

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293148

研究課題名(和文) エキソソームを用いたアルツハイマー病の早期診断法の開発と予防法の確立

研究課題名(英文) Proteomic profiling of exosomal proteins for the early diagnosis of Alzheimer's disease and prevention of Alzheimer's disease

研究代表者

及川 伸二(OIKAWA, Shinji)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10277006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会の到来によりアルツハイマー病が急増しており、現在、進行が軽度な時期からの治療の開始が重要と考えられている。本研究では三重大学医学部附属病院を受診した軽度のアルツハイマー病患者を対象とし、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法(2D-DIGE法)を用いて、アルツハイマー病患者血漿中で発現量が減少した5種類のタンパク質と増加した2種類のタンパク質を同定した。また、血漿エキソソームを用いたバイオマーカーの探索においては、検診にも応用可能な少量の血液からゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いてエキソソームの回収を行い、タンパク質の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly persons. To facilitate the early diagnosis of AD, we performed protein profiling of blood in patients with mild AD. Plasma and exosomal protein samples from mild AD patients and healthy controls were analyzed using two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) combined with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF/MS) followed by peptide mass fingerprinting. Three down-regulated and two up-regulated proteins were identified. Our results suggest that altered expression levels of these proteins in blood may yield candidate biomarkers for the early diagnosis of AD.

研究分野：予防医学

キーワード：アルツハイマー病 血液 バイオマーカー プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の我が国では、認知症が急増している。最近の疫学研究によれば、アルツハイマー病は認知症全体の60%以上を占め確実に増加している。しかし、アルツハイマー病の根治的治療法は未だ確立されておらず、進行を抑制するためには早期発見による予防的治療が必須である。最近、PET(陽電子放射断層撮影法)などの核医学検査法が開発され、さらに脳脊髄液中タウタンパク質の測定などにより早期発見に一定の成果がみられているが、PET画像検査は高額で脳脊髄液の採取も苦痛を伴うため、スクリーニング的手法としては課題が多い。従って、アルツハイマー病の早期発見のためには、集団検診にも利用可能な血液や尿中のバイオマーカー探索が必須である。

## 2. 研究の目的

本研究ではアルツハイマー病の早期診断のために血液中バイオマーカーに注目した。脳脊髄液は直接中枢神経系と相互作用していることから、脳内の状態を反映していると考えられている。現在までに、脳脊髄液中のアミロイド(A $\beta$ )やリン酸化タウタンパク質がアルツハイマー病の診断バイオマーカーとして有効であることが報告されている。しかし、脳脊髄液の採取は患者に対して侵襲性が高いこと、採取するためにはある程度の技術が必要であること、また採取後しばらくはベッドで安静にする必要があるため一般診療所や検診場所では実施が困難であるといった問題が挙げられる。一方、血液は繰り返し採取できること、安価で低侵襲に採取できることなどの利点があり、また、多くの人を短時間で検査することができる。従って、本研究ではアルツハイマー病の早期診断に利用できる血液バイオマーカー候補タンパク質をプロテオミクス解析によって探索した。

さらに、本研究では、細胞から分泌される40~100nmの膜小胞で、血液などの体液中に存在し細胞間の情報伝達を担っているエクソソームにも注目した。エクソソーム中に含まれるタンパク質やマイクロRNAは、それらを分泌する細胞の種類や生理条件を反映しているため、各種疾病に特有な新規バイオマーカーの探索に非常に有用であると考えられている。本研究では、少量の血液からエクソソームを分離する方法を確立し、エクソソーム中のタンパク質を解析した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 患者

本研究では、三重大学医学部附属病院を受診した患者のうち、アルツハイマー型認知症の病期判定のひとつであるFASTスケールにおいて、ステージ4と診断された軽度アルツハイマー病患者を対象とした。FAST

スケールステージ4の患者の特徴は計画、買い物、金銭管理、服薬管理などが困難になり、社会生活・対人関係では支障があるが、日常生活ではほぼ介助なしで生活できる状態である。また、これらのアルツハイマー病患者に対して認知機能評価試験の一つであるMMSEを実施した。さらに、MRIやSPECTを用いた検査も行った。コントロール群はいなべ総合病院の健康管理センターを健診のために受診した人のうち、認知症やその他の神経疾患がない人を対象とした。

