

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18854

研究課題名(和文)アルツハイマー病関連ペプチドによる早期生化学診断法の開発

研究課題名(英文) Alzheimer's disease-related peptides as a biomarker for diagnosis in early stage Alzheimer's disease

研究代表者

羽田 沙緒里 (HATA, Saori)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40581012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：患者数の増加が問題となっているアルツハイマー病(AD)は、脳内において病態変化が起こってから認知症を発症するまでの期間が長く、発症予防や根本的治療法の開発のためには発症前あるいは発症初期段階で脳内の病態変化を捉えられる方法を確立することが重要である。本研究はAD関連ペプチドであるp3-AIcの中で、ADの病態変化を感度良く反映しうる分子種の同定を行い、その分子種の定量系の構築を行った。またAD患者検体を用いた解析を行い、p3-AIcの早期診断マーカーとしての有用性を検証した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common senile dementia. AD pathology in the brain is estimated to progress over years prior to detectable cognitive impairment. Biomarkers for early detection of AD may be necessary to develop effective AD treatment. In this study, we identified p3-AIc peptides as a useful indicator of AD pathogenesis, and developed the sELISA system of the peptides. Quantitative analyses of p3-AIc peptides indicate that p3-AIc may be useful biomarker for early diagnosis of AD.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い、認知症の最大疾患であるアルツハイマー病 (AD) 患者の増加が社会的な問題となっているが、いまだ根本的な治療法は確立されていない。その原因として、AD は脳内において病態変化が起こってから認知症を発症するまでに 20 年程度かかり、徐々に神経変性が進むため、認知症を発症してからの治療では遅すぎるのが一因として考えられる。そのため、認知症発症前段階あるいは発症初期段階の脳内の病態変化を簡便に捉えられる方法を確立することが、有効な治療法の開発を行い、また治療薬候補の効果を評価するために重要となる。

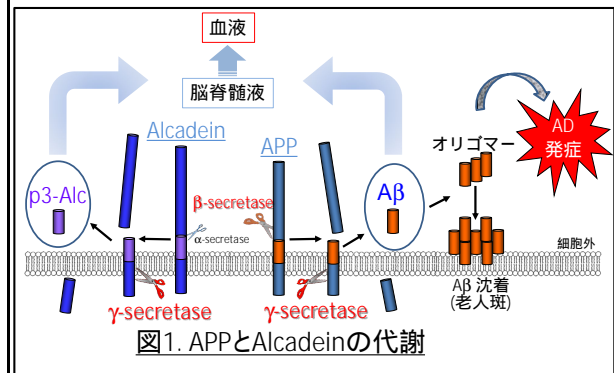
2. 研究の目的

AD の病理学的特徴として脳への老人斑の蓄積が挙げられる。家族性 AD 家系から見つかった遺伝子変異の大部分は老人斑の主要構成成分である A_β の産生を変化させるものであるため、A_β が AD 発症に深く関わると考えられている。AD の 9 割以上を占める孤発性 AD では、家族性 AD のように遺伝子変異を持たず、高齢になってから発症する点は異なるが、病態は同様である。凝集性が高く神経毒性が強いオリゴマーを形成するマイナーな A_β 分子種である A_β 42 は、特に AD 発症に関与していると考えられているが、その凝集性の高さのため、脳脊髄液や血液検体から正味の産生量・産生量比を捉えることが難しい。

Alcadein は、A_β の前駆体タンパク質 APP と細胞質タンパク質 X11L を介して複合体を形成する I 型膜タンパク質である。Alcadein は APP と同様の代謝を受けることによって、A_β 様のペプチドである p3-Alc を細胞外に分泌する (図 1)。

