

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07975

研究課題名(和文)アルツハイマー病関連新規アミロイド形成性分子MFG-E8のバイオマーカー解析

研究課題名(英文) Investigation of a novel amyloidotic biomarker for alzheimer disease

研究代表者

相馬 仁 (Sohma, Hitoshi)

札幌医科大学・医療人育成センター・名誉教授

研究者番号：70226702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経培養細胞を用いて見出したアルツハイマー病(AD)バイオマーカー候補タンパク質Milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFG-E8)の有用性を検討した。ADモデルマウス(APPPS1)でMFG-E8は老人斑の中心に局在し、その周りをA β がとり囲む特徴的な免疫染色像を得た。また、MFG-E8分子はアミロイド性の性質を持つことを見出した。更にMFG-E8に対する定量ELISA系を確立し、183名のAD患者、51名のレビー小体型認知症(DLB)、及び420名の健常高齢者血漿MFG-E8を測定し結果、ADリスク因子ApoE4を持つAD病患者で有意に上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で我々が明らかにした新規アルツハイマー病(AD)バイオマーカーMFG-E8は、アミロイド性の性質を持つことが本研究で初めて明らかされた。ADではA β がアミロイドを形成することが明らかになっているが、MFG-E8も同様の性質を持つことが示された。従って、ADがアミロイドを形成するという特性をもつことから、他にもADに関わるアミロイドタンパク質の存在が考えられる。今後ADでアミロイドを形成する環境が特定されると予防対策の発展につながる。また、MFG-E8が血漿バイオマーカーとなりうるということが、本研究で示唆され、より多くの種類のマーカーが精度の良い診断に寄与できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have studied Alzheimer's disease (AD) biomarkers. In this study, we focused on a novel candidate, Milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFG-E8), which we recently identified.

An immunohistochemical study using AD mouse model (APP/PS1) brains with anti-MFG-E8 antibodies revealed that antibody staining was detected in the plaques' core region of the anti-A β -antibody. In contrast, anti-A β -antibody staining was detected outside of it. It was further demonstrated that MFG-E8 changed to amyloidotic structure over time from the Congo Red spectral peak shift and electron microscopic study in vitro. It was also shown that the plasma level of MFG-E8 in AD patients with ApoE4 carriers was significantly elevated compared with healthy control. From these results, MFG-E8 is shown to be a novel biomarker for AD.

研究分野：病態医化学

キーワード：MFG-E8 アルツハイマー病 アミロイド Congo Red Ca²⁺ストレス

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病に代表される認知症の特徴として、神経細胞の著しい脱落とアミロイド(老人斑)形成や神経原線維変化がある。アミロイドには神経細胞膜タンパク質(APP)の代謝産物でアミロイドペプチドA β がその一部となって集積する。A β は細胞内外で神経細胞毒性を示し、遺伝負因を持つ家系に認められる家族性アルツハイマー病では、このA β 過剰産生が、アルツハイマー病の発症と深く結び付くと考えられる(A β 仮説)。一方、神経細胞死をもたらす神経原線維変化は、Tauタンパク質の沈着とTauの高リン酸化が関わるのが特徴的である(Tau仮説)。

A β アミロイド沈着は正常加齢にも認められ、一方、神経原線維変化(Tau病変)と認知機能障害が相関することが指摘され、アミロイドの関わりが疑問視される報告もあった。しかし、A β 病理が出現することで、Tau病理の拡散に伴う神経細胞障害が広範に広がることが示され、アミロイドはアルツハイマー病との強い関係があることは明らかである。

これまで、A β 沈着が先行し、Tauの沈着が遅れて現れると解釈されていた。しかし、内側側頭葉など脳の部位によっては、Tau沈着が先行することが報告され、Tau病変とA β ペプチドの沈着を特徴とするアミロイド(老人斑)の出現は独立に起こることが示されている。また、様々なアミロイド研究から、アミロイドは単なるタンパク質の凝集ではなく、非常に安定な高次構造(クロス β 構造)を形成する。アミロイドを形成するタンパク質としてA β のみならず、 β 2ミオグロビン、免疫グロブリンL鎖、トランスサイレチンなど、20種以上の報告がある。これらのタンパク質には、1次構造上全く相同性がないにもかかわらず、アミロイドを形成すると極めて類似の高次構造を形成することは、興味深い。

従って、アミロイドを形成する環境を有するアルツハイマー病で、A β 以外にもアミロイドを形成するタンパク質の存在の可能性が大きく、それがアルツハイマー病の発症機構の理解、そして、新規バイオマーカーの発見につながる期待がある。

