

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18日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591489

研究課題名（和文） 認知機能低下をもたらす神経変性および非変性鑑別のための病態分子マーカー検索

研究課題名（英文） Identification of biomarkers for differential diagnosis of neurodegenerative and non-neurodegenerative dementia.

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・教授

研究者番号：70226702

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）の鑑別診断に繋がる血漿バイオマーカーの検索を行った。ADでは、 $A\beta_{42}$ が神経細胞障害の主な因子と考えられる。マウス神経細胞をモデルとして、 $A\beta_{42}$ による細胞外に分泌された物質に注目した。アポトーシスに関連するリン脂質（ホスファチジルセリン）をコートした磁性ナノ粒子に結合する蛋白質を質量分析器で同定した結果、アネキシン A5、MFG-E8 が有力な候補として示された。アネキシン A5 は AD 患者血漿でも有意な上昇が認められた。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) differs from other forms of dementia in its relation to amyloid beta peptide ($A\beta_{42}$), which has a toxic effect on neuronal cells. This effect implies that protein expression is changed in neuronal cells by $A\beta_{42}$. In the present study, we used the mice primary culture neurons and investigated the proteins in the supernatant after incubation with or without $A\beta_{42}$. In view of the appearance of an acidic phospholipid (phosphatidylserine (PS)) on the outer plasma membrane of an apoptotic cell, we used PS as a probe and proteins bound to PS-coated magnetic nano-beads were identified using a proteomic approach. Of a number of proteins identified, we focused on annexin A5 and milk fat globule-EGF-factor 8 (MFG-E8) that is involved in the clearance of apoptotic cells. Both annexin A5 and MFG-E8 were found to be increased significantly in the culture supernatant by $A\beta_{42}$.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：認知症、アルツハイマー病、プロテオーム解析、血漿バイオマーカー、アネキシン A5、MFG-E8

1. 研究開始当初の背景

高齢の加速に伴い認知症患者が増加し、現在患者数が10年前の2倍近くに増大した。そして、認知症の中で最も頻度が高いアルツハイマー型認知症 (AD) に対する治療と進行遅延への対策は、分子生物学的研究結果を基盤にした戦略がとられている。

AD の診断には、NINCDS-ADRDA, ICD-10, DSM-IV をはじめとするが複数の診断基準があり、さらに高額機器による画像を加える診断は地域性、経済性、専門医の不足もあり、確定診断の困難さが指摘されている。バイオマーカーは、客観的な診断をより簡便に確実にし、広く理解され易くその有用性は大きい。

AD の生化学的特徴は、異常代謝産物 (42 残基ペプチド $A\beta_{42}$) の蓄積により、このペプチドが脳内の様々な代謝過程に影響を及ぼし、酸化的ストレスや Ca^{2+} -ストレスを引き起すことである。 $A\beta_{42}$ の蓄積の原因はその過剰産生やクリアランス能力の減衰が挙げられる。AD の約 10% は遺伝子変異を伴う家族性であるが、多く (90%) は孤発性である。AD の診断マーカーとして髄液中の $A\beta$ と神経原繊維変性を示す TAU 蛋白質の測定が有用であることが示されてきているが、髄液の採取は侵襲性が大きく簡便ではない。一方、サンプル採取の侵襲性が小さい血液を用いた診断は現在のところ存在しないが、その期待が持たれるところである。

また、神経変性疾患と非変性疾患を鑑別することは、治療の方針への一助になり、その目的に合うバイオマーカーの研究も重要である。

2. 研究の目的

本研究では、AD に対する複数の血漿候補マーカーを探索し、候補マーカーの生理病態学的意義を考慮し、有用なマーカーを選び出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞・動物モデルでの候補マーカー検出

マウス胎児 (P. C. 14day) 終脳より初代培

養細胞を調製し、無血清培地 (B27サプリメント) で培養することで、神経細胞含有割合が95%以下の細胞培養を実現した。 $A\beta_{42}$ ペプチドを加え、細胞外に分泌された物質を、質量分析器を用いて同定する、プロテオーム解析を行い、 $A\beta_{42}$ ペプチドを加えない対象と比較した。 $A\beta_{42}$ ペプチド添加で上昇する蛋白質に注目した。

分画方法：細胞へのストレスにより分泌される蛋白質の解析は、病態を反映する因子 (マーカー) の検出につながる。特に、血液脳関門を通過して末梢血に現れた因子が血漿マーカーとなることが期待できる。疎水性でかつ分子量の小さい蛋白質は一般的に血液脳関門を通過しやすいことから、脂質膜 (ナノリポソーム (後出)) で捕捉した。1次元電気泳動後、ゲルを一定間隔で切り取りゲル内トリプシン消化後、質量分析器で、蛋白質の同定を試みた。

(2) ナノリポソームを用いた血漿成分分画と同定-脂質ドメインを持つ磁性ナノリポソームを用いて

我々は、様々なリン脂質を表層に固相化できる磁性ナノ粒子 (ナノリポソーム) の開発に成功している (特願 2008-234579)。このナノリポソームは表層に熱応答性高分子を持ち、僅かな温度変化で分散と凝集を繰り返すことができ、磁気分離が可能である。この磁性ナノリポソームを用いて血漿などの体液中から極微量の蛋白質の分離を単離し、プロテオミクスアプローチでさまざまな候補バイオマーカーを検索できる。

