

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：93902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500431

研究課題名(和文) ヒトサンプルでのアンギオテンシン変換酵素とアルツハイマー病の関連性に関する研究

研究課題名(英文) A study for the correlation between Alzheimer's disease and angiotensin converting enzyme in human samples

研究代表者

赤津 裕康 (Akatsu, Hiroyasu)

医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所・長寿医学研究所・その他

研究者番号：00399734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アンギオテンシン変換酵素(ACE)がA₁₋₄₂をA₁₋₄₀に切断する事をヒト、マウスで明らかにした。ACEには遺伝子多型(Isoleucine; I/Aspartic acid; D)が存在しI typeが発症リスクとされている。神経病理診断を行った488例でACE I/D多型とAlzheimer病(AD)との関連を検討した。165例がADと診断されACE多型はAD群DD 25(15%) / ID 73(44%) / II 67(41%)に対しnon AD 群がDD 42(13%) / ID 141(44%) / II 140(43%)となりカイ二乗検定では統計的有意差はなかった。

研究成果の概要(英文)：We revealed it with the mouse and human that amyloid (A₁₋₄₂) could be converted to A₁₋₄₀ with angiotensin converting enzyme (ACE). The ACE has genetic I(Isoleucine)/D(Aspartic acid) polymorphism that reported that I type holders have the risk of Alzheimer's disease (AD).

In this research, we analyzed I/D polymorphism with 488 cases. The 165 cases have been diagnosed with AD. The analysis of ACE polymorphism, AD group were that DD type was 25 (15%) / ID 73 (44%) / II 67 (41%) and non AD group was DD 42 (13%) / ID 141 (44%) / II. This results did not have statistical significant with Chi-square test. Even focused on apoE negative group, group, the ratio of I/D polymorphism in 84 AD cases was DD 16 (19%) / ID 31 (37%) / II 37 (44%) and no tendency of statistical significant was observed. Unfortunately, with in this study period, we could not get positive findings including the gene analysis. Brain and blood sampling are in progress, we will continue further research.

研究分野：老年内科学

キーワード：アンギオテンシン変換酵素 アルツハイマー病 アミロイド 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

AD は神経病理学的に神経原線維変化と Amyloid 1-42 を主成分とする老人斑が脳内に形成されることで発症すると考えられ、A β は secretase によりアミロイド前駆体 (APP) から切り出される A β 1-42 残基のペプチド (A β 1-42) は特にオリゴマーを形成し神経毒性があると考えられている(1)。この A β 1-42 の生成と分解のバランスが AD 発症の鍵になる可能性があり、A β を分解するネプリライシン(2)をはじめさまざまな酵素が注目されている。特に我々は A β 1-42 の C 末 2 残基を切断し可溶性 A β 1-40 を生成する酵素がアンギオテンシン変換酵素 (ACE) であることを発見し報告し(3)AD 患者脳では ACE 濃度と活性が低下していることも見出した。

2. 研究の目的

ACE はアンギオテンシン I を II に変換し体内の血圧調整に重要な役割を果たし、その酵素阻害薬は広く降圧剤として使用されている。この遺伝子には酵素量および活性に影響を及ぼす多型 (insertion/deletion (I/D) polymorphism) が存在し、それが高血圧のリスク因子であるとの報告もある(4)。ACE 活性は加齢で低下すると報告されている(5)。既に我々は 600 例を超す、患者及びボランティアの血液を用いて ACE 活性測定を行い採血時 81 歳以上の症例での ACE 活性が AD 症例で有意に高活性であった(6)。解剖症例全体での解析では AD 病変に他の脳内合併症を伴う症例の発症年齢は高齢であり(7) ACE との関連性を検討する必要がある。ACE 遺伝子多型と AD に関する報告は散見されるが、病理所見と ACE との関係を検証した報告は皆無であったためこの検討から開始した。

3. 研究の方法

すでに構築された福祉村ブレインバンクの固定脳、凍結脳を用いて

- 1) ACE, ApoE 遺伝子型に基づいた病理確定 AD/CAA 症例の病理・臨床像との関連性の解析、
- 2) ACE 遺伝子型 I/D と脳内酵素活性、蛋白・遺伝子発現量と分布の解析、
- 3) 老人斑と血管病変分布に関し抗 A β フラグメント抗体を用いて詳細に検討すべく体制を整えた。

・福祉村ブレインバンクを用いて

福祉村ブレインバンクは AD を中心として多数のヒト剖検脳サンプル (平成 23 年 10 月現在 524 例) を保有している。ACE 遺伝子は insertion/deletion (I/D) polymorphism を intron 16 に保有しており血清 ACE 量にそれが影響している事が報告されている(8)。

ApoE、および ACE I/D 遺伝子多型解析は凍結組織から遺伝子抽出を行い既報から目的領域の primer で遺伝子増幅後に制限酵素切断、電気泳動にて切断断片長比較により遺伝子型を決定した。

ゲノム DNA 精製：剖検時サンプリングしたヒト脳組織 10mg を MFX-2000 (ToYoBo) システムを使用して、ゲノム DNA を精製した。

・ACE I/D 遺伝子多型解析

European Respiratory Journal 2006; 28: 1085-1090 に準じて行った。

PCR：下記の 2 セットのプライマーを使用して PCR を行った。

SET1: ACE SNP1-for 5' -TGG AGA GCC ACT CCC ATC CTT TCT-3' ACE SNP1-rev 5' -GAC GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'

SET2: ACE SNP2-for 5' -TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3' ACE SNP2-rev 5' -TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'

PCR 後、2% Agarose にてバンド確認また ACE ハプロタイプと AD の関連報告もある (Hum

Mol Genet 2003;12:859-67.)以降数々の報告が出ているがCAA病変に注目した解析はない。我々のブレインバンク症例を用いてACE I/D 遺伝子型解析を順次行った。

・ApoE 多型解析

The Lancet 1991; Vol1337: No8750 May 11 1158-1159の方法に従った。

PCR: 下記のセットのプライマーを使用してPCRを行う

SET: human ApoE-for 5' -TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA-3' human ApoE-rev 5' -A CA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A-3'

PCR後、PCR productをHhaIの制限酵素で処理後10%アクリルアミドゲルにて確認した。

・臨床血液サンプルを用いて

(入院・外来患者の)血液・髄液を採取した症例の血球成分よりACE遺伝子型を脳組織同様に解析をすすめている。ACE活性および抗原定量もACE活性測定キット, ACE ELISA kitを用いて行っている。A 1-40, 42量の解析も行いACE結果と比較検討を行っているが現在解析の途中であり今後のその結果をまとめていく。

4. 研究成果

剖検脳を用いた解析

- (1) 死亡時平均年齢 83.3 ± 8.7 で男性220例、女性268例であった。
- (2) Non AD およびCVD症例の男女比はほぼ1:1であったが、AD症例が1:2となり女性の比率が高かった。
- (3) 165例がADと診断された。全体的なACE多型ではAD群DD 25(15%)/ID 73(44%)/II 67(41%)に対しnon AD群がDD 42(13%)/ID 141(44%)/II 140(43%)であり、カイ二乗検定では統計的な有意差はなかった。
- (4) ApoE4-AD群でDD 16(19%)/ID 31(37%)/II 37(44%)となった。AD群、non AD群間においてApoE4-/+別での解析でも有意な傾向は認められなかった。

- (5) 有意差は認めなかったがApoE4-の60歳以下発症AD群のOdds比が高かった。
- (6) 今回のACE遺伝子多型解析においてはアルツハイマー病(AD)のリスクと考えられる統計学的有意結果を得ることはできなかった。
- (7) ApoE4-の60歳以下発症AD群のOdds比が高い傾向にありApoE4-でのI type保持者はADの若年発症リスクになる可能性が示唆され、今後若年発症ADの症例のさらなる解析が必要である。
- (8) リスク因子の可能性については脳内での酵素活性やACE発現量やその分布の検討、血液中でのACEの状況を加味し、さらに検討を加えたい。

今後アミロイドアンギオパチー病理との関連も含めてさらなる検討を進めてく。

血液を用いた解析

症例の血液サンプル収集を終え、 $\times \times$ 例の遺伝子解析、 $\times \times$ 例の活性解析、 $\times \times$ 例の定量解析が終了している。

<引用文献>

- (1) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.
Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Nature. 2002 Apr 4;416(6880):535-9.
- (2) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin.
Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. Science. 2001 May 25;292(5521):1550-2.
- (3) Angiotensin-converting enzyme converts amyloid beta-protein 1-42 (Abeta(1-42)) to Abeta(1-40), and its

inhibition enhances brain Abeta deposition.

Zou K¹, Yamaguchi H, Akatsu H, Sakamoto T, Ko M, Mizoguchi K, Gong JS, Yu W, Yamamoto T, Kosaka K, Yanagisawa K, Michikawa M. *J Neurosci*. 2007 Aug 8;27(32):8628-35.

(4) Interactive Effect of Ethnicity and ACE Insertion/Deletion Polymorphism on Vascular Reactivity.

Gainer JV, Stein CM, Neal T, Vaughan DE, Brown NJ.

Hypertension. 2001 Jan;37(1):46-51.

(5) Age-related decrease in serum angiotensin converting enzyme activity: the role of thyroidal status and food intake.

Mooradian AD¹, Lieberman J. *J Gerontol*. 1990 Jan;45(1):B24-7.

(6) Higher activity of peripheral blood angiotensin-converting enzyme is associated with later-onset of Alzheimer's disease.

Akatsu H, Ogawa N, Kanesaka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, Michikawa M. *J Neurol Sci*. 2011 Jan 15;300(1-2):67-73. doi: 10.1016/j.jns.2010.09.030. Epub 2010 Nov 1.

(7) Multiple findings in elderly adults with confirmed Alzheimer's disease.

Akatsu H, Ogawa N, Kanesaka T, Taniguchi C, Mimuro M, Yoshida M, Matsuyama Z, Kurihara R, Kohashi O, Hori A, Yamamoto T, Hashizume Y.

J Am Geriatr Soc. 2012 Nov;60(11):2169-70.

(8) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.

Rigat B¹, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. *J Clin Invest*.

1990 Oct;86(4):1343-6.

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 6 件)

(1) Kato T, Konishi Y, Shimohama S, Beach TG, Akatsu H, Tooyama I. Alpha1-chimaerin, a Rac1 GTPase-activating protein, is expressed at reduced mRNA levels in the brain of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*. 2015 Feb 9;591C:19-24. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.013. [Epub ahead of print]

(2) Inoue K, Tsuchiya H, Takayama T, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, Matsukawa N, Toyo'oka T. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015 Jan 1;974:24-34. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.10.022. Epub 2014 Oct 27.

(3) Miyashita A, Wen Y, Kitamura N, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Furukawa K, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Morihara T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Yamaguchi H, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Ikeuchi T, Kuwano R. Lack of Genetic Association Between TREM2 and Late-Onset Alzheimer's Disease in a Japanese Population. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(4):1031-1038

(4) Mizoi M, Yoshida M, Saiki R, Waragai M, Uemura K, Akatsu H, Kashiwagi K, Igarashi K. Distinction between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease by CSF amyloid₄₀ and ₄₂, and protein-conjugated acrolein. Clin Chim Acta. 2014 Mar 20;430:150-155.

(5) Omori C, Kaneko M, Nakajima E, Akatsu H, Waragai M, Maeda M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Nakaya T, Taru H, Yamamoto T, Asada T, Hata S, Suzuki T. Increased Levels of Plasma p3-A β 35, a Major Fragment of A β by β -Secretase Cleavage, in Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2014;39(4):861-870.

(6) Inoue K, Hosaka D, Mochizuki N, Akatsu H, Tsutsumiuchi K, Hashizume Y, Matsukawa N, Yamamoto T, Toyooka T. Simultaneous determination of post-translational racemization and isomerization of N-terminal amyloid- β in Alzheimer's brain tissues by covalent chiral derivatized ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal Chem. 2014 Jan 7;86(1):797-804.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)井之上浩一、赤津裕康 他 8 名「質量分析を基盤とする認知症患者病理資料のノンターゲット他変量解析」第 33 回日本認知症学会学術集会、2014 年 11 月 29 日-12 月 1 日、パシフィコ横浜会議センター

(2)赤津裕康、山本孝之、大原弘隆「アルツハイマー病とアンギオテンシン変換酵素遺伝子多型の関連(連続病理解剖症例を用いて)」大 56 回日本老年医学会学術集会、2014 年 6 月 12 日-14 日、福岡国際会議場

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤津 裕康 (AKATSU, Hiroyasu)

医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学
研究所・研究員

研究者番号：00399734