

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07383

研究課題名(和文)アルツハイマー病患者の血中タンパク質の変動解析

研究課題名(英文)Proteomic variation analysis of plasma in Alzheimer's Disease

研究代表者

渡邊 淳(WATANABE, ATSUSHI)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・共同利用推進室・室長

研究者番号：90321843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿を用い、網羅的プロテオーム変動解析を試みた。得られたデータはソフトウェアによって定量化を行った。その結果、変動が見られたタンパク質の幾つかについてウェスタンブロットによって確認を行ったが、顕著な違いは見られなかった。単なるタンパク質の量的な違いだけでなく、特定の部位での翻訳後修飾等の質的变化が起こっていないかについても解析する必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の早期診断法としては、アミロイドイメージングによる画像診断や脳脊髄液中のアミロイドペプチド42、totalタウ、リン酸化タウの量をELISAで測定する方法が開発されているが、未だ十分とは言えない。もしアルツハイマー病の発症前の徴候を血液中のタンパク質の変動で捉えることが出来れば、画像診断と比較して、安価で迅速に診断する方法が確立できるばかりでなく、早期診断も可能となる。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive proteome variation analysis was attempted using plasma from patients with Alzheimer's disease and those with normal cognitive function. The obtained data were quantified by software. As a result, some of the proteins that showed fluctuations were confirmed by Western blotting, but no significant difference was observed. It was considered necessary to analyze not only the quantitative difference in protein but also whether or not qualitative changes such as post-translational modification occurred at a specific site.

研究分野：神経化学

キーワード：アルツハイマー病 バイオマーカー プロテオーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の最大の危険因子は加齢である。もし、アルツハイマー病を 80 歳に発症するならば、その 20-30 年前には  $A\beta$  が主な構成成分である老人斑が、また、10-15 年前には微小管結合タンパク質タウが主な構成成分である神経原線維変化が脳内に形成されることが明らかになっている。すなわち 20-30 年前から脳内の変化は始まっている。しかしながら、発症前で初期の病理学的変化が現れる頃、50-60 歳では脳内で変化はあるものの症状はない。すなわちこの段階では健常者であり、アミロイドメーキングや髄液検査等する人はほとんどいない。有効な治療薬がない現状では、できるだけ早くアルツハイマー病の兆候を見つけ、適度な運動や十分な睡眠とり、生活習慣病（高血圧、肥満など）の予防に気をつけることが、発症のリスクを減らすことにつながる。もし将来的な発症リスクを健康診断等の血液検査で判定できれば、患者数の増加を抑えることが期待できる。本研究ではアルツハイマー病及び認知機能正常者の血漿の質量分析装置を用いたプロテオーム解析を行い、アルツハイマー病で変動するタンパク質の同定を行い、バイオマーカーとしての有効性を検証する。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病を正確かつ早期に診断し、治療を開始することが患者の増加ならびに病気の進行を抑える上で、極めて重要である。しかしながら、現在十分な早期診断法は確立されていない。もし血液バイオマーカーでアルツハイマー病発症前の徴候を捉えることが出来れば、予防的介入を行うことで、高齢者の認知能やADL (Activities of Daily Living)低下を抑制できることが期待できる。そこで、本研究は、アルツハイマー病患者の血液中のタンパク質を網羅的に解析し、主要なタンパク質の変動を解析し、バイオマーカーの探索を試みる。

## 3. 研究の方法

アルツハイマー病患者 20 例、認知機能正常者 20 例の血漿を当センターのバイオバンクから提供して頂き解析を行った。検体は男女比、年齢層を出来るだけ合わせた症例を用いた。また、AD の危険因子 ApoE4 も偏りが無い検体で解析を行った。血漿 40 $\mu$ l をリン酸バッファーで 5 倍に希釈し、0.22 $\mu$ m のスピンフィルターを用いて、16,000 x g で 2 分間遠心し、夾雑物を除去した。得られたサンプルはアルブミン、IgG、IgA、 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 2-マクログロブリン、 $\alpha$ 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といった血液中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固定化されたアフィニティーカラムを用いて、液体クロマトグラフィーで分離を行った。素通り画分と吸着した画分に分けた後、各々の画分は遠心フィルターによって 3 kDa 以上の分子量のタンパク質を集め、それぞれ直接トリプシンで消化を行った。各消化物は C18 column (Magic C18AQ, 0.1 x 300 mm; Michrom Bioresources, Inc.)を用いて、500nl/min といった低流量で 5-45% ACN,100min, 45-95% ACN, 20min といったグラジエントで分離し、Orbitrap Velos Pro mass spectrometer (Thermo

Fisher Scientific)によるショットガン分析に供した。得られたデータは Proteome discoverer software (Thermo Fisher Scientific)で検索を行い、変動があったタンパク質についてはウェスタンブロットにより確認を行った。

#### 4 . 研究成果

アルツハイマー病患者及び認知機能正常者の血漿を用いた網羅的プロテオーム解析を試み、同定されたリストの中で変動したタンパク質の中で、アルツハイマー病患者で認知機能正常者よりスコアが高かったApolipoprotein BやKelatinと、逆に低かったHaptoglobinやClusterinについては、これらの抗体を用いたウェスタンブロットでの定量化を試みた。各血漿のウェスタンブロットでは、ApolipoproteinBやHaptoglobin ではアルツハイマー病患者で認知機能正常者の違いより、個々の検体での違いが大きく、ClusterinやKelatinについてはそれほど顕著な違いが見られなかった。質量分析によって得られた結果が、ウェスタンブロットによって確認できなかったことについて、質量分析では翻訳後修飾や変異によりペプチドの同定率が低下した結果、スコアが変動した可能性が考えられる。また、ウェスタンブロットにおいても抗体のエピトープ部分が何らかの翻訳後修飾や変異によって反応性に違いが出ることも考えられた。

ApolipoproteinBやHaptoglobinで全くバンドが見えなかった検体ではその可能性が強いと考えられる。血漿タンパク質は特に糖鎖等の修飾がなされているので、今後これらの修飾も考慮に入れ解析を行っていく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊 淳
2. 発表標題 アルツハイマー病患者の血漿タンパク質の変動解析
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 淳
2. 発表標題 血漿中の変性Apolipoprotein Eの解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------