

## 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25年 6月16日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2012

課題番号：20590594

研究課題名（和文）髄液中の酸化蛋白質のプロテオーム解析によるアルツハイマー病早期診断マーカーの開発

研究課題名（英文）Proteomic investigation of oxidized proteins in cerebrospinal fluid for developing novel biomarkers of Alzheimer's disease.

研究代表者

戸田 年総（TODA TOSIFUSA）

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・研究員

研究者番号：80133635

研究成果の概要（和文）： 二次元電気泳動と質量分析に基づくプロテオーム解析技術を用いて、髄液中の酸化修飾蛋白質の網羅的探索を行った。その結果、アルツハイマー病の患者の髄液中では、それ自体がアミロイド病の原因となる一方で $\beta$ アミロイドとの結合性を有し、 $\beta$ アミロイドのオリゴマー形成を阻害することによりアルツハイマー病の発症に対して抑制的に働いている可能性が示唆されているトランスサイレチンが特に強く酸化を受けていることがわかった。

研究成果の概要（英文）： Proteomic analysis of oxidatively modified proteins was performed on spinal fluid of Alzheimer's disease patients. As a consequence of in-gel digestion and mass spectrometric identification, it has been clarified that transthyretin is preferentially oxidized in spinal fluid of Alzheimer's disease patients. Oxidative modification of transthyretin might be involved in incidence of Alzheimer's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：病態検査医学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病の発症には、脳組織内での $\beta$ アミロイド蛋白質の蓄積とタウタンパク質の高度リン酸化およびPHFの形成が関わっていることが明らかとなり、アルツハイマー病の患者の髄液中で $A\beta$ 1-42の増加と $A\beta$ 1-40の減少、およびリン酸化タウ蛋白

質の増加が見られていたが、より早期に発症のリスクを予知し、的確に予防的措置の開始時期判断し得る新たなバイオマーカーの開発が望まれていた。

(2) 特に高齢者に多いアルツハイマー型認知症においては、発症の要因として酸化ストレスによる神経細胞の傷害が考えられており、

A $\beta$ 42 の増加やリン酸化タウの蓄積にも酸化ストレスが関わっている事を示唆するデータが複数のグループから報告されていたが、蛋白質の酸化を標的にした髄液バイオマーカーの探索は遅れていた。

## 2. 研究の目的

(1) アルツハイマー病およびアルツハイマー型認知症は、高齢者を要介護状態に陥らせる大きな危険要因となっている。これらを発症の初期段階で発見し、予防的な介入を行なうことによって認知機能の低下を防ぐことができるようになれば、家族の負担のみならず介護制度全体への社会的負担を軽減することも可能となる。

(2) アルツハイマー病の発症リスクを高める最大の要因である脳組織内での酸化ストレス状態をモニターし得る髄液中のサロゲートマーカーを探索し、より早期に発症のリスクを予知し、的確な予防措置の開始を判断し得る新たなバイオマーカーを開発する事を目指している。

## 3. 研究の方法

(1) 二次元電気泳動および質量分析に基づく新たな酸化蛋白質のプロテオーム解析技術を開発し、さらにこれを髄液検査に応用するための試料の前処理技術を開発した。

(2) 開発されたプロテオーム解析技術を用いて、アルツハイマー病 (AD) 患者、および軽度認知機能障害 (MCI) 患者の脳脊髄液 (CSF) 中の酸化蛋白質を網羅的に解析した。

(3) カルボニル化については、CyDye-ヒドラジドによる蛍光標識法を用いて定量的な解析を行った。

システインの酸化レベルについては、還元前後でのディファレンシャル蛍光マレイミド標識による解析を行った。

メチオニンの酸化については、質量分析による定量を行った。

## 4. 研究成果

(1) Cy5-ヒドラジドを用いた蛍光標識法による定量的プロテオーム解析を行なった結果、分子量約 14,000、等電点が 5.5 付近の複数のスポットが特に強くカルボニル化を受けていることがわかり、さらにゲル内消化と質量分析による同定を試みた結果、それ自体がアミロイド病の原因となる一方で $\beta$ アミロイドとの結合性を有し、 $\beta$ アミロイドのオリゴマー形成を阻害することによりアルツハイマー病の発症に対して抑制的に働いていることが示唆されているトランスサイレチンであることがわかった。

(2) またトランスサイレチンは、DTT による還元の前後でのディファレンシャル蛍光標識によって、アルツハイマー病患者髄液ではシステインの酸化も亢進している可能性がある事も分かった。

(3) TTR は、それ自体がアミロイド病の原因となる一方でA $\beta$ との結合性を有し、A $\beta$ のオリゴマー形成を阻害することによりADの発症に抑制に働いている可能性が示唆されており、脳脊髄液中のTTRの酸化レベルは、A $\beta$ の重合阻害を介してADの発症および進行速度に影響を及ぼしているものと考えさらに研究を行った。A $\beta$ との結合性部位に近いメチオニン残基に対し、質量分析計を用いてメチオニンの酸化レベルを定量的する技術を開発し、AD患者髄液のTTRの分析に応用した。

