

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650185

研究課題名（和文） アミロイド β 43を指標とするアルツハイマー病早期診断法の開発研究課題名（英文） Establishment of the diagnostics of Alzheimer's disease using A \cdot 43

研究代表者

斉藤 貴志 (SAITO TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・神経蛋白質制御研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：90360552

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病(AD)の早期診断を実現するためには、病態を反映するマーカーを選出し、それを高感度に、特異的に、定量的に捉える必要がある。我々は、加齢依存的な増加を示すA \cdot 43が、早期診断マーカー候補として有用である可能性を見出した。そこで、A \cdot 43の高感度検出法を確立し、生体サンプル中のA \cdot 43の測定を行った。その結果、A \cdot 43が、ADの病態形成において重要な役割を果たしていることを明らかにし、AD早期診断マーカー候補として有用であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Establishment of an early diagnosis for Alzheimer's disease (AD) is one of the important missions in an aging society. Recently, we found that A β 43 is generated under an age-dependent manner, thereby it might be a good candidate as a marker for an early diagnosis of AD. Herein, we established a high-sensitive and quantitative method to detect A β 43 specifically in the sample from mice and human materials. Finally, we concluded that A β 43 has a potent pathogenicity, and would be an useful candidate for an early diagnosis for AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病、トランスレーショナルリサーチ、早期診断

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)の病理形成機構は、

加齢に伴うアミロイドβペプチド(Aβ)の脳内での凝集・蓄積が発端となり、神経炎症、過剰リン酸化タウの凝集・蓄積、そして神経細胞死へと至る“Aβカスケード仮説”が広く支持されている。このカスケードの上流にあるAβ蓄積は、ADを発症する数十年も前から始まっており、このことがADの予防・治療を困難にしている要因の一つである。このため、発症以前から変動する、病因関連因子を捉えることが、AD早期診断法に直結すると考えられている。しかし、これまで挙げられてきた病因関連候補因子の因果関係が明確でないため、ADの早期診断に直結する方法の確立は困難な局面に陥っていた。

2. 研究の目的

最近我々は、Aβ43が加齢に依存して、かつ病理形成に先行して脳内で増加していることを見出した。そこで、Aβ43を特異的高感度で定量的に検出する方法を開発し、AD病態におけるAβ43の役割を明らかにすることを目的とする。最終的には、Aβ43を指標としたAD早期診断法を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

・Aβ43-ELISAシステムの構築

最近我々が確立した、ELISAシステムの更なる高感度化のために、Aβ43を特異性高く、高感度で認識する抗体の選別を行う。次に、発色試薬の選択を行う。一般的な、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(HRP)の基質となる化学吸光基質による発色よりも、蛍光基質を使った発色で高感度解析を実現した方法が報告された(*Acta. Neuropathol.* **119**, 543-554, 2010)ため、この方法の導入を試みる。最終的には、現行の方法の10~100倍の高感度化を目標に検討を進める。

・生体試料中のAβ43の測定

野生型マウス及びADモデルマウスの脳、血液サンプルを用いて、Aβ43の濃度測定を行う。次に、我々が保有しているAD患者から採取された血漿サンプル中のAβ43濃度の測定を行い、各AD病態ステージにおけるAβ43濃度の相関性まで検討を行う。

4. 研究成果

従来のAβ43-ELISA法へ、蛍光基質(AmplexUltraRed)による発色・検出法を導入したことで、高感度ELISA法の構築に成功し(従来の方法の10倍以上の高感度化)、また、測定レンジも広範濃度に渡り特異的にAβ43を捉える事が明らかとなった。この測定系を

用いることで、野生型及びADモデルマウス脳内でのAβ43濃度の定量に成功した(図1, 2: *Nature Neurosci.* **14**, 1023-1032 (2011)の supplementary Fig.6,7をそれぞれ改変)。この結果から、これまでのAD研究の解析の中心であったAβ40やAβ42は、マウスの出生から生理的に産生されているのに対し、Aβ43はAD病理の形成に先行して加齢依存的に産生されるという時系列を捉える事に成功した。すなわち、Aβ43がAD早期診断だけでなく「脳の老化」の指標となる有用なマーカー分子候補になり得る事が示された(*Nature Neurosci.* **14**, 1023-1032 (2011))。

