

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590885

研究課題名(和文)変異型アミロイド 蓄積機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of accumulation of amyloid beta with D678N APP mutation

研究代表者

和田 健二(Wada, Kenji)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60346351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド前駆体蛋白(APP)遺伝子 D693N変異を有する家族性アルツハイマー病にみとめられた剖検脳や病理病変を用いて生化学的、病理学的検討を計画した。この変異はアミロイド 蛋白内部に特異な遺伝子変異を有するため蓄積アミロイド を特異的に認識する抗体異抗体を作成し解析を試みた。作成した新規のアミロイド 抗体は、特異的に異常アミロイド を認識する抗体が作成された。

研究成果の概要(英文)：We planned the biochemical and neuropathological examination of the human brain derived from the patients of familial Alzheimer disease with a novel missense mutation, Asp678Asn (D678N), in the amyloid precursor protein (APP) gene. This mutation, located at the sixth amino acid of amyloid (A ) is assumed to have distinct effect on A aggregation or their influence on the physiological and pathological roles of APP. We produced novel antibodies which specifically recognized this novel amyloid

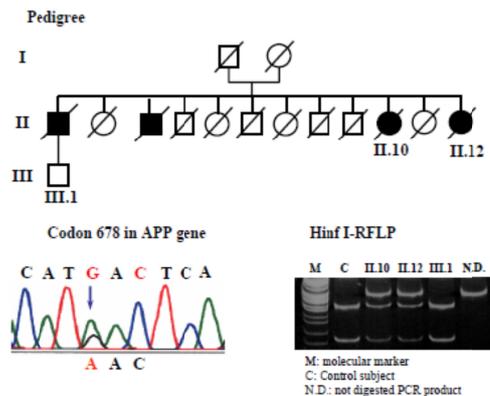
研究分野：神経内科

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド アミロイド前駆体蛋白 遺伝子変異 神経変性

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化による認知症高齢者は著しく増加しており、特にアルツハイマー病は最も頻度が高く、根本的治療法開発のための病態解明研究が必要とされている。

我々は、家族性アルツハイマー病家系においてアミロイド前駆体蛋白 (APP) 遺伝子に新規遺伝子異常異常 (D678N) を発見し報告した。



この APP 変異はアミロイド 内部に遺伝子変異を有するため、野生型アミロイド とともに変異型アミロイド が蓄積する特異な病態が想定されている。

in vitro の培養細胞実験系において、D678N - APP 遺伝子変異はアミロイド 産生亢進やアミロイド 42/40 産生比には影響を及ぼさないが、合成ペプチドの検討において、野生型に比べ変異型アミロイド は凝集性亢進が確認されており、同変異によるアミロイド 蓄積機構の一機序が示されている。しかし、実際の患者脳におけるアミロイド 蛋白蓄積についての解明が未だ検討がなされていない。

D678N - APP 遺伝子変異を有する 2 症例の剖検脳を得ることができ、病理学的な検討では、老人斑および神経原線維変化といったアルツハイマー病と病理学的に確定ができた。また、これらの症例ではアミロイドアングiopatcher を認めていた。

2. 研究の目的

本研究においては、D678N - APP 遺伝子変異を有する剖検脳を用いて生化学的検討を行い、血管および大脳皮質に老人斑として蓄積しているアミロイド 蛋白分子種を決定するとともにアミロイド 蓄積に関連する因子を明らかにする事を目的とした。

この遺伝子変異はアミロイド 蛋白内のアミノ酸が置換され、野生型と異なる変異アミロイド 蛋白が産生され、変異アミロイド の蓄積機構を解明することにより、アルツハイマー病におけるアミロイド 蛋白蓄積に関する新たな機序が解明できる可能性が秘められている。

そこで、変異アミロイド 蛋白を特異的に

認識する抗体を作成して病理学的、生化学的に野生型アミロイド 蛋白との関連を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳蛋白の抽出

