

令和 元年 5 月 24 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15104

研究課題名(和文) シトルリン化蛋白質を指標としたアルツハイマー病早期臨床検査試薬の開発

研究課題名(英文) Development of early clinical reagents for Alzheimer's disease using citrullinated proteins as index

研究代表者

石神 昭人 (Ishigami, Akihito)

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・研究部長

研究者番号：50270658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者の脳でシトルリン化したアルツハイマー病関連タンパク質を初めて同定した。そして、シトルリン化タンパク質Xを定量化する臨床検査診断薬の開発にも成功した。シトルリン化したアルツハイマー病関連タンパク質を定量化する臨床診断薬として有用な可能性が開けた。今後、アルツハイマー病の早期臨床検査試薬としての有用性を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
アルツハイマー病の早期臨床検査試薬は未だ開発されていない。本研究成果は、アルツハイマー病を診断する臨床診断薬に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We have identified for the first time citrullinated Alzheimer's disease-related proteins in the brains of Alzheimer's disease patients. We also succeeded in developing clinical laboratory diagnostic reagents that quantify it's citrullinated proteins. It has potential to be useful as a clinical diagnostic agent for quantifying citrullinated Alzheimer's disease-related proteins. In the future, we will verify the usefulness as an early clinical diagnostic agent for Alzheimer's disease.

研究分野：老化

キーワード：神経変性疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)患者の脳でタンパク質中の塩基性アミノ酸であるアルギニンが中性アミノ酸であるシトルリンに変換された異常タンパク質(シトルリン化(Cit-)タンパク質と総称)が早期に出現する。また、病状の進行程度(Braak Stage により評価)に応じて Cit-タンパク質の量が増加する。アルギニンをシトルリンに変換する酵素は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)と呼ばれ、脳内の至る所に存在する。しかし、AD ではない脳に Cit-タンパク質は、存在しない。このように、Cit-タンパク質は、AD の発症やその進行に深く関与している。

### 2. 研究の目的

本研究では、Cit-タンパク質を高感度に検出する ELISA(酵素免疫測定法)システム、および Cit-タンパク質に対する自己抗体検出システムを構築し、AD の早期診断を行う臨床検査試薬を開発する。

### 3. 研究の方法

- (1) シトルリン化(Cit-)グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)を高感度に検出する ELISA システムを構築し、AD の早期診断を行う臨床検査試薬を完成させる。
- (2) AD 患者には、シトルリン化された AD 関連タンパク質に対する自己抗体が産生される可能性がある。そのため、Cit-GFAP に対する自己抗体の有無を検出する検査試薬を開発する。
- (3) AD 患者の脳で新規シトルリン化タンパク質を探索する。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト GFAP 組換えタンパク質(rhGFAP)とヒト 2 型 PAD(hPAD2)組換えタンパク質を用いて、Cit-hGFAP を作製した。また、プロテオーム解析により、シトルリン化部位を同定した。そして、抗原として Cit-GFAP をマウスに免疫し、Cit-hGFAP に反応する 8 種類のモノクローナル抗体を得た。免疫沈降を行った結果、8 種類のうち 5 種類のモノクローナル抗体が AD 脳に存在する hGFAP を免疫沈降することがわかった。また、ウエスタンブロット解析により hGFAP とは反応せず、Cit-hGFAP に強く反応すると共に、AD 脳抽出液に反応性を示す抗体 CTGF-1221 を見出した。免疫組織染色により、CTGF-1221 は AD 脳の反応性アストロサイトを染色することがわかった。そして、固相抗体に CTGF-1221、標識抗体に Cit-hGFAP、hGFAP 両方に反応する CTGF-1214R を用いたサンドイッチ ELISA を開発した。
- (2) PAD2 の発現、誘導機構を明らかにするため、ヒトアストロサイト培養細胞(U-251MG 細胞)を用いて、PADs の発現誘導物質を探索した。その結果、細胞膜透過性 cAMP 誘導体である dibutyryl cAMP(dbcAMP)により、PAD2 と PAD3 の発現が顕著に誘導されることを明らかにした。また、PAD2 と PAD3 の発現誘導に伴い、細胞内ではシトルリン化タンパク質が増加した。中枢神経系における PADs の発現機構を明らかにできれば、シトルリン化タンパク質が原因となる AD 発症機序の解明に繋がる可能性がある。
- (3) AD 患者の脳でシトルリン化した AD 関連タンパク質(シトルリン化 X)を初めて同定した。そして、シトルリン化 X を定量化する臨床検査診断薬の開発に成功した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Kim SE, Park JW, Kim MJ, Jang B, Jeon YC, Kim HJ, Ishigami A, Kim HS, Suk KT, Kim DJ, Park CK, Choi EK, Jang MK. : Accumulation of citrullinated glial fibrillary acidic protein in a mouse model of bile duct ligation-induced hepatic fibrosis. *PLoS One*. 2018 Aug 2;13(8):e0201744. doi: 10.1371/journal.pone.0201744
2. Masutomi H, Kawashima S, Kondo Y, Uchida Y, Jang B, Choi EK, Kim YS, Shimokado K, Ishigami A. : Induction of peptidylarginine deiminase 2 and 3 by dibutyryl cAMP via cAMP-PKA signaling in human astrocytoma U-251MG cells. *J Neurosci Res*. 2017 Jul;95(7):1503-1512. doi: 10.1002/jnr.23959
3. Umeda N, Matsumoto I, Tanaka Y, Kawaguchi H, Ebe H, Kagami Y, Ishigami A, Sumida T. : Anti-cyclic citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide -7 (CCG-7) antibodies were suppressed by biologics treatment and deposited to citrullinated proteins in CD68-positive cells in the RA synovium. *Mod Rheumatol*. 2017 Jan 4:1-7. doi: 10.1080/14397595.2016.1270388
4. Nakabo S, Hashimoto M, Ito S, Furu M, Ito H, Fujii T, Yoshifuji H, Imura Y, Nakashima R, Murakami K, Kuramoto N, Tanaka M, Satoh J, Ishigami A, Morita S, Mimori T, Ohmura K. : Carbamylated albumin is one of the target antigens of anti-carbamylated protein antibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2017 Jul 1;56(7):1217-1226.

- doi: 10.1093/rheumatology/kex088
5. Sase T, Arito M, Onodera H, Omoteyama K, Kurokawa MS, Kagami Y, Ishigami A, Tanaka Y, Kato T. : Hypoxia-induced production of peptidylarginine deiminases and citrullinated proteins in malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 1;482(1):50-56.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.154
  6. Jang B, Ishigami A, Kim YS, Choi EK. : The Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Cl-Amidine Suppresses Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Dendritic Cells. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 27;18(11). pii: E2258.  
doi: 10.3390/ijms18112258
  7. Umeda N, Matsumoto I, Kawaguchi H, Kurashima Y, Kondo Y, Tsuboi H, Ogishima H, Suzuki T, Kagami Y, Sakyu T, Ishigami A, Maruyama N, Sumida T. : Prevalence of soluble peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) and anti-PAD4 antibodies in autoimmune diseases. *Clin Rheumatol*. 2016 May;35(5):1181-8.  
doi: 10.1007/s10067-015-3082-z
  8. Wizeman JW, Nicholas AP, Ishigami A, Mohan R. : Citrullination of glial intermediate filaments is an early response in retinal injury. *Mol Vis*. 2016 Sep 26;22:1137-1155.
  9. Ishigami A, Masutomi, H., Handa, S., Nakamura, M., Nakaya, S., Uchida, Y., Saito, Y., Murayama, S., Jang, B., Jeon, Y.C., Choi, E.K., Kim, Y.S., Kasahara, Y., Maruyama, N., Toda, T. : Mass spectrometric identification of citrullination sites and immunohistochemical detection of citrullinated glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci. Res*. 93 1664-1674 (2015)  
doi: 10.1002/jnr.23620
  10. Ishigami A, Masutomi, H., Handa, S., Maruyama, N. : Age-associated decrease of senescence marker protein-30/gluconolactonase in individual mouse liver cells: Immunohistochemistry and immunofluorescence. *Geriatr. Gerontol. Int*. 15 804-810 (2015)  
doi: 10.1111/ggi.12347
  11. 石神昭人 : アルツハイマー病とシトルリン化蛋白質 . 医学のあゆみ 255 889-893 (2015)

[学会発表](計 10 件)

1. 近藤嘉高、石神昭人 : アルツハイマー病診断薬の開発. TOBIRA 第 6 回研究交流フォーラム, ソラシティカンファレンスセンター内ソラシティホール, 東京, 2017.5.12
2. 成田昂平、近藤嘉高、野田義博、町田修一、吉田雅幸、石神昭人 : Peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in mouse skeletal muscle. 日本基礎老化学会第 40 回大会, 名古屋国際会議場, 名古屋, 2017.6.14-16
3. Ishigami A : Abnormal protein citrullination in Alzheimer's disease. 11th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC11) INVITED SYMPOSIUM: A-8 Cognitive Science, Phuket Graceland Resort and Spa, Phuket, Thailand, 2016.5.23-27
4. Ishigami A : Citrullinated glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's diseased brains. 2016 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology and the 15th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Hotel Laonzena, Convention Hall, Daegu, Korea, 2016.6.15-17
5. 天野晶子、近藤嘉高、石神昭人 : シトルリン化タンパク質を検出する臨床検査試薬の開発. TOBIRA 第 5 回研究交流フォーラム, ソラシティカンファレンスセンター内ソラシティホール, 東京, 2016.5.23
6. Masutomi, H., Kawashima, S., Shimokado, K., Ishigami A : Dibutyryl-cAMP induced PAD expressions via PKA pathway in human astrocytoma U-251MG cells. 第 39 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜, 神奈川, 2016.7.20-22
7. Ishigami A : Abnormal accumulation of citrullinated proteins in Alzheimer's disease. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 "Healthy aging brain", ASEAN Institute for Health Development, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, Thailand, 2015.10.16
8. Ishigami A : Abnormal protein citrullination in Alzheimer's disease. The 10th IAGG Asia/Oceania Regional Congress (IAGG 2015), Chiang Mai, Thailand, 2015.10.19-22
9. Kagami, Y. Masutomi, H., Choi, E.K., Kim, Y.S., Maruyama, N., Ishigami A : Detection of citrullinated proteins in the postmortem brain from wild-type and PAD2-knockout mice using newly developed anti-modified citrulline monoclonal antibodies. The 10th IAGG Asia/Oceania Regional Congress (IAGG 2015), Chiang Mai, Thailand, 2015.10.19-22
10. 増富裕文、下門顕太郎、石神昭人 : ヒトアストロサイトーマ細胞株 U-251MG 細胞での cAMP による PADs 誘導、及びシトルリン化タンパク質の増加. 第 38 回日本基礎老化学会大会, 横浜, 2015. 6. 12-14

[図書](計 1 件)

1. Kondo, Y., Choi, E.K., Kim, Y.S., Ishigami A : Update on Deimination in Alzheimer's Disease. In: Protein Deimination in Human Health and Disease. Nicholas, A., Bhattacharya, S.,

Thompson, P. R. (Eds), Springer, pp.293-315 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.aging-regulation.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。