

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700369

研究課題名(和文) 質量顕微鏡を用いた神経細胞内封入体の研究

研究課題名(英文) Detection of aggregated protein of neurodegenerative disease by MALDI-TOF MS.

## 研究代表者

和手 麗香 (WATE, REIKA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50440988

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)：神経変性疾患は詳細な機序が不明で確立された治療法がない過酷な疾患群であり、近年特定のタンパク質が特定の細胞内に凝集して封入体となることが判明してきた。そこで、一側線条体を破壊した、大脳基底核疾患のモデル動物において、大脳基底核回路関連タンパクのmRNAの発現をreal time RT-PCRを用いてregional quantitationを行う一方、ヒト剖検標本を用いてMALDI-TOFによるペプチドの測定と、データベース検索による同定を行った。今回の研究で、mRNAの新たな解析法の確立に成功したが、剖検標本における疾患関連微量タンパクはピークに埋没した可能性があり、今後の課題を示した。

研究成果の概要(英文)： Neurodegenerative diseases are increasingly being realized to have common cellular and molecular mechanisms including protein aggregation and inclusion body formation, however the pathomechanisms and proteins underlying the inclusions are not completely understood. A new method for regional quantitation of mRNA at the basal ganglia of model rats by real time RT-PCR showed the change of the quantity of mRNA. The analysis of the disease-related proteins with matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) technology showed some unique protein in the spinal cord of ALS patients in comparison with disease control. They are alpha-internexin, anxin A5, aspartate aminotransferase (cytoplasmic), Citrate kinase B-type, Fructose-bisphosphate aldolase C, Histone H2A type 1-J, Tubulin alpha-1A chain, Tubulin beta-2C chain and so on. The possibility that can detect the disease more-specific protein will increase by using immunoprecipitation before the analysis.

研究分野：神経内科学、神経病理学

キーワード：神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、いまだ詳細な原因や病態機序が不明であり、根本的な治療法が確立されていない疾患群である。近年、多くの神経変性疾患で、特定のタンパク質が特定の細胞内に凝集して封入体となることが判明し解析が進められてきた。これまで、免疫組織化学的手法や、免疫沈降法を中心に、封入体の構成成分の研究がなされてきているが、構造体が同定されたものでさえも詳細な構成成分は不明なものが多い。高齢化社会を迎えた現在、社会的にも注目され大きな問題となっているアルツハイマー病やパーキンソン病をはじめ、根本的な治療法が確立されていない過酷な疾患である筋萎縮性側索硬化症など、神経変性疾患は治療の開発につながる病態の解明が切望されている分野である。

2006年、顕微質量分析装置による生体組織分析の成功が報じられ、これを用いて世界で初めて多変量解析の法の一つである主成分分析法を質量顕微鏡法に応用した遺伝子改変マウスの異常の検出に成功した報告がなされた (Yao et al. Proteomics 8:3692-3701, 2008)。さらに、この手法を用いたマスイメージング解析は、当初固定処理の施されていない凍結切片のみであったが、2010年以降、島津製作所のケミカルプリンタ CHIP-1000 を用いることにより安定したパラフィン切片のマスイメージング解析が可能になった。

そこで、質量顕微鏡を用いて、神経変性疾患のパラフィン切片からの細胞内封入体を解析することで、これまで未知であった構成成分や、検出が困難であった少量の蛋白を同定できるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

モデル動物および、神経変性疾患患者のヒト剖検標本を用いて、regional かつ定量的なタンパク質解析技術を考案するとともに、質量顕微鏡によるマスイメージング解析を行って、神経細胞内封入体に含有される蛋白を解析したい。これにより、神経変性疾患群のタンパク質凝集の機序や治療法の開発につながるターゲットタンパク質を探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

8週齢の雌のSDラットを用いて、定位脳

手術にて一側のmedial forebrain bundleに、6-Hydroxydopamine hydrobromide を注入し、一側のドーパミン神経を破壊した、モデルラットを作成する。術後4週の時点で行動観察により、一側の錐体外路症状の発現を確認したのち、と殺して脳を取り出し、ドライアイスパウダー内で凍結固定して標本を作製する。1mm厚の冠状断を作成し、18Gのno-bevel needleにて線条体背外側、線条体腹外側、淡蒼球、運動皮質をdie-cutし、組織を回収してreal time RT-PCRを用いて、control側に比して変動を示すタンパク質のmRNAを検討する。残りの脳を凍結切片として薄切し、matrix-assisted laser desorption / ionisation time-of-flight (MALDI-TOF)の解析に用いるため、マトリクス及び条件設定を検討する。

