

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02725

研究課題名(和文) ヒト脳内での2段階にわたるアミロイド蓄積の機序の解明

研究課題名(英文) Study of two-step amyloid-beta accumulation in human brains

研究代表者

篠原 充 (Shinohara, Mitsuru)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・分子基盤研究部・室長

研究者番号：60800521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：全長型A β やN末端が短いA β 測定のためのELISA、超高感度ELISAを導入、開発するとともに、疾患段階の異なるヒト剖検脳の複数の脳領域について各種A β の測定を行った。各種神経炎症マーカー測定とともに、タウの蓄積を精度よく捉えるELISAの開発を行い、各疾患段階、各脳領域でのタウの蓄積を測定し、学術誌に報告した(Shinohara et al., J Neuropathol & Exp Neurol 2021)。さらに網羅的遺伝子発現解析を行い、各種A β やタウに相関する遺伝子、パスウェイを同定した(未発表)。それらの関与を検証する研究を引き続き行っている。

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原因とされるA β やタウがヒト脳内で蓄積するメカニズムは未だ不明である。一方でそれらの病的蛋白が蓄積する脳領域には特徴があるとともに、A β 分子種によってその領域的な特徴は異なっており、蓄積を理解するヒントになる。本研究における成果によって、脳内でどのようにそれらの病的蛋白が蓄積するのか分子的な機序を理解する基盤につながると考えられる。引き続き研究を進め、脳内で全長型A β や断片化A β がなぜ蓄積し、どのようにタウの蓄積と結びつくのかを明らかにし、治療薬や予防薬の開発に役立てたいと考える。

研究成果の概要(英文)：By introducing and developing conventional ELISAs as well as ultra-sensitive ELISAs for full-length A β and N-terminal truncated A β , we have analyzed multiple brain regions of human autopsy brain with different disease stages. In addition to measuring various neuroinflammation markers, we also have measured tau accumulation in each disease stage and each brain region by developing ELISAs that accurately captures tau accumulation, and reported it in an academic journal (Shinohara et al., J Neuropathol & Exp Neurol 2021). Furthermore, comprehensive gene expression analysis was performed to identify genes and pathways that correlate with various A β and tau (unpublished data). We are continuing research to verify the involvement of these genes and pathways in A β and tau accumulation.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：アルツハイマー病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の原因とされる A β やタウが「なぜ」、「どのように」ヒト脳内で蓄積するのか十分には分かっていない。A β やタウは脳内において特徴的な領域分布をとることが知られており、それは病態のみならず病因を理解する上でも重要な手がかりを与えることがこれまでの研究から報告されている。我々は独自に剖検脳の多数の領域を解析することで、A β の蓄積の病態病因について、いくつもの新規知見を見出し報告してきた。中でも全長型 A β と N 末端の断片化した A β の領域分布が異なっており、そのことはそれらの蓄積が異なる病因によってもたらされていると考え、提唱した (Shinohara et al., Brain 2017)。本研究はそのようなこれまでの国内外の研究状況や我々の独自の知見を基に着想するに至った。

2. 研究の目的

全長型 A β と N 末端の断片化した A β が「なぜ」、「どのように」ヒト脳内で蓄積し、タウの蓄積と結びつくのかの分子的な詳細について理解することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 剖検脳、臨床検体の入手、解析

国内のブレインバンクよりヒト剖検脳を入手する。同一被験者由来の多数の領域を対象に、各領域での各種 A β やタウの蓄積量を定量するとともに、神経変性や炎症などの疾患に関連するマーカーの解析を行う。さらにマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、領域横断的な遺伝子ネットワークを構築し、各種 A β やタウなどの病態マーカーと関連する遺伝子を探索する。また血液や髄液などの解析も併せて行う。

(2) 測定系の導入、確立

全長型 A β や N 末端が断片化した A β を特異的に測定するための ELISA、超高感度 ELISA を導入、開発する。またタウも含めて、各種神経変性マーカーや炎症などの疾患に関連するマーカーを測定する ELISA を導入、開発するとともに、これまでの我々自身や国内外の研究から A β の代謝やアルツハイマー病態への関与が予想される候補分子についての ELISA 測定系を導入、開発する。