APP と Alcadein は二段階の切断を受けることによってそれぞれ A_β と p3-Alc を産生する。APP と Alcadein の二次切断を担うセクレターゼの触媒サブユニット Presenilin には、これまでに家族性 AD 家系から多くの遺伝子変異が見つかり、これらの変異は A_β 42 の産生量や産生比率を変化させるものが多い。Presenilin の家族性 AD 変異体を発現させた培養細胞から分泌される p3-Alc は、A_β 42 の産生比率増加に相関してマイナーな分子種の産生比率が増加することがわかった。また、p3-Alc は A_β 42 とは異なり非凝集性であり、脳脊髄液および血中に A_β と同程度量存在することから、p3-Alc は AD に関連した A_β 42 の産生比率の変化を反映しうるペプチドであることが示唆され、さらに AD 患者で

本研究は p3-Alc の高感度定量系を確立し、AD 患者検体を用いて、p3-Alc の量的・質的解析を行うことにより、p3-Alc ペプチドの AD 早期バイオマーカーとしての応用の可能性を検証することを目的として実施した。



3. 研究の方法

(1) A_β 42 に相当する p3-Alc 分子種の検出

Alcadein はヒトでは Alcadein₁、Alcadein₂、Alcadein₃ の三種類のファミリー分子から構成されており、Alcadein から産生される p3-Alc を p3-Alc と呼ぶ。家族性 AD Presenilin 変異体を発現した培養細胞を用いた解析から、A_β 42 の産生比率変化と相関する p3-Alc 分子種は p3-Alc₃₈ であることが示唆されていたが、切断酵素に変異を持たない孤発性 AD 患者における A_β 42 の産生比率の変化を p3-Alc が反映しうるかを明らかにする必要がある。

そのため、野生型 Presenilin を発現する培養細胞において、A_β 42 の産生比率を増加させる化合物 Aftin (A_β 42 inducer) を用いて、産生される p3-Alc 分子種の比率解析を行った。具体的には、抗 p3-Alc 抗体を用いて培養細胞の培地中に分泌された p3-Alc を回収し、MALDI TOF/MS で p3-Alc の各分子種を検出し、ピーク比率を計算し解析した。

(2) p3-Alc₃₈ 特異的 sELISA 定量系の構築

これまでに p3-Alc の主要分子種である p3-Alc₃₅ および p3-Alc_{total} を定量可能な sELISA 系を作成し、この系を用いて孤発性 AD 患者の脳脊髄液および血液中の p3-Alc の定量解析を行い、孤発性 AD 患者では変化がみとめられることが明らかとなったが、マーカーとして応用するには診断感度および特異性が不十分であった。また MALDI TOF/MS 解析の結果、p3-Alc₃₈ の比率が孤発性 AD の発症初期段階から増加する患者が一定数いることが明らかとなり、p3-Alc₃₈ を簡便に定量可能な系を作成することによって、感度良く AD の診断を行うことが可能となることが示唆された。そのため、p3-Alc₃₈ を特異的に定量可能な sELISA 系の作成を行うために、高力価抗体の作成およびそれらを組み合わせた測定系の構築を行った。

(3) 孤発性 AD 患者サンプルを用いた p3-Alc₃₈ 分子種の定量解析

(2) で作成した定量系を用いて孤発性 AD 患者および non AD のヒトの脳脊髄液を用いて p3-Alc₃₈ の定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) A 42 に相当する p3-Alc 分子種の検討

A 42 の産生比率を増加させる化合物である Aftin5 を Alcadin 発現 HEK293 細胞に作用させ、分泌された p3-Alc の解析を行った。その結果、Aftin5 の量依存的に A 42 比率が増加し、それに伴い p3-Alc 38 の比率が増加することが明らかとなった(図 2)。このことから、A 42 の比率変化を p3-Alc 38 が捉えられることが示唆された。

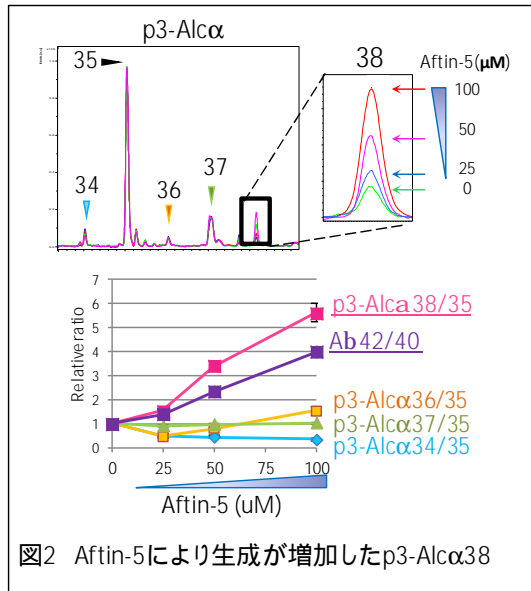


図2 Aftin-5により生成が増加したp3-Alc38

(2) p3-Alc 38 特異的 sELISA 定量系の構築

(1) およびこれまでの解析より p3-Alc 38 の有用性が示唆されたので、p3-Alc38 を特異的に定量可能な sELISA 系の作成を行った。その結果 50pg/mL 程度まで定量可能な sELISA 系を構築することができた。

p3-Alc の主要分子種である p3-Alc 35 は脳脊髄液中に 3000~10,000pg/mL 程度存在し、p3-Alc 38 はその 1/20 ~ 1/100 程度の存在量であると見積もられたことから、脳脊髄液中の p3-Alc 38 は定量可能な感度の sELISA 系を作成することができた。

ヒト脳脊髄液中の p3-Alc が定量可能であることを検証した結果、緩衝液で脳脊髄液を希釈することによって、この定量系で定量可能であることが明らかとなった。

(3) 孤発性 AD 患者サンプルを用いた p3-Alc38 分子種の定量解析

(2) で作成した p3-Alc 38 特異的 sELISA 系を用いて、non AD、MCI (軽度認知機能障害) AD 患者の脳脊髄液を用いた定量解析を行った。

その結果、nonAD 群と比較して、MCI では p3-Alc 38 が増加傾向にあり、AD 患者では有意に増加することが明らかとなった。

(4) 今後の展望

ヒト CSF 中で p3-Alc 38 を定量可能な系

を作成することができ、孤発性 AD 患者では発症初期段階から A 42 に相当する p3-Alc 38 の比率が増加する AD 患者が一定数いることが明らかとなった。今後、検体数やコホートを増やして、さらに解析を進めていく必要がある。

また p3-Alc 38 はマイナー分子種であり、作成した定量系では脳脊髄液中の p3-Alc 38 は測定できたが、脳脊髄液から血中に一部移行する血中 p3-Alc 38 の定量系を確立することはできなかった。現在抗体作成および高感度測定系の構築を行っており、将来的には血液で AD 発症予備群をスクリーニングによって検出できるバイオマーカーとして応用が可能か検証していく。

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6件)

Motodate, R., Saito, Y., Hata, S.,

Suzuki, T. (2016) Expression and localization of X11 family proteins in neurons. *Brain Res.* 1646, 227–234 査読有り

DOI: 10.1016/j.brainres.2016.05.054

Portlius E, Durieu E, Bodin M, Cam M, Pannee J, Leuxe C, Mabondzo A,

Oumata N, Galons H, Lee J-Y, Chang Y-T, Stuber K, Koch P, Fontanine G, Potier M, Manouspoulou A, Garbis S, Covaci A, VanDam D, De Deyn P, Karg F, Flajolet M, Omori C, Hata S, Suzuki T, Blennow K, Zetteberg H, and Meijer L. (2016) Specific triazine herbicides induce amyloid β 42 production. *J. Alzheimer Dis.* 54, 1593-1605 査読有り

DOI: 10.3233/JAD-160310

DOI: 10.3233/JAD-160310

§Kimura, A., §Hata, S., Suzuki, T.