本研究ではアポトーシスに大きく関わる phosphatidylserine (PS) をプローブとしてナノリポソームにコートし、 Ca^{2+} 依存的に PS に結合する画分を得た。

(3) 動物モデルを用いた検討

AD モデルマウス (家族性 AD の遺伝子異常を持つトランスジェニックマウス) を用い、候補マーカーについて免疫組織学的検討、血漿成分分析を行った。

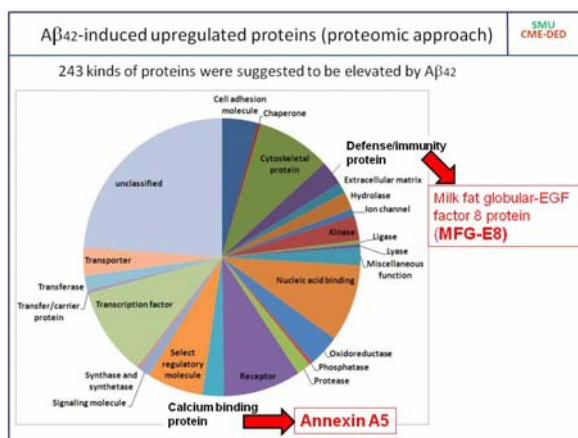
(4) 専門医の臨床的判断に基づいた正確な診断がなされた患者の血漿を用いた候補マ

一カーの検討

札幌医科大学倫理委員会の承認を得、学外の老年精神医学専門家（研究協力者）による臨床診断を経た血漿サンプルとコントロールとして地域健常高齢者から血漿サンプルを得た。また、血漿中のアネキシンA5の定量のために、学外研究協力者の協力によりモノクローン抗体を用いた定量アッセイ系を確立を確立した。

4. 研究成果

プロテオーム解析の結果、243種の蛋白質が $A\beta_{42}$ 刺激によって細胞外に増えることが示された。

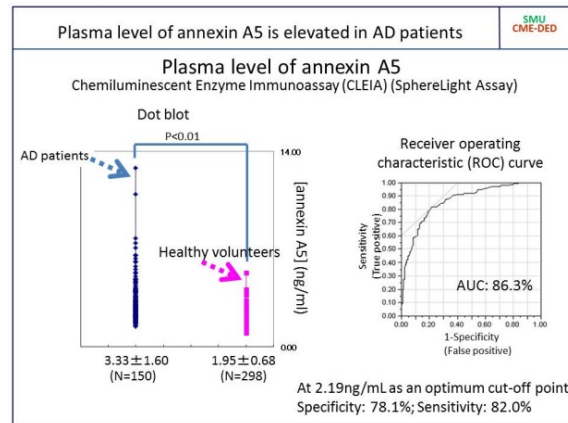


この中で我々は Ca^{2+} 結合蛋白質であり、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスに関わることが示されているアネキシン A5、そして PS に結合しアポトーシ細胞の食促進に関与する因子 milk fat globular EGF-8 protein (MFG-E8) に注目した。いずれの因子も $A\beta_{42}$ によって刺激培養上清に上昇することが認められた。更に、AD 動物モデルとして広く使われるトランスジェニックマウス (Tg2576) 脳を用いた免疫組織学的検討で、両者の発現上昇を確認した。

また、アネキシン A5 については、コントロールと比べ Tg2576 血漿中でも有意に上昇することが示された。これらの知見は AD の血漿バイオマーカーとなることが期待された。事実、AD 患者 (150 人) と高齢健常者 (298 人) の血漿アネキシン A5 濃度を測定した結果、ROC 曲線下面積 89.8% となり、アネキシン A5 が有効な AD マーカーとなる可能性が示された。ヒト血漿においても AD で有意に上昇する傾向にあることを明らかにした。

複数の候補マーカーを効率よく解析することで、客観性が高い方法の提案が可能とな

るが、それぞれのマーカーの出現時期や生物学的意義等、マーカーによる評価を行う上で検討すべきことが残されている。今後、候補マーカーの検索を続けると同時に、これまでの候補マーカーの生理病態学的意義の検討を加え、分子マーカーとしての重要性を明らかにしていく。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Weber GF, Warren J, Sohma H, Chen T, Halim A, Chakravarty G. Biomarkers: A pot of gold or a can of worms? *Cancer Biology and Therapy*, 2012 (in press) (査読あり) .
2. Hashimoto E, Riederer P, Hesselbrock VM, Hesselbrock MN, Mann K, Park TW, Ukai W, Sohma H, Schuckit MA, Saito T. Consensus paper of the WFSBP 2011 Task Force on Biological Markers: Biological Markers for Alcoholics. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2012 (in press) (査読無し) .
3. Saito A, Ariki S, Sohma H, Nishitani C, Inoue K, Ebata N, Takahashi M, Hasegawa Y, Kuronuma K, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary Surfactant Protein A Protects Lung Epithelium from Cytotoxicity of Human β -Defensin 3. *J Biol Chem* 2012 ; 287: 15034-15043. (査読あり)
4. Oki G, Wada T, Iba K, Aiki H, Sasaki K, Imai S, Sohma H, Matsumoto K, Yamaguchi M, Fujimiya M, Yamashita T, Kokai Y. Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by