本研究で使用したアルツハイマー病患者のサンプル数は男性2名、女性7名の9名で、その平均年齢は72.7才であり、コントロール群は男性2名、女性8名の10名で、その平均年齢は63.8才である。この研究は各施設での倫理委員会にて承認を取得済みである。

### 3-2. 2D-DIGE法

本研究ではプロテオミクスを用いたタンパク質の定量解析法として、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法(2D-DIGE法)を用いた。2D-DIGE法は、蛍光色素で標識したサンプルと内部標準を同一のゲルで二次元電気泳動を行うことにより、内部標準を用いたゲル間でのマッチングが可能となり、各タンパク質の発現量を正確に定量することができる。アルツハイマー病患者及び健常者の血液から血漿を分離後、アルブミンなどの血液中に高濃度に含まれているタンパク質を除去した。その後、タンパク質を精製し、比較するサンプルをCy3とCy5の蛍光色素で標識した。同時に、各サンプルを等量ずつ混合した後、Cy2の蛍光色素で標識し内部標準とした。Cy3、Cy5で標識した両群1サンプルずつと内部標準を1枚のゲルサンプルとして混合し、等電点電気泳動次いで二次元電気泳動(SDS-PAGE)を行い、血漿中のタンパク質を各スポットとして分離した。各ゲルイメージを画像解析装置Typhoon FLA9500で取得後、統計解析ソフトDeCyderを用いて内部標準を基準に各スポットの発現量を定量解析した。

### 3-3. タンパク質の同定

タンパク質の同定は、CBB染色によって得られた各スポットをゲルから切り出し、トリプシン処理によるゲル内消化を行い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型タンデム質量分析装置MALDI-TOF/TOF-MSとデータベースを用いて行った。

### 3-4. エクソソームの単離

従来のエクソソーム分離法としては、多量の血液を必要とする遠心分離法が用いられてきた。本研究では、ゲル濾過クロマトグラフィー法により検診で採取可能な少量の血液(約1~2ml)からエクソソームを単離する方法を確立した。ゲルろ過クロマトグラフィーによって血漿を各画分に分離

し、その各画分に対しウェスタンブロット法を行うことにより、エキソソームが含まれる画分を分取した。さらに、その分画に対し免疫電子顕微鏡法を用いてエキソソームの存在を確認した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 患者情報

アルツハイマー病で本大学病院を受診した患者のうち問診票および家族からの情報提供により、FAST スケール ステージ 4 の軽度なアルツハイマー病患者を男性 2 名、女性 7 名選別した。これらのアルツハイマー病患者に対して認知機能評価試験の一つである MMSE を実施し、その平均スコアは 21.7 であったことから、認知機能の低下は軽度であることが確認された。さらに、MRI による海馬の萎縮や SPECT による脳血流の低下の検査を行ったところ、これらの所見は軽度のアルツハイマー病の診断を支持していた。一方、本研究で使用したアルツハイマー病患者の平均年齢は 72.7 才であり、コントロール群の平均年齢は 63.8 才であったため、統計学的に平均年齢に有意差が認められた (表 1)。

表 1 患者情報

	AD	Control
FAST scale	4	—
検体数 (男/女)	9 (2/7)	10 (2/8)
平均年齢	72.7 ± 8.5*	63.8 ± 5.3
MMSE scores	21.7 ± 3.4	—

\*p<0.05

##### 4-2. 2D-DIGE による統計解析

2D-DIGE のゲルイメージを図 1 に示す。

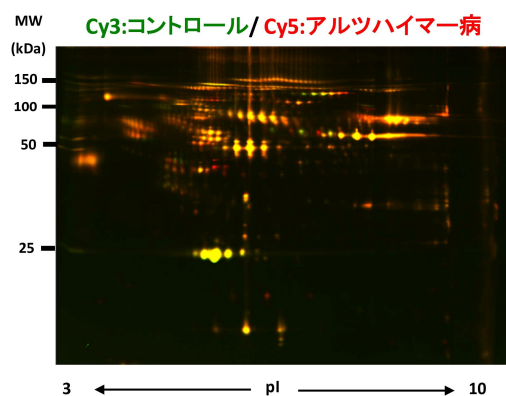


図 1 2D-DIGE のゲルイメージ

図 1 では、コントロールを Cy3、アルツハイマー病患者を Cy5 で標識した時の結果であり、このゲルでは発現量がコントロール

と比較して減少しているスポットは緑色、増加しているスポットは赤色、発現量が変わらないスポットは黄色で表示されている。このようなゲルイメージを各サンプル分 10 枚作成し、内部標準を用いてスポット間のマッチングを行うと共に発現量を解析した。その結果、コントロール群と比較して有意に発現量が減少したスポットは 21 個、有意に発現量が増加したスポットは 10 個検出された。