ホルマリン固定ヒト剖検標本および凍結ヒト剖検標本を、動物実験で条件を検討したマスイメージング装置システムを用いて解析し、封入体のタンパク質の抽出・解析を行う。

## 4. 研究成果

6-Hydroxydopamine hydrobromideを用いた定位脳手術で作成したモデルラットの基底核回路のmRNAを、real time RT-PCRを用いてregional quantitationを行った。線条体において、prodynorphinのmRNAは、対照側に比べて患側の線条体背外側および腹外側の双方で低下しており、dopamine receptor D1のmRNAは線条体背外側で低下していた。一方、proenkephalinのmRNAは線条体腹外側で増加していた。また、Adenosine A2A receptorのmRNAは線条体背外側では低下していたが、淡蒼球と運動皮質では増加が確認された。

パラフィン固定ヒト剖検標本におけるMALDI-TOFについては、マトリクスやレーザー照射条件の変更による検討を行ったが、ターゲットとするタンパク質のイオン化および検出は十分ではなく、データの収集は不能であった。

そこで代替として、凍結ヒト剖検標本を用いることとし、LCMで切り出した筋萎縮性側索硬化症(ALS)のヒト剖検標本と、disease controlのヒト剖検標本の脊髄前角灰白質のSDS-PAGEを行った。電気泳動分子量マーカー

を指標に5つに分画した後、ゲル内での buffer 置換と消化を行い、ペプチドを回収した。Nano-LC system による分離を行って、MALDI-TOF/TOF 5800 による測定を行ったのち、protein pilot を用いたデータベース検索と同定を行った。

ALS 患者組織から同定されたタンパクは 50 種類で、disease control の組織から同定できた蛋白は 40 種類であった。このうち、双方に共通して認められたものは 30 タンパクであった。

	ALS	Disease control
<b>Total</b>	50	40
<b>Unique</b>	20	10
<b>Common</b>	30	

患者組織のみから同定され、disease control からは同定されなかったタンパクは、  
 2' ,3' -cyclic-nucleotide  
 3' -phosphodiesterase  
 60 kDa heat shock protein, mitochondrial  
 Aconitate hydratase, mitochondrial  
 Actin, cytoplasmic 2  
 Alpha-internexin  
 Annexin A5  
 Aspartate aminotransferase (cytoplasmic)  
 BTB/POZ domain-containing protein KCTD 12  
 Citrate synthase, mitochondrial  
 Citrate kinase B-type  
 Fructose-bisphosphate aldolase C  
 Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2  
 Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-1  
 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha  
 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4  
 Heat shock cognate 71 kDa protein  
 Histone H2A type 1-J  
 Isoform 17.2 kDa of Myelin basic protein  
 Neurofilament light polypeptide  
 Tubulin alpha-1A chain  
 Tubulin beta-2C chain  
 であった。

一方、患者組織および disease control 双方に共通して検出されたタンパクは、  
 Aconitate hydratase (mitochondrial)  
 Alpha-crystallin B chain

ATP synthase subunit (mitochondrial)  
 Carbonyl reductase [NADPH] 1  
 Dihydropyrimidinase-related protein 2  
 Glial fibrillary acidic protein  
 Heat shock protein beta-1  
 Hemoglobin subunit epsilon  
 Isoform 20.2 kDa of Myelin basic protein  
 Myelin-oligodendrocyte glycoprotein  
 Myelin basic protein  
 Myelin-oligodendrocyte glycoprotein  
 Neurofilament heavy polypeptide  
 Neurofilament light polypeptide  
 Neurofila  
 ment medium polypeptide  
 Peroxiredoxin-6  
 POTE ankyrin domain family member E  
 Pyruvate kinase isozymes M1/M2  
 Sodium / potassium-transporting ATP ase subunit alpha-1  
 Sodium / potassium-transporting ATP ase subunit alpha2  
 Spectrin alpha chain, brain  
 Spectrin alpha chain, brain 1  
 Stress-70 protein, mitochondrial  
 Syntaxin-binding protein 1  
 Tubulin alpha-1C chain  
 Tubilin beta-2A chain  
 Tubilin beta-2B chain  
 Tubilin beta-3 chain  
 Tubilin beta-4 chain  
 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1  
 であった。

今回の結果では、ピークは量的に優位な分子に埋没しており、疾患特異的な微量分子の検出ができていない可能性があると考えた。今後、質量分析にかける前に免疫沈降などで selection を行うなど、さらなる工夫を加えての研究が必要である。

## 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)

[学会発表](計 1 件)

Oki M, Kaneko S, Iida S, Itani K, Tsuge A, Nakamura M, Wate R, Takenouchi N, Kusaka H, Regional quantitation of mRNA in 6-OHDA-lesioned rats by real time RT-PCR. 第 56 回日本神経学会学術総会, 2015 年 5 月 22 日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

〔その他〕

ホームページ等

関西医科大学神経内科研究紹介

<http://www3.kmu.ac.jp/nerog/neurog/study.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

和手 麗香 (WATE, Reika)

関西医科大学 医学部 講師

研究者番号：50440988

### (2)研究協力者

隠岐 光彬 (OKI, Mitsuaki)

関西医科大学 医学部 大学院生