- proteomics. *Pain*. 2012, 153:532-539.
(査読あり)
5. Yamamoto M, Ota A, Hori T, Imai S, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Inazawa N, Ito YM, Kimura H, Tsutsumi H, Kokai Y. Early expression of plasma CCL8 closely correlates with survival rate of acute graft-versus-host disease in mice. *Exp. Hematol*. 2011; 39: 1101-1112. (査読あり)
 6. Kobayashi S, Tateno M, Park TW, Utsumi K, Sohma H, Ito YM, Kokai Y, Saito T. Apolipoprotein E4 Frequencies in a Japanese Population with Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *PLoS ONE* 2011; 6: e18569. (査読あり)
 7. Takahata S, Takebayashi T, Terasima Y, Tanimoto K, Wada T, Sohma H, Kokai Y, Yamashita T. Activation of glial cells in the spinal cord of a model of lumbar radiculopathy. *J Orthop Sci*, 2011; 16: 313-320. (査読あり)
 8. Hida T, Sohma H, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Tosa N, Yamashita T, Jimbow K. Rab7 is a critical mediator in vesicular transport of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J. Dermatol*. 2011; 38: 432-441. (査読あり)
 9. Yamaguchi M, Kokai Y, Imai S, Utsumi K, Matsumoto K, Honda H, Mizue Y, Momma M, Maeda T, Toyomasu S, Ito YM, Kobayashi S, Hashimoto E, Saito S, Sohma H: Investigation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease using neuronal cell culture and mouse model. *J. Neurosci. Res*. 2010; 88: 2682-2692. (査読あり)
 10. 佐々木浩一、小笹泰宏、木村成寿、相馬 仁、青島理人、小海康夫. Multiple reaction monitoring をバリデーションに用いた質量分析による血漿バイオマーカー探索システムの検討. *生物物理化学* 2009; 53: 1-7. (査読あり)
 11. Ota A, Yamamoto M, Hori T, Miyai S, Naishiro Y, Sohma H, Maeda M, Kokai Y. Upregulation of plasma CCL8 in mouse model of graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 2009; 37: 525-531. (査読あり)
- [学会発表] (計 10 件)
1. Sohma H, Yamaguchi M, Kimura M, Imai S, Matsumoto K, Takei N, Kokai Y. Investigation of novel biomarkers for Alzheimer's disease using lipid-coated nanoparticles. In: 2nd World Congress on Biomarkers and Clinical Research: 2011, Sep. 3rd: Baltimore, U.S.A.
 2. Sohma H, Yamaguchi M, Kimura M, Imai S, Matsumoto K, Hashimoto E, Saito T, Kokai Y. Investigation of novel biomarkers for Alzheimer's disease. 10th World Congress of Biological Psychiatry, 2011, May. 31st, Prague, Czech Republic.
 3. Sohma H. Advanced Initiatives in Interprofessional Education in Japan: JIPWEN Overview and Case Studies. 2nd Global Forum on Human Resources for Health. Prince Mahidol Award Conference 2011, Jan. 25th, Bangkok, Thailand.
 4. Sohma H, Sawada I, Konno M, Akashi H, Sato TJ, Maruyama T, Tohse N, Imai K. Encouraging appreciation of the community health care by consistent medical undergraduate education. In: AMEE conference: 2009, Aug. 31st, Malaga, Spain.
- [図書] (計 2 件)
1. Naishiro Y, Nakamura M, Sato TJ, Yamamoto T, Wheeler G, Sohma H, Shimamoto K. IPE Aimed at Encouraging Appreciation of the Community Health Care in Hokkaido Prefecture. Development and practice of Interprofessional Education in Japan (Endo K, Magara A, Nagai Y. eds), 2012; pp55-65.
 2. Sohma H, Sawada I, Konno M, Akashi H, Sato TJ, Maruyama T, Tohse N, Imai K. Encouraging appreciation of community health care by consistent medical undergraduate education. Advanced Initiatives in Interprofessional Education in Japan (Watanabe H, Koizumi M. eds), Springer 2010; pp1-12.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：アミロイドβ神経障害バイオマーカー

発明者：小海康夫、相馬仁、今井伸一、松本圭代、木村成寿

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2010-280331

出願年月日：2010 年 12 月 16 日

国内外の別：国内

名称：アルツハイマー型認知症の検査方法

発明者：相馬仁、小海康夫

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2010-115606

出願年月日：2010 年 5 月 19 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://web.sapmed.ac.jp/cme/d_meded/kyouiku/sohma.html

6. 研究組織

(1) 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・教授

研究者番号：70226702

(2) 研究分担者

小海 康夫 (KOKAI YASUO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20178239

齋藤 利和 (SAITO TOSHIKAZU)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50128518