##### 4-3. 有意差のあったタンパク質の同定

発現量が有意に変化したスポットのうち、図 2 の丸で示した 11 個のスポットに対してタンパク質の同定に成功した。青丸が発現量が減少したスポット、赤丸が発現量が増加したスポットを示す。

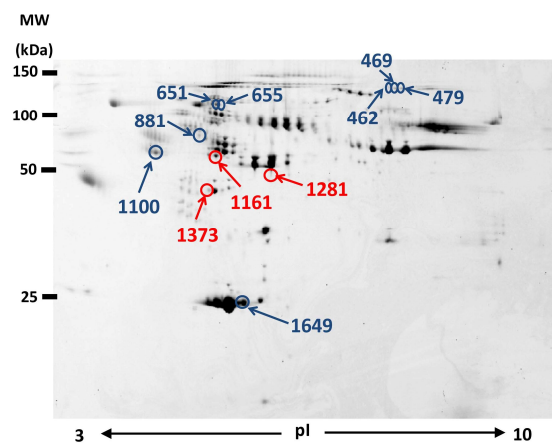


図 2 有意に発現量が変化していたスポット

MALDI-TOF/TOF-MS とデータベースを用いてタンパク質の同定を行った結果を表 2 に示した。

表 2 同定したタンパク質

Spot No.	Protein	Average Ratio (AD/control)	Theoretical Mw (kDa) / pI	Function
462	Plasminogen	0.74	90.7 / 7.0	プラスミンの前駆体
469		0.79		
479		0.82		
651	Afamin	0.78	69.1 / 5.6	ビタミンE結合タンパク質
655		0.76		
881	Kininogen-1	0.87	72.0 / 6.3	キニンの前駆体
1100	$\alpha$ -2-HS-glycoprotein	0.76	39.3 / 5.4	プロテアーゼ阻害因子
1649	Apolipoprotein A-1	0.77	30.8 / 5.6	HDLの構成成分 コレステロールの逆輸送
1161	Fibrinogen gamma chain	1.24	51.5 / 5.4	血液凝固因子
1281		1.23		
1373	Apolipoprotein A-4	1.38	45.4 / 5.3	Chylomicronの形成や 脂質の吸収に関与

発現量が減少したタンパク質としてプラスミンの前駆体である Plasminogen (スポット No. 462, 469, 479)、ビタミン E に結合する Afamin (スポット No. 651, 655)、キニンの前駆体である Kininogen-1 (スポット No. 881)、プロテアーゼ阻害因子である  $\alpha$ -2-HS-glycoprotein (スポット No. 1100)

HDL を構成しコレステロールの逆輸送に関わる Apolipoprotein A-1 (スポット No. 1649) を同定した。また、発現量が増加したタンパク質として血液凝固因子である Fibrinogen gamma chain (スポット No. 1161, 1281) とカイロミクロンを構成し脂質の吸収に関わる Apolipoprotein A-4 (スポット No. 1373) を同定した。Average Ratio はコントロール群に対してアルツハイマー病患者群で発現量が何倍変化しているかを示しており、同定したタンパク質の中では Plasminogen の発現量比が最も減少し、Apolipoprotein A-4 の発現量比が最も増加していた。

本研究では、アルツハイマー病患者群とコントロール群の平均年齢に有意差が認められたため、重回帰分析を用いて発現量の変動に対する年齢の影響を検討した。その結果、Plasminogen はいずれのスポット (スポット No. 462, 469, 479) においても年齢の影響を受けていた。Afamin は、スポット No. 651 は年齢の影響を受けておらず、スポット No. 655 は年齢の影響を受けていた。Kininogen-1 の発現量も年齢の影響を受けていたことが示唆された。また、 $\alpha$ -2-HS-glycoprotein と Apolipoprotein A-1 の発現量は年齢の影響を受けておらず、疾患の有無によって発現量が変化していると考えられる。Fibrinogen gamma chain は年齢の影響を受けていないスポット (スポット No. 1281) と影響を受けているスポット (スポット No. 1161) があり、Apolipoprotein A-4 の発現量は年齢の影響を受けていなかった。

