

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462663

研究課題名(和文) 鼻腔アミロイド 検出によるアルツハイマー病早期診断法の開発

研究課題名(英文) Development of the method of measurement of amyloid-beta in nasal samples for diagnosis of Alzheimer's Disease

研究代表者

清水 志乃 (Shimizu, Shino)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：50505592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト鼻腔擦過検体によるアルツハイマー病早期診断の可能性の検討を目的としている。

今回の検討では、ヒト鼻腔内でもアミロイド やタウ蛋白を検出できることを確認した。また、ヒト鼻腔擦過検体中のアミロイド 検出方法を論文報告した。さらに、臨床診断および病理診断によってアルツハイマー病と診断された症例の一部において嗅粘膜に特徴的な所見があることを免疫組織学的に確認した。これらの結果を基に鼻腔のタウ蛋白とアミロイド 測定のための臨床研究を実施し、結果は現在統計解析中である。

研究成果の概要(英文)：We have shown that we can detect significant concentration of amyloid-beta or Tau protein in human nasal cavity samples. We have reported the method to measure amyloid-beta in nasal cavity samples. Moreover, we had a clinical study for diagnosis of Alzheimer's Disease using nasal cavity samples. The data of the clinical study are under analysis.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：アルツハイマー病 早期診断 ヒト鼻腔 アミロイド タウ蛋白 嗅粘膜

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病は、初老期から老年期に起こる進行性の認知機能障害を特徴とする疾患である。今後人口の高齢化に伴いその数は確実に増加すると予想される。アルツハイマー病に対する治療薬は、より早期から投与を開始することである程度の効果が得られることが示されている。そのため早期にアルツハイマー病を診断する必要がある。

(2) アルツハイマー病の特徴的な病理組織所見としては、老人斑と神経原線維変化がある。前者の主構成成分はシート構造をとったアミロイド (A β) の凝集体であり、後者のそれは過剰にリン酸化されたタウ蛋白である。アルツハイマー病においては臨床症状が発症するかなり前から、脳内では A β が蓄積する等の病理的組織変化の進行が知られている。一方、神経原線維変化は、老人斑よりも遅れて出現し、神経原線維変化の増加と共に認知症状も悪化することが知られている。

(3) 脳神経のうち唯一外界の自由表面に曝される嗅神経が鼻腔の天蓋部には存在する。申請者らは、鼻腔に沈着する A β 量が脳に沈着する A β 量に比例することをアルツハイマーモデルマウスにより見出した (Kameshima N, et. al. Neurosci Lett. 2012 Apr 4; 513(2): 166-9.)。鼻腔に沈着する A β 量を測定すれば、脳に蓄積している A β 量を推定でき、アルツハイマー病の安価で低侵襲な診断方法になる可能性がある。そこで、ヒト鼻腔内の A β 量を測定したところ、ヒト鼻腔内にも A β が検出されることが明らかになった。

2. 研究の目的

(1) こうした成果を受けて、若年健常者、高齢健常者、およびアルツハイマー病患者で、鼻腔擦過検体中の A β 量やタウ蛋白量を測定して比較することで、アルツハイマー病を診断することができるか否か、検討する。

(2) 認知症患者の病理解剖検体より得た嗅球・嗅裂粘膜・下鼻甲介粘膜における A β やタウ蛋白の局在を明らかにすることで、鼻腔で検出される A β の由来について考察する。