我々はこれまで、アルツハイマー病バイオマーカーを検索する目的で、マウス初代神経培養細胞を用いて、A β ₄₂刺激で分泌されるタンパク質を nanoLC-MS/MS を用いたプロテオーム解析を行い、血液脳関門を通過しうる分子に注目して候補マーカーの検索を行ってきた。この目的のために、アポトーシスによって細胞膜表面に現れるリン脂質ホスファチジルセリン(PS)をコートした磁性ナノ粒子(磁性ナノリポソーム)を用いて、(特開2008-234579(成立))、PSにCa²⁺依存的に結合する細胞外因子に注目した。A β ₄₂刺激で分泌上昇するタンパク質としてアネキシンA5とMilk Fat Globular Protein EGF-8(MFG-E8)を有力な候補マーカーとして注目している。両タンパク質ともCa²⁺・リン脂質結合能を持ち、アポトーシス関連因子でもある。

Ca²⁺結合タンパク質であるアネキシンA5はアルツハイマー病モデルマウスで早期から脳内で上昇することを認め、Ca²⁺キレートの仕事をするのが考えられ、更に、血漿中にも検出され、血漿マーカーとなることを報告した。アネキシンA5は、アルツハイマー病患者血漿でも有意に増大していた。

新規マーカーとして期待されるMFG-E8は特徴的な局在を示し、抗A β ₄₂抗体で染色される老人斑の中央部分に局在していた。この特徴的像は、早期からモデルマウス脳で認められ、観察された老人斑すべてで同様の像が観察された。更に、特に早期の段階で、老人斑は細胞内の核近傍に多く認められ、MFG-E8が細胞内に存在することが示された。MFG-E8は、分泌タンパク質で、貪食細胞と結合部位を持ち、アポトーシス細胞を貪食細胞が除去する働きを促進する機能を持つことが報告されているが、細胞内に存在するMFG-E8の機能、老人斑に存在するMFG-E8

に関する病態生理学的は不明である。

2. 研究の目的

老人斑に局在が認められた MFG-E8 について、老人斑の出現のどの段階から認められ、特徴的な局在が形成されるか、免疫組織学的な検討を行った。また、既にアルツハイマー病患者血漿の MFG-E8 濃度が健常高齢者と比して、有意に高くなる結果を得ている。MFG-E8 は血漿バイオマーカーとなる可能性が高く、その真正性を検討した。

3. 研究の方法

①老人斑への MFG-E8 蓄積の経時的変化の解析：[方法]週齢の異なるアルツハイマー病モデルマウス (APPPS1) の脳を用いて、老人斑に存在する MFG-E8 を、CongoRed と抗マウス MFG-E8 抗体による免疫染色でアミロイド性の獲得の経時変化を検討した。

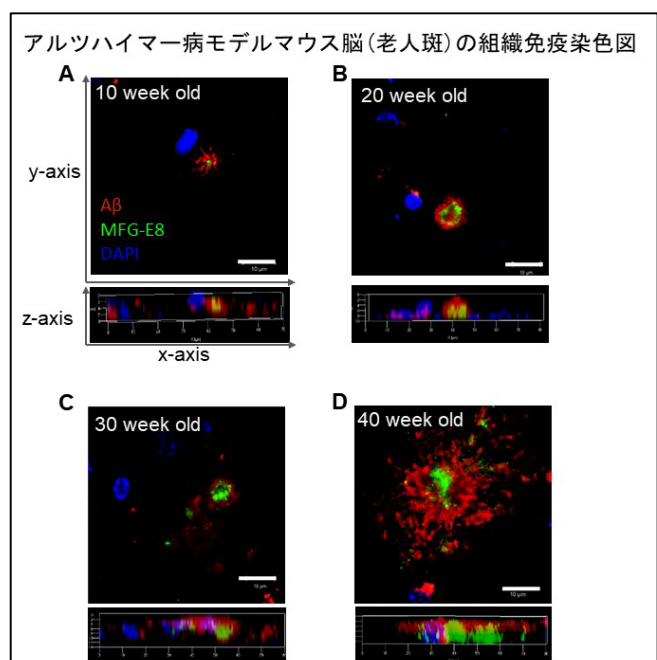
②MFG-E8 がアミロイドを形成する機構の生化学的解析：[方法]ヒトリコンビナント MFG-E8 は、哺乳類動物由来の細胞から分泌されたものと、大腸菌で発現し調製したものを用いた。MFG-E8 のアミロイド性の検討は、純度の高い CongoRed を用いて、分光法 (差スペクトル) で光吸収のピークシフトから明らかにした。

③電顕によるネガティブ染色：[方法]コロジオン膜を張ったグリッドにタンパク質を付着させ、酢酸ウラニウムで染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。