年齢の影響を受けていないタンパク質の各サンプルでの発現量変化を図 3 に示した。

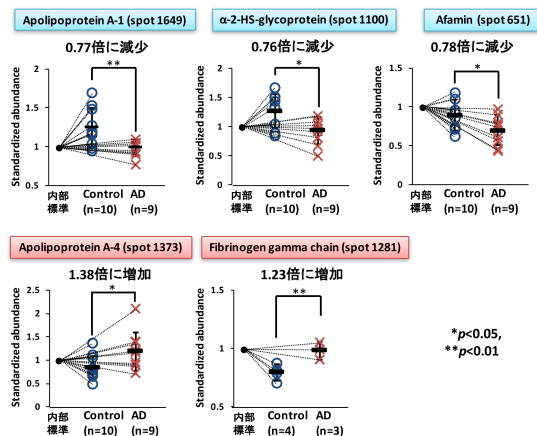


図 3 年齢の影響を受けていないタンパク質の発現量変化

図中の Standardized abundance は内部標準に対する各サンプルの発現量比を示している。各群での平均値は黒い太線で示した。Apolipoprotein A-1、 $\alpha$ -2-HS-glycoprotein、Afamin、

Apolipoprotein A-4 のスポットはすべてのサンプル間で発現が観察された。発現量変化はコントロール群に対してアルツハイマー病患者群で発現量が何倍変化しているかを示しており、例えば Apolipoprotein A-1 ではコントロール群と比較してアルツハイマー病患者群で 0.77 倍減少していた。

#### 4-4. 少量の血液からのエキソソームの単離

血液から血漿を分離し、血漿 700  $\mu$ l をゲルろ過クロマトグラフィーにより 10 画分に分離した。エキソソームの確認は抗 CD9 抗体を用いてウェスタンブロット法によって行った。その結果、画分 2~5 にエキソソームが分離されていることを確認した (図 4A)。また、各画分のタンパク質濃度を測定した結果、画分 2~5 は血漿タンパク質の濃度が低いことが示された。(図 4B)。

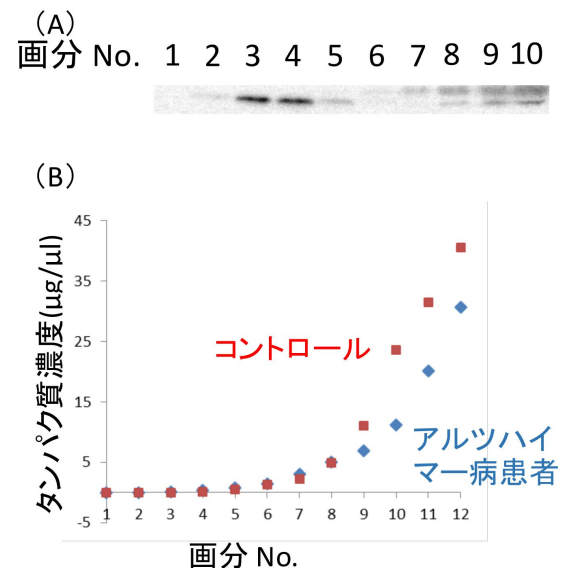


図 4 エキソソームの単離

さらに、画分 3 を抗 CD9 抗体とナノ金コロイドが結合した抗 IgG 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法で観察した。図 5 に示した通