3. 研究の方法

(1) 鼻腔粘膜擦過検体からの A β 40、A β 42、タウ蛋白の検出

1) 健常若年者と健常高齢者から鼻腔粘膜擦過検体を採取する。綿棒にて下鼻甲介、中鼻道、嗅裂、総鼻道の一定部位を無麻酔で一定回数擦過する。適宜擦過検体の溶出

を行った後、溶液中に含まれる A β 40、A β 42、タウ蛋白の濃度を市販 ELISA キットにて半定量する。

2) 1)において ELISA 法で A β 40、A β 42、タウ蛋白の検出が可能であった場合、内部コントロールとして総蛋白と DNA を定量し、補正する。

(2) アルツハイマー病患者の鼻腔粘膜擦過検体からの A β 、総タウ蛋白、リン酸化タウ蛋白の検出

(1) - 1)において A β 40、A β 42、タウ蛋白の検出が可能であった場合、健常高齢者とアルツハイマー病患者の鼻粘膜擦過検体から A β 、総タウ蛋白、リン酸化タウ蛋白の定量を行う。下鼻甲介、中鼻道、嗅裂、総鼻道から検体採取を行い、最適採取部位を決定する。目的とする蛋白によって検体の溶出方法が異なるため目的とする項目ごとに採取が必要であるが、同一検体からの検出方法についても検討する。

(3) 承諾を得た患者さんの剖検時に、脳および鼻粘膜を摘出する。固定標本は、病理学的検索を行うとともに A β とリン酸化タウ蛋白について免疫組織化学法を用いて嗅粘膜におけるその存在と局在を検証する。

4. 研究成果

(1) 鼻腔擦過検体からの A β の検出

1) 総鼻道から採取した検体を用いた検討では、新たに開発した検体処理法を用いることによって、A β 濃度測定が可能であることを確認した。

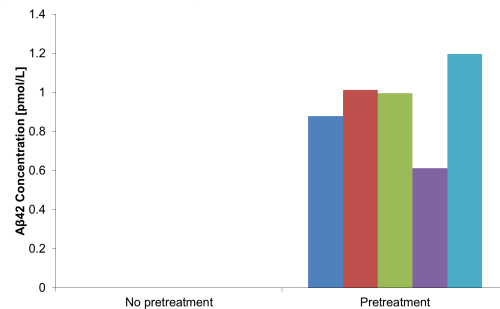


図1 5名のボランティアの総鼻道から採取した検体中の A β 42 濃度 左：未処理、右：蟻酸にて前処理

2) 下鼻甲介または総鼻道の擦過検体を用いて総蛋白で補正した A β 濃度を比較すると、下鼻甲介の A β 42 濃度は総鼻道の A β 42 濃度より有意に高かった。

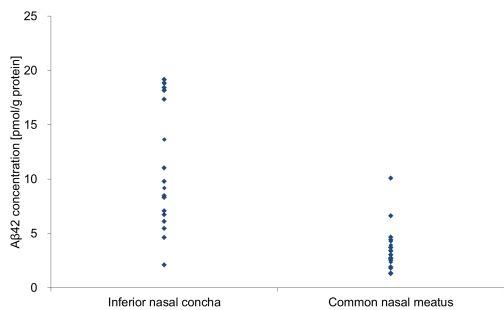


図2 21名のボランティアの下鼻甲介(左)または総鼻道(右)の擦過検体中のA₄₂濃度(総蛋白量で補正)