病理標本にてアミロイド沈着が豊富な部位に相当する凍結脳標本を選定する。凍結の脳標本より髄膜、白質を除去する。Homogenize した後、Tamaoka らの方法 (Tamaoka A et al. Proc Natl Sci USA 89:1345-49, 1992) を用いて血管画分と実質画分に分け、それぞれ Tris 可溶性画分および蟻酸抽出 (不溶性) 画分に分けて蛋白を抽出した。

合成アミノ酸の検討では、変異アミロイド は BC05 抗体、BA27 抗体、BNT77 抗体に反応性はあるものの BAN50 抗体とは反応性を有さない。ELISA 系において、抗体組み合わせにより以下のように変異型あるいは野生型アミロイド を定量化することが想定された。

BNT77/BA27	: 変異 + 野生型アミロイド	40
BNT77/BC05	: 変異 + 野生型アミロイド	42
BAN50/BA27	: 野生型アミロイド	40
BAN50/BC05	: 野生型アミロイド	42

それぞれの抗体を組み合わせた ELISA 系を用いて、上記による抽出した不溶画分のアミロイド を測定し、蓄積アミロイド 分子の定量を試みた。

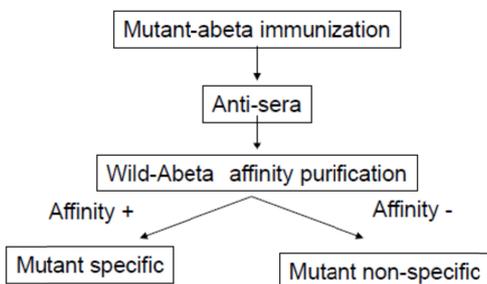
(2) 変異アミロイド 蛋白を認識する特異抗体の作成

変異アミロイド ペプチド

(DAEFRHNSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIA) を合成し、免疫動物ウサギに摂取し抗血清を作成。

抗血清を野生型アミロイド ペプチド

(DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIA) によるアフィニティー精製を行い、特異的ポリクローナル抗体を作成。



作成したポリクローナル抗体の変異アミロイド に対する特異性の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 患者由来の凍結脳を血管と脳実質に分離したのち、それぞれ Tris 可溶性画分および蟻酸抽出 (不溶性) 画分の蛋白を抽出し

た．予備実験においてこれらの画分について市販 EKLIS キットを用いて種々のアミロイド分子種の測定を試みた．しかし，既存の ELISA キットでは野生型アミロイドと変異型アミロイドを明確に分離することができない可能性が分かった．当初想定されていた通りに測定系で結果が得られず，他の市販抗体を用いた測定系の構築，あるいは変異型アミロイドを特異的に認識する抗体を作成の必要性が考えられた．

(2) 特異的アミロイド抗体 (F-817 抗体) 変異アミロイド (D7N) を抗原とし，免疫動物であるウサギに摂取し，抗血清を得た．アフィニティーカラムにて野生型アミロイドに吸着しなかった分画を回収し，変異アミロイド抗体を得た．

(3) 変異アミロイド抗体 (F-817 抗体) の検証．変異アミロイド抗血清はウシ血清由来アルブミン (BSA) (図 1) や野生型アミロイドとは反応せず (図 2)，変異アミロイドのみ反応した．

