

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590392

研究課題名（和文）アルツハイマー病発症の引き金となる PAD 及びシトルリン化蛋白質の人体病理学的解析

研究課題名（英文）Pathological analysis of PAD and citrullinated proteins that triggers the onset of Alzheimer's disease

研究代表者

半田 節子（HANDA SETSUKO）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・助手

研究者番号：30360697

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病患者の脳（海馬とその周辺）では、シトルリン化蛋白質の異常な蓄積が確認された。また、プロテオーム解析によりグリア繊維酸性蛋白質（GFAP）、ビメンチンがシトルリン化されていることを同定した。さらに、アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査診断薬となるシトルリン化 GFAP を高感度に検出する ELISA システム（酵素免疫測定法）を構築した。

研究成果の概要（英文）：

The abnormal accumulation of citrullinated proteins were detected in the brain from Alzheimer's disease (AD) patients. By using two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, two of the citrullinated proteins were identified as a vimentin and a glial fibrillary acidic protein (GFAP). In addition, we constructed a ELISA system which detect the citrullinated GFAP to develop diagnostic laboratory tests for early diagnosis of AD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：脳・神経、アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病（AD）の根本的な原因は未だ解明されていない。AD の特徴的な病理所見としてアミロイドベータ蛋白質（A $\beta$ ）が蓄積した老人斑やリン酸化タウ蛋白質が

蓄積した神経原線維変化は有名である。これら蛋白質は、本来、正常な機能を果たしていたものがやがて様々な修飾を受け異常化し、神経細胞の内側や外側に蓄積したためと考えられる。異常蛋白質の蓄積は、AD をはじめ

多くの神経変性疾患（神経難病）で観察される。

(2) 我々は、以前に AD 患者の脳で蛋白質中のアルギニンという塩基性アミノ酸がシトルリンという中性アミノ酸に変換された異常な蛋白質（シトルリン化蛋白質と総称）が多く出現することを見出した。また、アルギニンをシトルリンに変換する酵素も同定した。この酵素は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ（PAD）と呼ばれ、脳内の至る所に存在する。しかし、PAD の反応産物であるシトルリン化蛋白質は正常な脳にほとんど存在しない。

## 2. 研究の目的

(1) シトルリン化蛋白質の生成、蓄積は AD の発症やその進行に深く関与している可能性がある。AD の発症に PAD の異常活性化やシトルリン化蛋白質の生成、蓄積が引き金となるかを明らかにする。

(2) AD の早期臨床検査診断薬を開発し、臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) AD 患者脳におけるシトルリン化蛋白質の人体分子病理学的解析

AD 患者の脳（特に海馬とその周辺）では、シトルリン化蛋白質の異常な蓄積が観察された。結果の信頼性を高め、さらに症例数を増やすため、AD 脳、正常脳について、同様の免疫組織学的検討を行う。シトルリン化蛋白質は、抗シトルリン抗体、化学的検出方法を用いることにより検出する。

### (2) シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析

AD 患者脳で蓄積しているシトルリン化蛋白質を二次元電気泳動、質量分析計（MALDI-TOFMS）を用いたプロテオーム解析により同定する。また、シトルリン化 GFAP のどのアルギニン残基がシトルリン化しているかをプロテオーム解析により決定する。

### (3) AD の早期臨床検査診断薬の開発

AD 早期診断を行う臨床検査診断薬を開発するため、シトルリン化 GFAP を高感度に検出する ELISA システム（酵素免疫測定法）を構築する。ELISA システムが構築でき次第、ヒトの血清や脳脊髄液を用いた臨床試験を実施する。

## 4. 研究成果

### (1) AD 患者脳におけるシトルリン化蛋白質の人体分子病理学的解析

AD 患者の脳におけるシトルリン化蛋白質

の生成、蓄積を免疫組織染色により調べた。その結果、AD 患者の脳（海馬とその周辺）では、シトルリン化蛋白質の異常な蓄積が確認された。一方、正常脳では、シトルリン化蛋白質は、ほとんど検出されなかった。また、シトルリン化蛋白質を産生する酵素 PAD2 も AD 患者の脳で増加していることが確認された。染色像を強拡大した結果、シトルリン化蛋白質、PAD2 陽性細胞は、グリア細胞のひとつであるアストロサイト様の形態を示した。検証するため、アストロサイトのマーカー蛋白質であるグリア線維性酸性蛋白質（GFAP）との蛍光二重染色を行った。その結果、GFAP 陽性細胞とシトルリン化蛋白質、PAD2 陽性細胞が良く一致した。これらの結果は、アルツハイマー病患者の脳ではアストロサイトに PAD2 が多く発現し、同細胞にシトルリン化蛋白質が多く蓄積していると考えられる。同時に、アミロイドベータ蛋白質（A $\beta$ ）やリン酸化タウに対する抗体を用いた連続切片による免疫組織染色を行った。その結果、A $\beta$  陽性の老人斑やリン酸化タウ陽性の神経原線維変化とシトルリン化蛋白質陽性の染色部位がよく一致した。A $\beta$  やリン酸化タウがシトルリン化されているかは未だ明らかではない。アルツハイマー病では、海馬以外にも PAD2 の発現が亢進しているかを調べるため、他の部位（小脳、頭頂葉、扁桃核、橋）についても PAD2 の免疫染色を行った。その結果、調べた全ての部位で正常脳に比べてアルツハイマー病では PAD2 の発現亢進が確認された。