3) 若年または高齢健常者の下鼻甲介または総鼻道の擦過検体を用いてA₄₂濃度を測定すると、若年群と高齢群の間に有意な差は認められなかった。

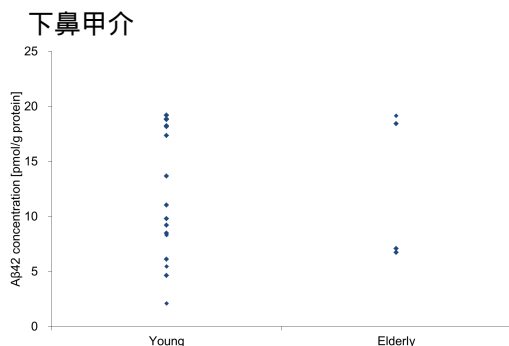


図3 下鼻甲介擦過検体中のA₄₂濃度(総蛋白で補正) 左: 17名の健常若年ボランティア、右: 4名の健常老年ボランティア

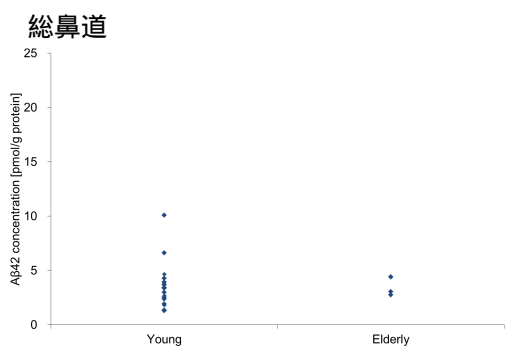


図4 総鼻道擦過検体中のA₄₂濃度(総蛋白で補正) 左: 17名の健常若年ボランティア、右: 4名の健常老年ボランティア

(2) アルツハイマー病患者を対象にした鼻腔擦過検体中のA₄₂およびタウ蛋白濃度の測定

1) 予備検討によって鼻腔検体中のタウ蛋白の測定も可能であることが明らかとなったため、鼻腔のA₄₂およびタウ蛋白濃度の測定のための最適採取部位、および同一検体からA₄₂およびタウ蛋白の検出方法の検討を目的に、臨床研究を実施した。2016年3月31日までの期間に、滋賀医科大学医学

部附属病院脳神経センターを受診したアルツハイマー病患者と健常高齢者それぞれ25名を対象に、神経心理検査、MRI検査、血液検査、鼻腔内検体測定(A₄₂、タウ蛋白、総蛋白)を行った。検体収集を終了し、現在データの統計解析中である。

(3) A₄₂とリン酸化タウの嗅粘膜における臨床診断および病理診断によってアルツハイマー病と診断された患者の一例

1) 嗅粘膜組織の構造

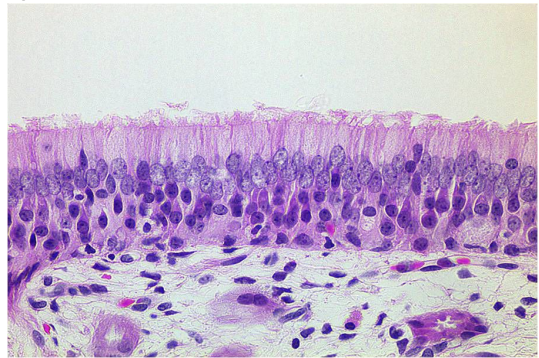


図5 嗅粘膜のヘマトキシリン・エオジン染色

認知症患者の病理解剖検体より嗅裂を含む組織を一塊に摘出し、固定脱灰後組織学的検討に用いた。鼻腔側から淡い楕円形の細胞核を持つ支持細胞、濃く小さな核で紡錘形の細胞質を持つ嗅細胞が確認できる。嗅細胞は鼻腔側に樹状突起を嗅球側に軸索を伸ばす双極細胞である。基底膜上には基底細胞が観察される。

2) A₄₂

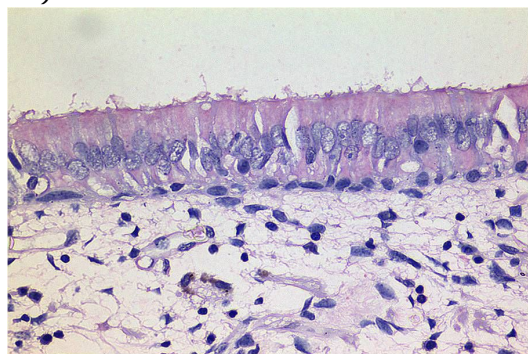


図6 嗅粘膜のA₄₂ 嗅細胞および支持細胞の細胞質にA₄₂は染色された。同じ切片中の気道上皮には染色されなかった。

3) リン酸化タウ蛋白

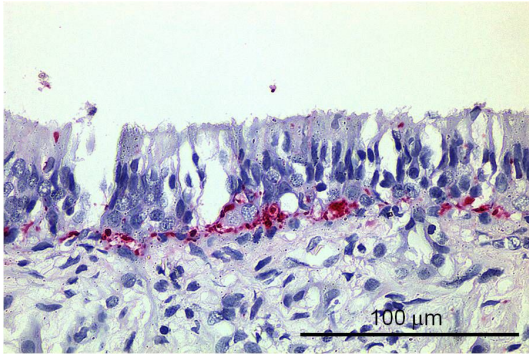


図7 嗅粘膜のリン酸化タウ蛋白
嗅上皮の基底膜に沿ってリン酸化タウ蛋白の沈着が認められた。また、嗅細胞から嗅系にもリン酸化タウ蛋白の沈着が確認でき、鼻腔側に伸びる樹状突起に沿ってリン酸化タウ蛋白が染色された。

以上の結果から、若年健常者、高齢健常者、およびアルツハイマー病患者で、鼻腔擦過検体中のA β 量やタウ蛋白量を測定することが可能であることがわかった。アルツハイマー病を診断することができるか否かについては、臨床研究の統計解析結果によって明らかとなる。

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)

[雑誌論文](計1件)

Nanjo T, Fukuhara T, Kameshima N, Yanagisawa D, Shimizu S, Shimizu T, Shiino A, Akatsu H, Yamamoto T, Tooyama I. Development of a method to measure Ab42 in nasal cavity samples and its application in normal human volunteers. J Brain Sci 44:5-23, 2014 (査読あり)
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=eg7brasc/2014/004400/001&name=0005-0023e&UserID=202.19.144.39&base=jamas_pdf

[学会発表](計3件)

Toshifumi Nanjo, Takaomi Fukuhara, Naoko Kameshima, Seiji Sogabe, Hiroyasu Akatsu, Takayuki Yamamoto, Makoto Michikawa, Ikuo Tooyama. Improved precision of beta-amyloid measurements in nasal samples using a new collection instrument. Alzheimer's Association International Conference, 13 July 2013 - 18 July 2013, USA
Hiroyasu Akatsu, Koichi Inoue, Nana Mochizuki, Takaomi Fukuhara, Takayuki Yamamoto, Yoshio Hashizume, Makoto Michikawa, Toshimasa Toyooka, Ikuo Tooyama and others. Establishing an Alzheimer's disease biomarker based on

beta-amyloid analysis using postmortem samples, olfactory bulb and nasal mucosa with scrapings. Alzheimer's Association International Conference, 13 July 2013 - 18 July 2013, USA

Nana Mochizuki, Koichi Inoue, Hiroyasu Akatsu, Yoshio Hashizume, Noriyuki Matsukawa, Makoto Michikawa, Ikuo Tooyama, Takayuki Yamamoto, and others. Development of a highly sensitive and selective liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the evaluation of beta-amyloid biomarkers in the olfactory bulb and nasal mucosa. Alzheimer's Association International Conference, 13 July 2013 - 18 July 2013, USA

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称:採取パーツと採取パーツを備える生体組織採取器具

発明者:南條俊文、福原嵩臣、濱中健一、遠山育夫、清水志乃

権利者:パナソニックヘルスケア株式会社

種類:特許

番号:特願 2014-211126

出願年月日:2014年1月24日

国内外の別:国内

名称:生体組織採取器具

発明者:森分優太、篠原紀行、南條俊文、濱中健一、遠山育夫、清水志乃等

権利者:パナソニックヘルスケア株式会社

種類:意匠

番号:意願 2014-002863

出願年月日:2014年2月13日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

鼻腔内検体を用いた認知症診断法に関する臨床研究(1)について

<http://ben.shiga-med.ac.jp/~hqmnrn/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 志乃 (SHIMIZU, Shino)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号:50505592

(2)研究分担者

清水 猛史 (SHIMIZU, Takeshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号:00206202

遠山 育夫 (TOOYAMA, Ikuo)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授
研究者番号：20207533