(4) メチオニンの酸化は、サンプル調製の過程で起きる人為的反応であると考えられていたが、髄液検体の保存方法および分析の操作を最適化することで、生体内のレドックス状態を反映する値を得る技術を確認し、ADおよび軽度認知症患者髄液中では、トランスサイレチンのメチオニンの酸化レベルが上昇していることを示唆するデータを得た。さらに、試験管内で行ったA $\beta$ 1-40の会合実験で、メチオニン酸化トランスサイレチンでは、A $\beta$ 1-40の会合を阻害する能力が低下していることを示唆する結果が得られた。

(5) また髄液中のトランスサイレチンのメチオニン酸化レベルと認知症の症状の進行速度の関係については、現在患者の経過を追跡中であり、まだ明確なデータが得られていないので、今後さらに長期にわたって経過観察を継続、認知症の症状の進行と髄液中のトランスサイレチンのメチオニン酸化との相関性を明らかにし、新たなバイオマーカーの開発につなげる予定である。

## 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)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, Higami Y. "Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats." *Mech Ageing Dev.*,133(5),255-266, 2012, 査読有 doi: 10.1016/j.mad.2012.02.003.
- ② Kuramitsu Y, Takashima M, Yokoyama Y, Iizuka N, Tamesa T, Akada JK, Wang Y, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K.: "Up-regulation of

- 42 kDa tubulin alpha-6 chain fragment in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus" *Anticancer Res.* 31(10), 3331-3336, 2011, 査読有
- ③ Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Wolfert MA, Wells L, Boons G-J, Hart GW, Endo T, Kawakami H: "Morphological changes in diabetic kidney are associated with increased O-GlcNAcylation of cytoskeletal proteins including alpha-actinin 4" *Clin Proteomics.* 8(15), 1-16, 2011, 査読有  
doi: 10.1186/1559-0275-8-15.
- ④ Shimura K, Tamura M, Toda T, Yazawa S, Kassai K: "Quantitative evaluation of lectin-reactive glycoforms of alpha1-acid glycoprotein using lectin affinity capillary electrophoresis with fluorescence detection" *Electrophoresis*, 32(16), 2188-2193, 2011, 査読有  
doi: 10.1002/elps.201100146
- ⑤ Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yamaguchi T, Toda T, Endo T, Tsubuki M., Yanoshita R.: "Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva" *Biol. Pharm. Bull.*, 34(1), 13-23, 2011, 査読有
- ⑥ Akama K, Horikoshi T, Nakayama T, Otsu M, Imaizumi N, Nakamura M, Toda T, Inuma M, Hirano H, Kondo Y, Suzuki Y, Inoue N.: "proteomic identification of differentially expressed genes in neural stem cells and neurons differentiated from embryonic stem cells of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) in vitro" *Biochim Biophys Acta.* 1814, 265-276, 2011, 査読有  
doi: 10.1016/j.bbapap.2010.10.009.
- ⑦ Miura Y, Sato Y, Arai Y, Abe Y, Takayama M, Toda T, Hirose N, Endo T.: "Proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians" *Exp Gerontol.* 46, 81-85, 2011, 査読有  
doi: 10.1016/j.exger.2010.10.002.
- ⑧ Toda T, Nakamura M, Morisawa H, Hirota M, Nishigaki R, Yoshimi Y.: "Proteomic approaches to oxidative protein modifications implicated in the mechanism of aging" *Geriatr Gerontol Int*, 10 (Suppl.1), S25-S31, 2010.
- ⑨ Akama K, Horikoshi T, Sugiyama A, Nakahata S, Akitsu A, Niwa N, Intoh A, Kakui Y, Sugaya M, Takei K, Imaizumi N, Sato T, Matsumoto R, Iwahashi H, Kashiwabara SI, Baba T, Nakamura M, Toda T.: "Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme." *Biochim Biophys Acta.* 1804(6), 1272-1284, 2010, 査読有  
doi: 10.1016/j.bbapap.2010.02.004.
- ⑩ Nakamura M, Morisawa H, Imajoh-Ohmi S, Takamura C, Fukuda H, Toda T.: "Proteomic analysis of protein complexes in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by using blue-native gel electrophoresis: An increase in lamin A/C associated with heat shock protein 90 in response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress" *Exp. Gerontol.* 44(6-7), 375-382, 2009, 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.009>,
- ⑪ Toda T, Nakamura M, Yamada M, Nishine T, Torii T, Ikenaka K, Mori M.: "Glycoproteomic analysis of abnormal N-glycosylation on the kappa chain of cryocrytoglobulin in a patient of multiple myeloma" *J. Electrophoresis* 53. 1-6, 2009, 査読有  
<http://dx.doi.org/10.2198/jelectroph.53.7>
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 中村 愛, 森澤 拓, 戸田年総 「酸化ストレス負荷における SH-SY5Y 細胞のブルーネイティブ二次元電気泳動によるプロテオーム解析 (II)」日本ヒトプロテオーム機構 第 7 回大会、2009 年 7 月 27-28 日、東京
- ② 森澤 拓, 中村 愛, 廣田三佳子, 戸田年総 「質量分析データビューワーの改良 -- プロテオーム研究情報管理のために --」日本ヒトプロテオーム機構 第 7 回会、2009 年 7 月 27-28 日、東京
- ③ Tosifusa Toda, Megumi Nakamura, Futoshi shibasaki, Toshihiro Yoshizawa "Proteome Analysis of Carbonyl Proteins in Cerebrospinal Fluid by Cy5-Hydrazide Labeling": HUP0 8th Annual World Congress 2009 年 9 月 26-30、Tronto、Canada
- ④ 今泉紀明, 堀越朋恵, 中山 孝, 大津昌弘, 赤間邦子, 中村 愛, 戸田年総, 近藤 靖, 鈴木 豊, 井上順雄 「Neural Stem Sphere 法を用いたサル ES 細胞から神経幹細胞への分化過程における発現量変

- 化解析」第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21-24 日、神戸
- ⑤赤間邦子、堀越朋恵、中山 孝、大津昌弘、今泉紀明、中村 愛、戸田年総、近藤 靖、鈴木 豊、井上順雄「Neural stem sphere 法によるサルの初期神経発生のプロテオーム解析」第 53 回日本神経化学会大会、2010 年 9 月 2-4 日、神戸
- ⑥戸田年総、中村 愛「酸化ストレスによるラミンのリン酸化と分子シャペロン複合体形成のプロテオーム解析」日本電気泳動学会第 62 回総会、2010 年 9 月 18-19 日、札幌
- ⑦戸田年総、岩本真知子、森澤 拓、吉澤利弘、芝崎 太「脳脊髄液タンパク質の酸化還元状態の多角プロテオーム解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会連合大会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- ⑧三浦ゆり、新井康通、戸田年総、広瀬信義、遠藤玉夫「プロテオーム解析による健康長寿マーカーの探索 ---日本人超百寿者血漿の網羅的解析---」日本基礎老化学会第 34 回大会、2011 年 6 月 15-17 日、東京
- ⑨森澤 拓、廣田三佳子、岩本真知子、戸田年総「プロテオミクス用研究情報管理システムにおける電気泳動画像データ、質量分析データの表示、再解析機能の開発」日本ヒトプロテオーム機構第 9 回大会(日本プロテオーム学会 2011 年会)、2011 年 7 月 28-29 日、新潟
- ⑩三浦ゆり、新井康通、戸田年総、広瀬 信義、遠藤 玉夫「日本人超百寿者血漿タンパク質のプロテオミクス」日本ヒトプロテオーム機構第 9 回大会(日本プロテオーム学会 2011 年会)、2011 年 7 月 28-29 日、新潟
- ⑪戸田年総、岩本真知子、森澤拓、中家修一、尾島典行「メチオニンスルホキンドペプチドを標的としたフォーカストプロテオミクスによる細胞内酸化ストレス動態の網羅的解析」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、京都
- ⑫戸田年総、岩本真知子、森澤拓、中家修一、尾島典行「二次元電気泳動分離スポットの質量分析による酸化メチオンレベルの定量〜タンパク質酸化修飾指標としての有用性について〜」第 62 回日本電気泳動学会、2011 年 11 月 12-13 日、横浜
- ⑬森澤 拓、廣田三佳子、岩本真知子、三浦ゆり、戸田年総「質量分析データリポジトリの開発」第 10 回 JHUP0 日本プロテオーム学会、2012 年 7 月 26-27 日、東京
- ⑭Kuniko Akama1, Tomoe Horikoshi, Takashi Nakayama, Masahiro Otsu, Noriaki Imaizumi, Megumi Nakamura, Tosifusa Toda, Michiko Inuma, Hisashi Hirano,

Yasushi Kondo, Yutaka Suzuki, Nobuo Inoue 「Proteomic identification of differentially expressed genes during differentiation of cynomolgus monkey embryonic stem cells to astrocyte progenitor cells in vitro」  
HUP0 11th Annual World Congress  
2012 年 9 月 9-13 日、ボストン、米国

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸田 年総 (TODA TOSIFUSA)  
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・研究員  
研究者番号: 80133635

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号:

### (3) 連携研究者

中村 愛 (NAKAMURA MAGUMI)  
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・研究助手  
研究者番号: 10159072

芝崎 太 (SHIBASAKI FUTOSHI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員  
研究者番号: 90300954