(2016) Alternative Selection of BACE1 Cleavage Sites in APP Harboring Protective and Pathogenic Mutations Within the A β Sequence *J. Biol. Chem.* 291, 24041-24053 (§ Equal contribution) 、査読有り

DOI: 10.1074/jbc.M116.744722

Omori C, Motodate R, Shiraki Y, Chiba K, Sobu Y, Kimura A, Nakaya T, Kondo

H, Kurumiya S, Tanaka T, Yamamoto K, Nakajima M, Suzuki T, **Hata S.** (2016) Facilitation of brain mitochondrial activity by 5-aminolevulinic acid in a mouse model of Alzheimer's disease **Nutr. Neurosci.** Epub ahead of print 査読有り
DOI:10.1080/1028415X.2016.1199114
Kimura A., **Hata S.**, Suzuki T. (2015) Stabilization of intracellular trafficking and metabolism of amyloid β -protein precursor and Alcadin β by Apolipoprotein E **FEBS Lett.** 589, 2394-2400 査読有り
DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.017
Takei, N., Sobu, Y., Kimura, A., Urano, S., Piao, Y., Araki, Y., Taru, H., Yamamoto, T., **Hata, S.**, Nakaya, T., Suzuki, T. (2015) Cytoplasmic fragment of Alcadin generated by regulated intramembrane proteolysis enhances APP transport into the late-secretory pathway and facilitates APP cleavage. **J. Biol. Chem.** 290, 987-995 査読有り
DOI: 10.1074/jbc.M114.599852

[学会発表](計 21 件)

Sobu, Y., **Hata, S.**, Suzuki, T. Multiple phosphorylations of Alcadin regulates interaction with kinesin-1. The American Society for Cell Biology, Annual Meeting, December 3-7 2016, San Francisco (USA)
Shiraki, Y., Chiba, K., **Hata, S.**, Suzuki, T., Different cargo receptors, APP and Alcadin, transport the same cargos cooperatively through the identical vesicular transport pathway, The American Society for Cell Biology, Annual Meeting, December 3-7 2016, San Francisco (USA)
Suzuki, T., Kimura, A., **Hata, S.** Mechanism that BACE1 alternates the cleaving sites of human APP, Society for Neuroscience annual meeting, Neuroscience 2016, November 12-16 2016, San Diego (USA)
Hu, A., Piao, Y., **Hata, S.**, Suzuki, T. Altered cellular cholesterol levels cause aberrant β -secretase cleavages

of APP and Alcadin, Alzheimer's Association International Conference 2016, July 24-28 2016, Toronto (Canada)
Suzuki, T., Kimura, A., **Hata, S.** Alternative cleavage mechanism of human BACE1, Alzheimer's Association International Conference 2016, July 24-28 2016, Toronto (Canada)
Omori, C., **Hata, S.**, Waragai, M., Yamamoto, K., Suzuki, T. Increase of p3-Alc 38 to p3-Alc 35, products by β -secretase cleavage, in CSF of AD patients, Alzheimer's Association International Conference 2016, July 24-28 2016, Toronto (Canada)
Hata, S., Piao, Y., Hu, A., Nishimura, M., Suzuki, T. Alteration of membrane microlocalization and β -secretase cleavages in sporadic Alzheimer's disease. The 4th International Conference on Molecular Neurodegeneration, May 9-11, 2016, Seoul (Korea)
羽田沙緒里, 朴 懿、西村正樹、鈴木利治, Membrane lipid composition and β -secretase cleavage of Alzheimer's disease-related proteins, 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
Shiraki, Y., Chiba, K., **Hata, S.**, Suzuki, T. Functional and regulation of APP and Alcadin cargos transported by kinesin-1 in neuron, Society for Neuroscience annual meeting, Neuroscience 2015, October 17-21, Chicago (USA)
Sobu, Y., **Hata, S.**, Suzuki, T. Association of Alcadin with kinesin light chain is regulated by phosphorylations at cytoplasmic acidic region, Society for Neuroscience annual meeting, Neuroscience 2015, October 17-21, Chicago (USA)
川原聡史、後藤直也、**羽田沙緒里**、山本融、鈴木利治, Alcadin と X11L による APP 代謝制御, 第 34 回日本認知症学会学術集会, 2015 年 10 月 2-4 日 リンクステーションホール青森(青森県・青森市)
胡安琪、朴懿、**羽田沙緒里**、西村正樹、鈴木利治、膜コレステロール含量に依存した セクレターゼによる基質切断変化、第 34 回日本認知症学会学術集会、2015 年 10 月 2-4 日、リンクステーションホール青森(青森県・青森市)
羽田沙緒里、大森智織、藁谷正明、鈴木利治、p3-Alc の検出による セクレターゼ切断解析、第 34 回日本認知症学会学