実際に、確立した高感度ELISA法で、患者

Aβ43 ELISA

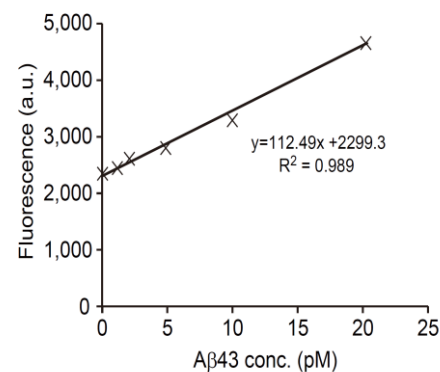


図1. AmplexUltraRed 蛍光試薬を用いることでAβ43を高感度(1 pM オーダー)で検出することができた。血漿中のAβ43の定量を行ったが、長期保管

Aβ43 ELISA

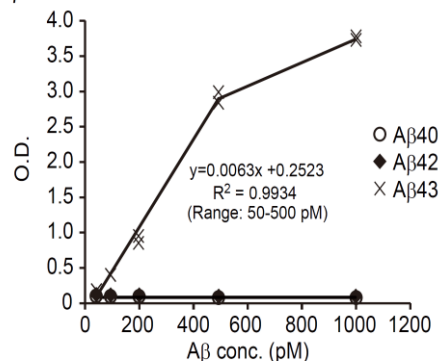


図2. Aβ43-ELISAは、広範濃度においてAβ43を特異的に検出することが出来る。

によるサンプルの劣化のため、サンプルの質が担保されず、整合性のある結果を得る事が困難であった。しかしながら、この成果を基にAD患者の血液におけるAβ43濃度・比率の測定が駒野らによりなされた結果、例数が少ないながらも、実際のAD患者においてAβ43比率が増加傾向にあることが示され、今後さらに解析を進める重要性が他のグル

ープからも示された(Zou K. et al. *Translational Medicine* (2011))。

以上の結果から、A β 43 は、AD 診断マーカーとして有用な標的であると考えられる。健常者、老齡健常者と軽度認知機能障害患者および AD 患者の血液等を用いて、更なる検討を加えることで、AD 早期診断法の確立への応用の可能性が高く、今後の展開が強く望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. **Takashi Saito**, Takahiro Suemoto, Nathalie Brouwers, Kristel Slegers, Satoru Funamoto, Naomi Mihira, Yukio Matsuba, Kazuyuki Yamada, Per Nilsson, Jiro Takano, Masaki Nishimura, Nobuhisa Iwata, Christine V. Broeckhoven, Yasuo Ihara, Takaomi C. Saido: Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nature Neuroscience* **14**, 1023-1032 (2011).

[学会発表] (計 6 件)

1. 垣矢直雅、**斉藤貴志**、Per Nilsson、松葉由紀夫、津吹聡、西道隆臣「The role of intracellular domain in neprilysin for the metabolic pathway and enzymatic activity of neprilysin」日本生化学会 (ポスター発表) 2012 年 12 月 15 日・福岡国際会議場

2. **斉藤 貴志** 「アミロイド β 43 によるアルツハイマー病の病態発症・促進機構に関する研究」日本生化学会 (日本生化学会奨励賞受賞講演) 2012 年 12 月 14 日・福岡国際会議場

3. **斉藤 貴志**、松葉 由紀夫、三平 尚美、岩田 修永、高野 二郎、Per Nilsson、西道 隆臣「新規 APP ノックインマウスの作製と応用」日本認知症学会学術集会 (口頭・ポスター発表) 2012 年 10 月 26 日・つくば国際会議場

4. **Takashi Saito**, Yukio Matsuba, Naomi Mihira, Nobuhisa Iwata, Jiro Takano, Per Nilsson and Takaomi C. Saido 「Novel type and more relevant model mouse for Alzheimer's disease」 Annual meeting of Society for Neuroscience 2012 (ポスター発表) 2012 年 10 月 15 日・ニューオリンズ (アメリカ)

5. **Takashi Saito**, Yukio Matsuba, Naomi Mihira, Nobuhisa Iwata, Jiro Takano, Per Nilsson and Takaomi C. Saido 「APP knock-in mouse: a novel and more relevant model mouse for Alzheimer's disease」 Alzheimer's Association International Conference 2012 (ポスター発表) 2012 年 7 月 15 日・バンクーバー (カナダ)

6. 垣矢直雅、**斉藤貴志**、津吹聡、西道隆臣 「Analysis of the regulatory mechanisms of neprilysin activity」日本生化学会 (ポスター発表) 2011 年 9 月 24 日・京都国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
所属研究室のホームページ URL
<http://www.brain.riken.jp/labs/pns/>

「受賞」

本研究成果を含む一連の成果により、平成 24 年度 日本生化学会奨励賞、および平成 25 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 貴志 (SAITO TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・神経蛋白質制御研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：90360552

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし