

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18590940  
 研究課題名（和文） A $\beta$ 新規関連タンパク $\beta$ -A $\alpha$  のアルツハイマー病診断マーカーとしての臨床応用  
 研究課題名（英文） Clinical utilization of  $\beta$ -A $\alpha$ , newly identified A $\beta$  associated protein, as a novel diagnostic marker of Alzheimer's disease.  
 研究代表者  
 浦上 克哉（URAKAMI KATSUYA）  
 鳥取大学・医学部・教授  
 研究者番号：30213507

## 研究成果の概要：

アルカデイン $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ それぞれについて、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -セクレターゼによる切断部位を決定し、切り出される $\beta$ -A $\alpha$  と p3-A $\alpha$  のアミノ酸配列を決定した。そのうち髄液中の p3-A $\alpha$  について p3-A $\alpha$ 35 と p3-A $\alpha$ 38 を測定すると、AD 群ではコントロール群や AD 以外の認知症群と比較して、p3-A $\alpha$ 38/35 比が増加していた。また p3-A $\alpha$ 38/35 比と A $\beta$ 42/40 比は、AD 群とコントロール群は有意に異なっていた ( $p < 0.05$ )。これらのことにより、AD では p3-A $\alpha$  の  $\gamma$ -セクレターゼによる切断サイトが変化しており、早期発見のためのバイオマーカーとして有効であることが示唆された。また、p3-A $\alpha$ 35 の抗体を作成してサンドイッチ ELISA 法を簡易測定法として確立した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	600,000	3,900,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病・アミロイド $\beta$ タンパク (A $\beta$ )・APP・アルカデイン・ $\beta$ -A $\alpha$ ・診断マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、脳内に異常なタンパクが蓄積する病態を呈し、それらに影響を受けた神経細胞が細胞死が引き起こされることによって認知機能が障害される疾患である。蓄積する異常タンパクのうちの1つはアミロイド $\beta$ タンパク (A $\beta$ ) であり、APPタンパクから代謝、産生される。A $\beta$ は、APP遺伝子の異常や $\gamma$ -セクレターゼ遺伝子の異常

によって、あるいは孤発性ADではその機序はまだ明らかではないが産生が促進されることにより、脳内に異常に凝集して蓄積し老人斑を形成する。A $\beta$ は現在、ADの髄液中の診断マーカーとして用いられているが、髄液中のA $\beta$ は微量であり検出感度が不安定で、血中のA $\beta$ は髄液中よりさらに微量であり、検出は困難である。

## 2. 研究の目的

AD における病態を判断する指標として、老人斑の構成成分である Aβの髄液中・血液中の量的変化を検出することは重要である。アルカデインは、神経細胞に存在して X11Lタンパクを介して APP と三量体を形成し、APP 同様にβ-,γ-セクレターゼによって代謝される。代謝産物β-Alc は脳内から髄液中に排出され、体内から排泄されるために血中へ移行する。このβ-Alc を解析・測定し、診断マーカーとして確立し、臨床応用を検討することを目的とする。このことにより、ADの脳内での Aβの産生量・凝集量を推測することができ、Aβの病態を反映した新たな診断マーカー、特に有用な血中診断マーカーとなり得る可能性がある。

## 3. 研究の方法

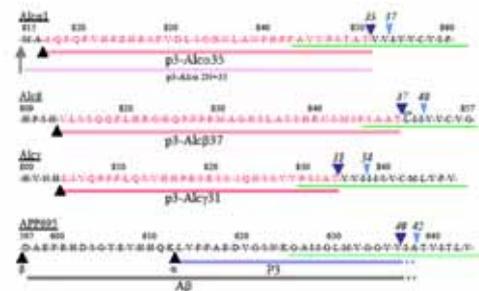
アルカデインには 3 つのアイソフォーム α, β, γ があるが、それぞれにおいて

- (1) β-セクレターゼとγ-セクレターゼによる切断部位と、さらにα-セクレターゼによる決定し、切り出されるβ-Alc と p3-Alc のアミノ酸配列を質量分析とアミノ酸解析によって決定する。
- (2) 3 タイプの p3-Alc について、決定したアミノ酸配列から抗体を作成する。
- (3) 作成した p3-Alc 抗体を用いてサンドイッチELISA法を開発する。
- (4) ADとコントロールの髄液中と血液中の p3-Alc をサンドイッチELISA法で測定し、ADのマーカーとなりうるかどうかを検討する。
- (5) 髄液中のAβを同時に測定してAβの産生量とp3-Alcの量を比較検討し、その関連性を検討する。また他の診断マーカーとの関連性、臨床症状との関連を解析して、マーカーとしての有効性を検討する。