術集会、2015年10月2日-4日、リンク
ステーションホール青森（青森県・青森
市）

大森智織、**羽田沙緒里**、藁谷正明、前田
雅弘、立花太郎、Laurent Meijer、山本
一夫、鈴木利治、p3-Alc 分子種のア
ルツハイマー病バイオマーカー有用性
の検証、第5回日本認知症予防学会 学
術集会、2015年9月25日-27日 神
戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

羽田沙緒里、朴 懿、西村正樹、鈴木利
治、孤発性アルツハイマー病における膜
マイクロドメインの セクレターゼ活
性変化、第5回日本認知症予防学会 学
術集会、2015年9月25日-27日 神
戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

Shiraki, Y., Chiba, K., **Hata, S.**, Suzuki,
T. Kinesin-1 cargo receptor APP and
Alcadein transport different type of
vesicular cargo to the axonal terminal,
25th Meeting of the International
Society for Neurochemistry, August
23-27 2015, Cairns (Australia)

Sobu, Y., **Hata, S.**, Suzuki, T. Regulation
of Alcadein association with
kinesin-1 by phosphorylation of the
cytoplasmic region, 25th Meeting of
the International Society for
Neurochemistry, August 23-27 2015,
Cairns (Australia)

Suzuki, T., Chiba, K., **Hata, S.**
Regulation of axonal transport of APP
cargos by kinesin-1, 25th Meeting of
the International Society for
Neurochemistry, August 23-27 2015,
Cairns (Australia)

胡安琪、朴懿、**羽田沙緒里**、鈴木利治、
膜脂質組成の変化による APP と
Alcadein の膜内切断機構の解析、第52
回日本生化学会北海道支部例会、2015
年7月17日 北海道大学 フロンティア
応用科学研究棟（北海道・札幌市）

羽田沙緒里、鈴木利治、セクレターゼ
の基質切断解析による孤発性アルツハ
イマー病発症機構の解明、第52回日本
生化学会北海道支部例会、2015年7月
17日 北海道大学 フロンティア応用科
学研究棟（北海道・札幌市）

- 21 鈴木利治、西村正樹、木村彩乃、朴懿、
羽田沙緒里、新規アルツハイマー病創薬
を目指して 基礎研究成果からの展
開、シンポジウム「2025年を見据え
た認知症の治療戦略：新薬開発と医療連
携に向けて」医療薬学フォーラム2015/
第23回クリニカルファーマーシ
ンポジウム、2015年7月4日-5日 名古
屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

〔図書〕(計1件)

Suzuki T., Kimura A., Chiba K., Nakaya T.,

Hata S. (2015) Brain aging as a cause of
Alzheimer's disease. "Aging Mechanism -
Longevity, Metabolism, and Brain Aging"
(Edits by Nozomu Mori and Inhee
Mook-Jung) Chapter 18 pp303-318 (ISBN
978-4-431-55762-3) Springer
DOI 10.1007/978-4-431-55763-0_18

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：アミロイド 蛋白質により誘発される
認知障害の治療剤

発明者：井上 剛、鈴木 利治、**伴(羽田) 沙
緒里**

権利者：国立大学法人 岡山大学、国立大学
法人北海道大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/079120

出願年月日：2015年10月15日

国内外の別：国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.hokudai.ac.jp/shinkei/in
dex.html](http://www.pharm.hokudai.ac.jp/shinkei/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

羽田 沙緒里 (HATA, Saori)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：40581012