④MFG-E8 のバイオマーカーとしての真正性の検：[方法]大腸菌で発現したヒトリコンビナント MFG-E8 を用いて、マウスからモノクローン抗体を作製し、エピトープの異なるクローンを用いてサンドイッチ ELISA 系を確立した。この系を用いてヒト血漿に存在する MFG-E8 を定量した。ヒト血漿は認知症 (アルツハイマー病、レビー小体型認知症)、そしてコントロールとして老人クラブに所属する健常高齢者から協力を得た。ApoE のアイソフォームを同定するためにゲノム DNA をテンプレートとして、ApoE のアイソフォームに寄与する領域部分の DNA を pcr で増幅し、制限酵素の切断パターンからタイピングを行った。本研究には学内倫理委員会の審査を経、承認を得た。

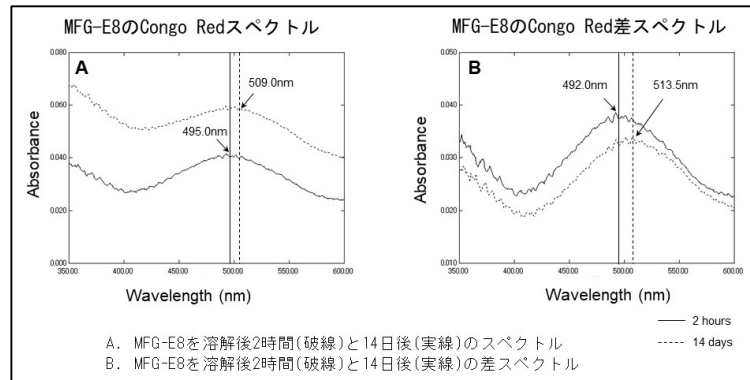
4. 研究成果

これまで、分泌タンパク質 Milk Fat Globular Protein EGF-8 (MFG-E8) がアルツハイマー病モデル動物 (tg2576 マウス) 老人斑の中心部分に局在することを見出し、その周りを A β がとり囲む特徴的な性質があることを明らかにしていた。本研究で、老人斑が早期に出現することが知られる APPPS1 モデルマウスを用いて、特異抗体を用いて経時的に免疫組織学的に調べた結果、ごく老人斑が現れる初期の段階から老人斑の中心部分で抗 MFG-E8 抗体による染色像が認められ、周りが抗 A β 抗体で染色され、時間と共に両者が増大することが明らかになった (右図)。



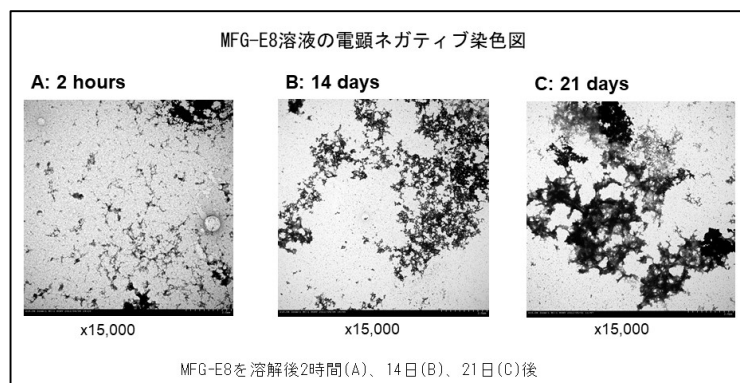
一方、大腸菌を用いてリコンビナント MFG-E8 を調製する過程で、MFG-E8 の回収率が非常に低くなることを経験し、MFG-E8 が会合して樹脂等に付着することが考えられた。この性質は、MFG-E8 がアミロイド性の性質を持つこと可能性を考えられる。アミロイド存在の証明方法として、Congo Red による組織染色性に加え、アミロイドを形成したタンパク質に Congo Red が直接結合する結果、Congo Red 吸収ピークの長波長側シフトで証明できる。吸収スペクトルピークシフトはより簡便で感度高く測定できる、また、差スペクトル法によって解析がより簡便で結果の解析がよりわかりやすくなる。予備実験として最初に、A β ペプチド (A β_{40} と A β_{42}) 溶液を用いて、アミロイド形成の経時変化が Congo Red 吸収差スペクトルピークの強度で示すことができることと、電顕ネガティブ染色像と相関することを確認した。

MFG-E8 を用いた実験で、哺乳類細胞から分泌したリコンビナント MFG-E8 は、時間の経過とともに Congo Red 光吸収の長波長側へのシフトが認められ、MFG-E8 はアミロイド性の性質が示された(右図)。



