plasma IL-6 Levels as a Biomarker for Behavioral Changes in Alzheimer's Disease. Neuroimmunomodulation, 2025 Aug;32: 233-244.
- 3) Machino Y, Wakita H, Niwa A, Tomimoto H, Shindo A. Alterations of the Cytokines, Chemokines, and Growth Factors in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Advanced-stage Amyotrophic Lateral Sclerosis. Internal Med. 2025 Sep;65: 1115-1119.

2. 学会発表

2024年度

- 1) 山内夢叶, 渡邊淳. Aβ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 Aβ 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) 山内夢叶, 渡邊淳. Aβオリゴマー化を促進させる血中因子の検索. 第 9 回 NCGG サマリーサーチセミナー. 2024 年 8 月 22 日, 大府.
- 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 Aβ 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.

2025年度

- 1) 山内夢叶, 渡邊淳. アポリポタンパク質 E 存在下におけるアミロイド β オリゴマー形成機構の解析. JH リトリート 2025. 2025 年 6 月 7 日, 東京.
- 2) 山内夢叶, 渡邊淳. ApoE 存在下における Aβ オリゴマー形成機構の解析. 第 10 回 NCGG サマリーサーチセミナー. 2025 年 8 月 21 日, 大府.

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