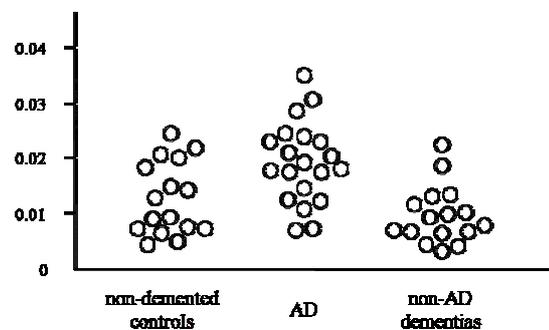
## 4. 研究成果

3 種類のアルカデインからβ-セクレターゼとγ-セクレターゼによってそれぞれ Alcα、Alcβ、Alcγが産生され、さらにα-セクレターゼによる切断によって p3-Alcα、p3-Alcβ、p3-Alcγが産生される。その全ての切断サイトとアミノ酸配列を決定した。また、これらはヒト CSF 中でも同じ切断産物が検出できることを確認した。p3-Alcαの主要分子種は 35 アミノ酸からなる p3-Alcα35 であり、γ-セクレターゼ切断サイトである C 末側の違いによるマイナーな分子種 p3-Alcα38 等が存在する。p3-Alcβの主要分子種は p3-Alcβ37 であり、マイナーな分子種 p3-Alcβ40 が存在する。p3-Alcγは p3-Alcγ31 が主要分子種であり、マイナー分子種として p3-Alcγ 34 が存在することが分かった。このことは、γ-セクレターゼによる切断サイトが異なることを示してい

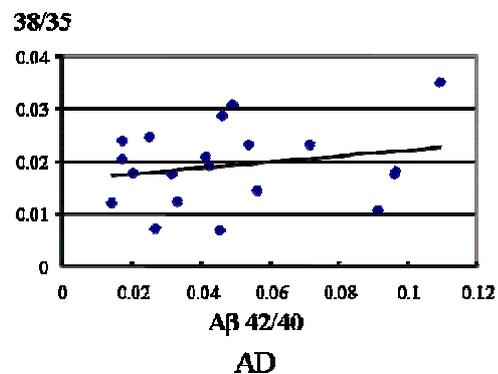
る。

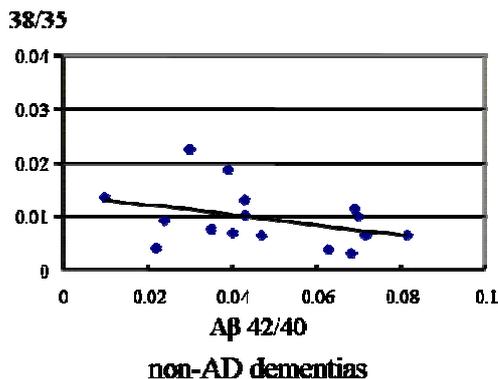
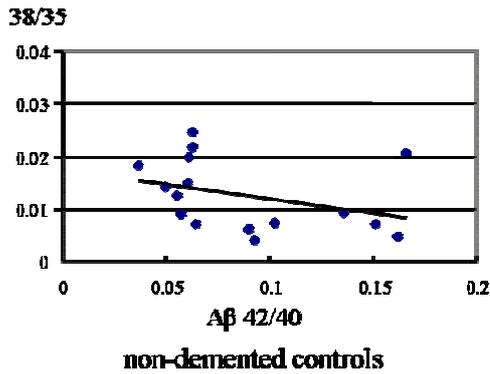


さらに、髄液中の p3-Alcαを MALDI-TOF/MS 解析によって解析し、p3-Alcα 35 と p3-Alcα 38 を測定した。AD 群では、コントロール群や AD 以外の認知症群と比較して、p3-Alcα 38/35 比が増加していた。



また同じ髄液で Aβを測定し、p3-Alcα 38/35 比と Aβ 42/40 比との関連を解析した。その結果、AD 群とコントロール群は回帰直線の傾きが有意に異なっていた ( $p < 0.05$ )。AD 群と AD 以外の認知症群では回帰曲線の傾きはこのような傾向が見られたが、有意差は認められなかった。





これらのことにより、p3-AlcαC 末端の g-セクレターゼによる切断サイトが、AD ではコントロール群に対して変化しており、AD の早期発見のためのバイオマーカーとして有効であることが示唆された。さらに、AD の発症機構としてγ-セクレターゼの機能変化が考えられることも証明している。

また、p3-Alcα 35 の抗体を作成し、サンドイッチ ELISA による測定方法が確立できている。

#### 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10件)

Taniguchi M, ...Urakami K (他 10 名、1 番目と 12 番目) Sugar chains of cerebrospinal fluid transferrin as a new biological marker of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 26(2):117-122, 2008 査読有

Hashimoto Y, Taniguchi M, Kitaura M, Nakamura Y, Jimbo D, Urakami K Alteration of Concanavalin A binding glycoproteins in cerebrospinal fluid and serum of Alzheimer's disease patients. *Yonago Acta medica* 51: 1-9, 2008 査読有  
Wakutani Y, ...Urakami K, Takeshima T, Nakajima K (他 10 名、12 番目)

Longitudinal changes in the prevalence of dementia in a Japanese rural area. *Psychogeriat* 7(4): 150-154, 2007 査読有

The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. Araki Y ... Suzuki T (他 11 名、13 番目) *EMBO J* 26: 1475-1486, 2007 査読有

浦上克哉, 谷口美也子 アルツハイマー病の臨床診断 バイオマーカー *Medicina* 44(6): 1078-1081, 2007 査読無

浦上克哉, 谷口美也子 認知症の早期発見とバイオマーカー *日本老年医学会雑誌* 44(3): 312-314, 2007 査読無

Suzuki T (他 3 名、1 番目) Trafficking of Alzheimer's disease-related membrane proteins and its participation in disease pathogenesis. *J Biochem* 139: 949-955, 2006 査読有

Urakami K Mild cognitive impairment: Biological diagnostic markers for early stages of Alzheimer's disease *Psychogeriat* 6: 26-29, 2006 査読有

浦上克哉, 谷口美也子 アルツハイマー病早期診断に役立つ生物学的診断マーカー *Medical Practice* 23(7): 1167-1169, 2006 査読無

谷口美也子, 浦上克哉 診断マーカー 老年期認知症ナビゲーター 252-253, 2006 査読無

[学会発表](計11件)

岡山由佳 アルツハイマー病の新規診断マーカー候補としての血清中 WGA 結合トランスフェリンの解析 第 27 回日本認知症学会 2008 年 10 月 10 日, 前橋

Urakami K WAG binding glycoprotein as a new diagnostic biomarker for early stage of Alzheimer's disease. *IPA European Meeting* 2008 年 4 月 11 日, Ireland

Nakamura Y Serum glycoprotein as a new diagnostic marker for Alzheimer's disease. 第 26 回日本認知症学会 2007 年 10 月 17 日, 大阪

Hashimoto Y Alteration of concanavalin A binding glycoproteins in cerebrospinal fluid and serum of Alzheimer's disease patients. 第 26 回日本認知症学会 2007 年 10 月 17 日, 大阪

谷口美也子 アルツハイマー病新規診断マーカーとしての糖タンパク質 第 49 回日本老年医学会 2007 年 6 月 21 日, 札幌

谷口美也子 アルツハイマー病新規診断マーカーとしての糖タンパク質 第 48 回日本神経学会 2007 年 5 月 17 日, 名古屋

Taniguchi M Analysis of cerebrospinal fluid glycoprotein as new biomarker of Alzheimer's disease. 第25回日本認知症学会 2006年10月6日, 広島 T

Taniguchi M Analysis of cerebrospinal fluid glycoprotein as new biomarker of Alzheimer's disease. International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP) 6<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting 2006, 2006年10月4日, 広島

Hata S  $\beta$ -Acl, Metabolic products of Alcadein, as a novel diagnostic marker in CSF of Alzheimer's disease. The 10<sup>th</sup> ICAD 2006年7月9日, Spain

谷口美也子 アルツハイマー病新規診断マーカーとしてのWGA結合糖タンパクの検討 第48回日本老年医学会 2006年6月7日, 金沢

谷口美也子 アルツハイマー病診断マーカーとしての糖タンパクの解析 第47回日本神経学会 2006年5月11日, 東京

[図書](計1件)

浦上克哉 南江堂 これてわかる認知症診療(かかりつけ医と研修医のために)全99ページ

[産業財産権]

出願状況(計3件)

発明の名称: アルツハイマーの診断キット、診断マーカー及び病態指標の検出方法

発明者: 浦上克哉、谷口美也子

権利者: 同上

特許 出願番号: 特願 2006-242044

出願年月日: 2006年9月6日 国内

発明の名称: アルツハイマーの診断キット、診断マーカー及び病態指標の検出方法

発明者: 浦上克哉、谷口美也子

権利者: 同上

特許 出願番号: 特願 PCT/JP2007/067428

出願年月日: 2007年9月6日 国外

発明の名称: 痴呆症診断装置及び痴呆症診断プログラム

発明者: 浦上克哉、井上仁

権利者: 同上

特許 出願番号: 特願 2007-261329

出願年月日: 2007年10月4日 国内

[その他]

浦上克哉 「正しく理解! 認知症 最新情報」食育・健康フェア in 宇城

2006年12月26日 NHK 総合テレビ「生活ほっとモーニング」放送

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦上克哉 (URAKAMI KATSUYA)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 30213507

(2) 研究分担者

谷口美也子 (TANIGUCHI MIYAKO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号: 50335527

(3) 連携研究者

鈴木利治 (SUZUKI TOSHIHARU)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号: 80179233