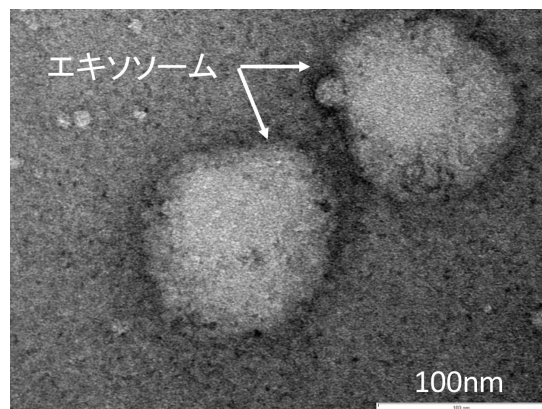


図 5 画分 3 の免疫電子顕微鏡写真

り、金コロイドの結合した小胞が観察されたことから、この小胞は CD9 陽性のエキソソームであることが示唆された。これらの結果から、画分 3 はエキソソームが存在し、かつ血漿タンパク質がほとんど含まれないことが確認された。

アルツハイマー病患者群とコントロール群の各サンプルにおいてウェスタンブロット法によりエキソソームが含まれる画分を特定し、その画分のみを用いて 2-D DIGE 法によりタンパク質の発現量解析を行った。その結果、コントロール群に比べアルツハイマー病患者群で 17 個のタンパク質スポットにおいて発現量が 1.5 倍以上有意に変動していることが明らかとなった。

#### 4-5. 考察

本研究で同定した Apolipoprotein A-1 と -2-HS-glycoprotein は、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中でも減少していることが報告されており、Fibrinogen gamma chain ではアルツハイマー病患者の脳脊髄液中で増加していることが報告されている。また、Afamin は家族性のアルツハイマー病患者で増加していると報告されている。脳脊髄液は脳内の状態を反映しているため、脳脊髄液中と同じ変動を示す血液中のタンパク質はアルツハイマー病の状態をより反映している可能性がある。従って、Apolipoprotein A-1 と -2-HS-glycoprotein、Fibrinogen gamma chain はアルツハイマー病の病態にも関連している可能性が示唆された。

本研究で同定された Apolipoprotein A-1 は A の凝集や蓄積を抑制し、ニューロンの維持に参与すると報告されている。-2-HS-glycoprotein は抗炎症と神経保護効果の役割を持つことが報告されている。Fibrinogen gamma chain はフィブリノーゲンのサブユニットのひとつであり、鎖がジスルフィド結合した状態で存在し、*in vitro* の研究ではフィブリノーゲンと A が相互作用し、フィブリノーゲンの構造が変化し、異常なフィブリン凝塊が形成されると報告されている。以上のように、本研究で同定されたタンパク質は、機能的にもアルツハイマー病と深く関連していると考えられる。

認知症の原因で 2 番目に多いとされる血管性認知症において、血中診断バイオマーカー候補タンパク質が報告されている。しかし、これらの候補タンパク質は、本研究で同定したタンパク質中には含まれていない。従って、本研究で同定したタンパク質は、アルツハイマー病を診断出来る可能性が高いと考えられる。

以上の結果をまとめると、本研究では FAST スケールや画像解析で診断された軽度アルツハイマー病患者の血液を使用して、アルツハイマー病の早期診断に利用できる

血液バイオマーカー候補タンパク質をプロテオミクス解析によって探索した結果、健常者と比較して発現量が減少した 3 種類のタンパク質と増加した 2 種類のタンパク質を同定した。そのうち Apolipoprotein A-1 と -2-HS-glycoprotein、Fibrinogen gamma chain はアルツハイマー病の早期診断バイオマーカーとして利用できる可能性が非常に高いことが明らかとなった。今後は、血液中の候補タンパク質の濃度を直接的により簡便に測定できる ELISA のような方法を用いて、多数の患者からそれらの診断バイオマーカーの有効性を解析する必要がある。

#### 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 13 件・全て査読有り)

1. Kitamura Y, Usami R, Ichihara S, Kida H, Satoh M, Tomimoto H, Murata M, Oikawa S. Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurol Res.* (2017) Mar;39(3):231-238. doi: 10.1080/01616412.2017.1281195. PubMed PMID: 28107809.
2. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. *Genes Environ* 38: 26 (2017) doi: 10.1186/s41021-016-0070-8.
3. Wang S, Ma N, Zhao W, Midorikawa K, Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S, Zhang Z, Huang GW, Murata M. Inflammation-related DNA damage and cancer stem cell markers in nasopharyngeal carcinoma. *Mediators Inflamm* 2016: 9343460 doi: 10.1155/2016/9343460. (2016)
4. Wang S, Mo Y, Midorikawa K, Zhang Z, Huang G, Ma N, Zhao W, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. The potent tumor suppressor miR-497 inhibits cancer phenotypes in nasopharyngeal carcinoma by targeting ANLN and HSPA4L. *Oncotarget.* 6, 35893-35907, 2015.
5. Ohnishi S, Murata M, Ida N, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by metabolites of chloramphenicol, an antibiotic drug. *Free Radic Res.* 49, 1165-1172, 2015.
6. Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, Shah SA, Nakamura S, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Takeuchi K. Circulating microRNAs as novel prognosis biomarkers for head and neck squamous cell

- carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 16, 1042-1046, 2015.
7. Laothong U, Hiraku Y, Oikawa S, Intuyod K, Murata M, Pinlaor S. Melatonin induces apoptosis in cholangiocarcinoma cell lines by activating the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Oncol Rep.* 33, 1443-1449, 2015.
  8. Huang Z, Ichihara S, Oikawa S, Chang J, Zhang L, Hu S, Huang H, Ichihara G. Hippocampal phosphoproteomics of F344 rats exposed to 1-bromopropane. *Toxicol Appl Pharmacol.* 282, 151-160, 2015.
  9. Oikawa S, Kobayashi H, Kitamura Y, Zhu H, Obata K, Minabe Y, Dazortsava M, Ohashi K, Tada-Oikawa S, Takahashi H, Yata K, Murata M, Yamashima T. Proteomic analysis of carbonylated proteins in the monkey substantia nigra after ischemia-reperfusion. *Free Radic Res.* 48, 694-705, 2014.
  10. Wang S, Ma N, Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S, Xie Y, Zhang Z, Huang G, Murata M. Relationships of alpha-SMA-positive fibroblasts and SDF-1-positive tumor cells with neoangiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014: 507353, 2014.
  11. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int J Mol Sci.* 16, 193-217, 2014.
  12. Hirakawa K, Ota K, Hirayama J, Oikawa S, Kawanishi S. Nile blue can photosensitize DNA damage through electron transfer. *Chem Res Toxicol.* 27, 649-655, 2014.
  13. Chang J, Oikawa S, Iwahashi H, Kitagawa E, Takeuchi I, Yuda M, Aoki C, Yamada Y, Ichihara G, Kato M, Ichihara S. Expression of proteins associated with adipocyte lipolysis was significantly changed in the adipose tissues of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat. *Diabetol Metab Syndr.* 27;6(1):8, 2014.

〔学会発表〕(計 4 1 件)

1. 北村祐貴、近藤志織、本城貴志、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二、軽度認知障害の診断バイオマーカーの探索、第 87 回日本衛生学会学術総会、宮崎市、フェニックス・シーガイア・リゾート、2017 年 3 月 26~28 日
2. 北村祐貴、佐々木良元、市原佐保子、埜村智之、石川雅一、水野章、村田真理子、富本秀和、及川伸二、パーキンソン病の血漿中エクソソームのプロテオミクス解析、第 86 回日本衛生学会学

術総会、旭川市、旭川市民文化会館、2016 年 5 月 11~13 日

3. 北村祐貴、本城貴志、山嶋哲盛、及川伸二、早期アルツハイマー病患者の血漿中バイオマーカーの探索、第 24 回海馬と高次脳機能学会、岐阜市、岐阜大学サテライトキャンパス、2015 年 10 月 10~11 日
4. 北村祐貴、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二、プロテオミクス解析を用いた虚血再灌流後のサル黒質におけるカルボニル化タンパク質の同定、日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば市、2014 年 7 月 17~18 日
5. 北村祐貴、宇佐美良子、紙本貴之、木田博隆、佐藤正之、富本秀和、及川伸二、アルツハイマー病患者の血漿中のバイオマーカーの探索、第 23 回海馬と高次脳機能学会、金沢市 湯涌創作の森、2014 年 10 月 11~12 日

〔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

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

及川 伸二 (OIKAWA, Shinji)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10277006

(2)研究分担者

富本 秀和 (TOMIMOTO, Hidekazu)

三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80324648

村田 真理子 (MURATA, Mariko)

三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10171141

山嶋 哲盛 (YAMASHIMA, Tetsumori)

金沢大学・医学系・研究員  
研究者番号：60135077