### (2) シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析

AD 脳におけるシトルリン化蛋白質分子の同定のために二次元電気泳動法、質量分析計を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、グリア繊維酸性蛋白質（GFAP）、ビメンチンがシトルリン化されていることを同定した。次にヒト GFAP 及びシトルリン化蛋白質を産生する酵素 PAD2 の組換え蛋白質を作製し、in vitro で GFAP を PAD2 によりシトルリン化した。GFAP のシトルリン化部位は質量分析計を用いたプロテオーム解析、即ち MS/MS スペクトルの比較によりシトルリン化部位を同定した。その結果、3 つのシトルリン化部位を決定することができた。

### (3) AD の早期臨床検査診断薬の開発

AD 早期診断を行う臨床検査診断薬を開発するため、シトルリン化 GFAP を高感度に検出する ELISA システム（酵素免疫測定法）を富士レビオ（株）と共同で構築した。即ち、シトルリン化 GFAP に特異的なモノクローナル抗体を 8 種類、作製した。そして、これらシトルリン化 GFAP 特異的モノクローナル抗体を

組み合わせ、AD患者脳に存在するシトルリン化 GFAP に対して最も高感度な ELISA システムを構築した。

#### 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 8 件)

- ① Jang, B., Jeon, Y.C., Choi, J.K., Park, M., Kim, J.I., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., Choi, E.K. : Peptidylarginine deiminase modulates the physiological roles of enolase via citrullination: links between altered multifunction of enolase and neurodegenerative diseases. *Biochem. J.* (2012) (in press) (査読有)  
DOI:10.1042/BJ20120025
- ② Coudane, F., Mechin, M.C., Hucheq, A., Henry, J., Nachat, R., Ishigami, A., Adoue, V., Sebbag, M., Serre, G., Simon, M. : Deimination and expression of peptidylarginine deiminases during cutaneous wound healing in mice., *Eur. J. Dermatol.* 21 376-384 (2011) (査読有)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697043>
- ③ Jang, B., Shin, H.Y., Choi, J.K., Nguyen, du PT., Jeong, B.H., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., and Choi, E.K. : Subcellular localization of peptidylarginine deiminase 2 and citrullinated proteins in brains of scrapie-infected mice: nuclear localization of PAD2 and membrane fraction-enriched citrullinated proteins. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70 116-124 (2011) (査読有)  
DOI: 10.1097/NEN.0b013e318207559e
- ④ Jang, B., Jin, J.K., Jeon, Y.C., Cho, H.J., Ishigami, A., Choi, K.C. Carp, R.I., Maruyama, N., Kim, Y.S. and Choi, E.K. : Involvement of peptidylarginine deiminase-mediated posttranslational citrullination in pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 119 199-210 (2010) (査読有)  
DOI: 10.1007/s00401-009-0625-x
- ⑤ Ishigami, A. and Maruyama, N.: (REVIEW ARTICLE) Importance of research on peptidylarginine deiminase and citrullinated proteins in age-related disease. *Geriatr. Gerontol. Int.* 10 (Suppl. 1) S53-S58 (2010) (査読有)  
DOI: 10.1111/j.1447-0594.2010.00593.x
- ⑥ Handa, S., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Over-expression of Senescence Marker Protein-30 Decreases Reactive Oxygen Species in Human Hepatic Carcinoma Hep G2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32 1645-1648 (2009) (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.32.1645>
- ⑦ Fukuda, M., Kanou, F., Shimada, N., Sawabe, M., Saito, Y., Murayama, S., Hashimoto, M., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease. *Biomed. Res.* 30 227-233 (2009) (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.30.227>
- ⑧ Son, T.G., Park, H.R., Kim, S.J., Kim, K., Kim, M.S., Ishigami, A., Handa, S., Maruyama, N. Chung, H.Y. and Lee, J. : Senescence marker protein 30 is up-regulated in kainate-induced hippocampal damage through ERK-mediated astrocytosis. *J. Neurosci. Res.* 87 2890-2897 (2009) (査読有)

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 鈴木英治、今井雅之、松山明弘、奥野友哉梨、中越雅道、石神昭人、氷川英正、横山祐作：アルツハイマー病治療薬を指向したアミロイドベータ凝集阻害剤の開発：アリアルベンゾフラン誘導体. 第 131 回日本薬学会, 静岡, 2011.3.28-31
- ② 人見嘉哲、辻本藤太郎、石神昭人、近藤嘉高、神林康弘、弘田量二、日比野由利、柴田亜樹、中村裕之：ストレスによるマウス血漿総抗酸化能、抗酸化物質濃度の変化. 第 9 回分子予防環境医学研究会, 東京, 2010.1.22-23
- ③ 木村直樹、杉原毅彦、石神昭人：関節リウマチにおける血漿ペプチジルアルギニンデアミナーゼ 4 (PAD4) 及び抗 PAD4 抗体. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術総会, 東京, 2009.4. 23-26

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.aging-regulation.jp/kenkyu/pad-02.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

半田 節子 (HANDA SETSUKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・助手

研究者番号：30360697

### (2) 研究分担者

石神 昭人 (ISHIGAMI AKIHITO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：50270658