一方、大腸菌で発現した MFG-E8 は、インクルージョンボディに取り込まれるため、尿素を用いた変性のステップを加える必要がある。この過程を経て再生した MFG-E8 は、可溶化していても Congo Red によるピークシフトが最初から起こっており、変性を経る過程でアミロイドになることが示された。これらのことから、MFG-E8 は、アミロイド性のタンパク質であることが明らかになった。老人斑は長い時間の経過で形成されるため、我々が観察してきた老人斑の MFG-E8 は、A β ペプチド同様、アミロイドになっていると考えられる。組織の老人斑も中心まで Congo Red で染色されていることからこのことが言える。

更に、電子顕微鏡を用いたネガティブ染色像を観察した。溶解後、日を追って 14 日たった時間の経過とともに MFG-E8 が会合しアミロイド様の構造を取ることが確かめられた(右図)。



MFG-E8 が発見された最

初の頃の報告では、分泌タンパク質である MFG-E8 はホスファチジルセリン (PS) およびインテグリン結合部位を有するため、MFG-E8 がアポトーシス細胞の表面に現れた PS とマクロファージのインテグリンの結合を介して、アポトーシス細胞の貪食・除去に働くことが報告されている。老人斑に存在する MFG-E8 の生理的な意義については今後の検討課題である。

MFG-E8 は脂質結合性を持つことから血液脳関門を通過する可能性があり、血漿マーカーとなりうることを考えられる。そこで、アミロイド性の性質を持つことを確認した大腸菌で発現したコンビナント MFG-E8 を抗原として、マウスからモノクローン抗体を作製し、定量のための ELISA 系を確立した。183 名のアルツハイマー病患者、51 名のレビー小体型認知症 (DLB)、そして対照として 420 名の健常高齢者血漿を用いて、血漿 MFG-E8 量を測定した。

その結果、グループ間で有意な差は認められなかったが、アルツハイマー病リスク因子である ApoE4 を持つアルツハイマー病患者で有意に血漿 MFG-E8 が上昇していた。一方、DLB では有意な差は認められなかった。

血漿 MFG-E8 濃度は、エストロゲンによってその量が上昇することが他で報告されている。また、高齢者の血中エストロゲン量は、女性よりも男性で高い傾向のあることが報告されている。本研究で、高齢者の MFG-E8 濃度を比較すると、女性よりも男性で有意に高くなることが示された。しかしながら、アルツハイマー病バイオマーカーとしての MFG-E8 は、性別による影響は受けないことが明らかとなった。したがって、MFG-E8 はアルツハイマー病において、アミロイド性の性質を持つ新規バイオマーカーで、かつ血漿バイオマーカーとなりうることを示唆された。

アルツハイマー病につながる要因として Ca^{2+} や酸化ストレスなどが指摘されてきた。我々は特に、 Ca^{2+} に注目し、 $\text{A}\beta_{40}$ ペプチドのアミロイド化を検討した。その結果、 Ca^{2+} 存在下でアミロイド形成速度が減弱し、大きなアミロイド繊維形成能は EGTA で Ca^{2+} をキレートすることで逆に促進した。 Ca^{2+} もしくは EGTA 存在下でプレインキュベート後の $\text{A}\beta_{40}$ を用いた神経細胞株 SH-SY5Y を用いた細胞毒性作用活性は、インキュベート時間で活性は異なり、初期は EGTA でより大きな毒性が示され、その後 Ca^{2+} による障害活性がより大きくなる傾向を得ている。このことから、 $\text{A}\beta$ のアミロイド繊維形成と細胞毒性には Ca^{2+} のような環境因子が影響を与えることがわかり、生体内の様々な環境変化とアルツハイマー病病態活性との関りを詳細に考える必要がある。一方、MFG-E8 を用いた実験で、 $\text{A}\beta_{40}$ で認められたような活性はなく、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hitoshi Sohma, Michitoshi Kimura, Ayaka Sudo, Mihoko Ohashi, Hiromi Hamano and Yasuo Kokai	4. 巻 1
2. 論文標題 MFG-E8, A Novel Biomarker for Alzheimer's Disease and Its Amyloidotic Feature	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 IntechOpen	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.1002658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋 美帆子、濱野 宏美、小海 康夫、相馬 仁
2. 発表標題 新規アルツハイマー病バイオマーカー候補タンパク質Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) のアミロイド性
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部 第59回支部例会
4. 発表年 2022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
研究分担者	小海 康夫 (Kokai Yasuo) (20178239)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	水江 由佳 (Mizue Yuka) (20464480)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	大橋 美帆子 (Mihoko Ohashi) (80843482)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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
---------	---------