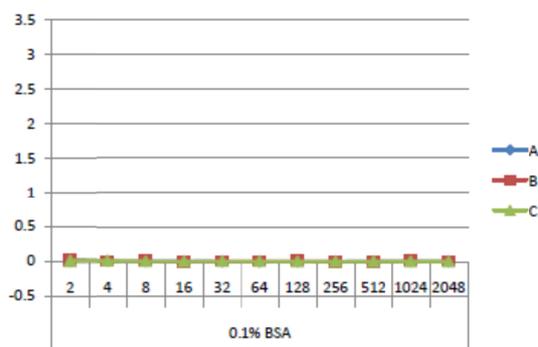


図 1 F-817 抗体の BSA との反応性

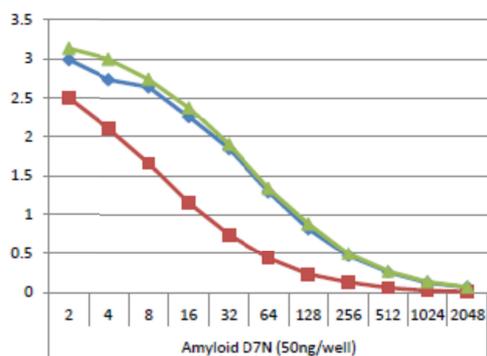


図 2 F-817 抗体の変異アミロイド蛋白との反応性

抗血清 (抗体) と変異アミロイドペプチドと反応吸着させた後に，野生型アミロイドとの反応性を確認したが，野生型アミロイドとの反応性はなかった (図 3)．

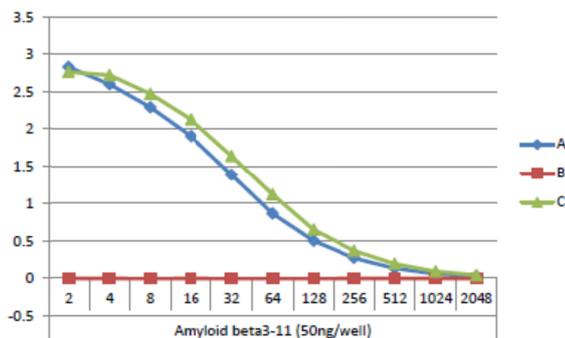


図 3 変異アミロイド蛋白吸着後の反応性

以上より，変異アミロイドを認識する特異的に認識する抗体であることを確認した．

変異アミロイド蛋白を特異的に認識する抗体を作成し，今後の解析に応用していく．

## 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 3 件)

Yamawaki M, Wada-Isoe K, et al. Association of cerebral white matter lesions with cognitive function and mood in Japanese elderly people: a population-based study. Brain Behav. 査読有, 5 巻, 2015, e00315.

Tanaka K, Wada-Isoe K, Yamamoto M, et al. Clinical evaluation of fatigue in Japanese patients with Parkinson's disease Brain Behav. 査読有, 4 巻, 2014 :643-649.

Tanaka K, Wada-Isoe K, Nakashita S, et al. Impulsive compulsive behaviors in Japanese Parkinson's disease patients and utility of the Japanese version of the Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders in Parkinson's disease. J Neurol Sci. 査読有, 331 巻, 2013, 76-80.

〔学会発表〕(計 3 件)

和田健二 他, 地域在住高齢者における日常生活活動の検討 第 33 回日本認知症学会学術集会, 2014 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

和田健二 他，当院におけるもの忘れ外来の受診状況の変遷 第 32 回日本認知症学会学術集会，2013 年 11 月 8 日 - 10 日，キッセイ文化ホール（松本市）

和田健二 他，新しい基準を実地臨床でどう生かすか？ 第 31 回日本認知症学会学術集会，2012 年 10 月 26 日 - 28 日，つくば国際会議場（つくば市）

〔図書〕（計 5 件）

和田健二 他，中外医学社，ヒトでの A 蛋白伝搬（感染）と治療 Clinical Neuroscience 33 巻 3 号 279 - 281，2015 年

和田健二 他，日本医事新報社，認知症治療薬の進歩 日本医事新報 4751 巻 50，2015 年

和田健二 他，長寿科学振興財団機関誌，アルツハイマー型認知症の治療薬 エイジングアンドヘルス 23 巻 2 号 19 - 24，2014 年

和田健二 他，中外医学者，健忘 Clinical Neuroscience 31 巻 5 号 542 - 543，2013 年

和田健二 他，日本評論社，アルツハイマー病の疫学 からだの科学 278 巻 32 - 36，2013 年

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6．研究組織

(1)研究代表者

和田 健二（WADA Kenji）

鳥取大学医学部附属病院・講師

研究者番号：60346351