(3) 実験モデルでの確認、検証

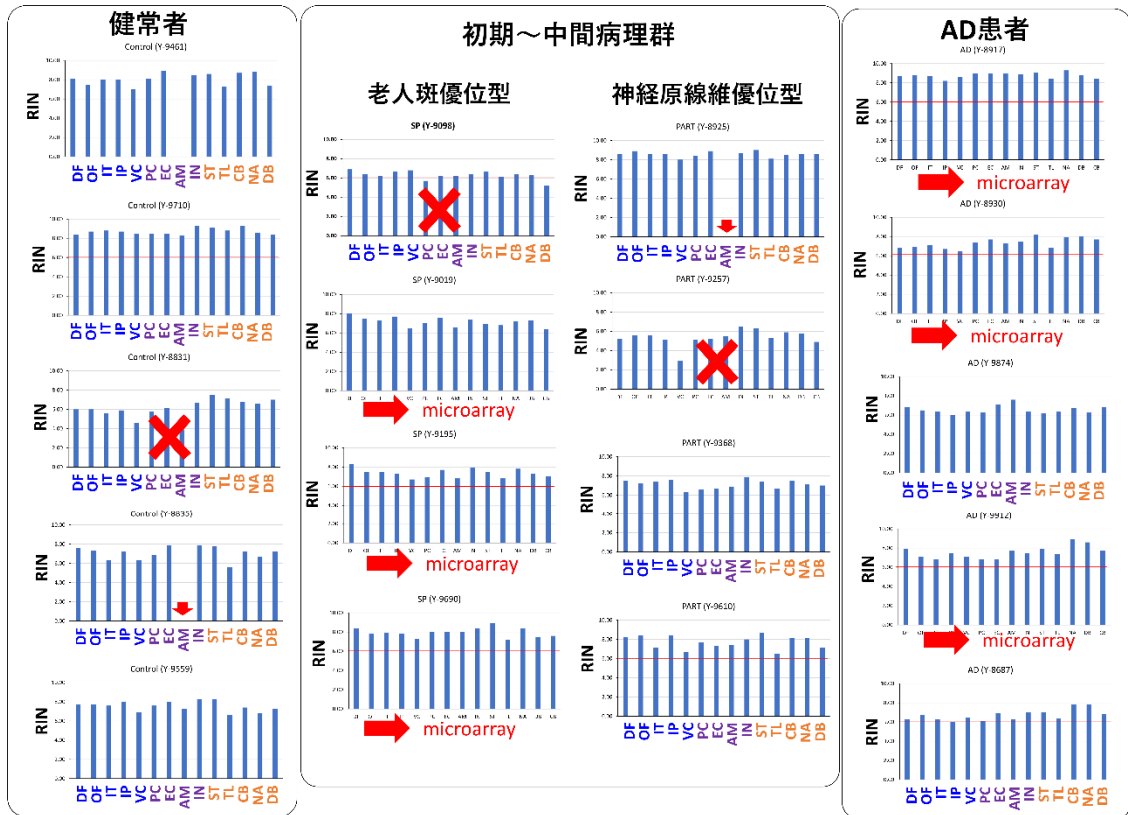
構築した仮説を検証するために、培養細胞実験、in vivo マイクロダイアリススを用いた動物モデル解析、新規結合因子の同定、独自の ex vivo 分解系の導入などを通じて、明らかにする

4. 研究成果

(1) 剖検脳、臨床検体の入手、解析

- 東京都健康長寿医療センターから凍結脳検体 (合計 18 名、14 か所の脳領域) を入手し、全脳領域で各種 A β やタウの蓄積量を定量するとともに、神経変性や炎症などの疾患に関連するマーカーを解析した。また RNA integrity (RIN) の保たれている 6 名を選択し (図

1) 8か所の領域に対してマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。



新皮質領域	辺縁系領域	基底核・皮質下領域
背外側前頭前野 (DF)	後帯状皮質 (PC)	線条体 (尾状核, ST)
眼窩前頭皮質 (OF)	嗅内皮質 (EC)	視床 (TL)
下側頭回 (IT)	扁桃体 (AM)	小脳 (CB)
下頭頂小葉 (IP)	島回 (IN)	ブローカ対角帯 (DB)
一次視覚野 (VC)		側坐核 (NA)

図1. 剖検脳の多数の領域を対象とした RNA integrity (RIN) の評価

さらに生命情報学的解析を取り入れ、全長型 A β や断片化 A β の特徴的な領域分布と関連する遺伝子、経路を同定した。

- 福祉村病院ブレインバンクより、剖検脳 (合計 18 名、3 か所の脳領域) と同一被験者由来の血液、髄液を入手した。各種 A β やタウを定量するとともに、神経変性や炎症などの疾患に関連するマーカーを解析した。

(2) 測定系の導入、確立

- 全長型 A β や N 末端が短い A β 測定のための ELISA、超高感度 ELISA を導入、開発するとともに、疾患段階の異なるヒト剖検脳の複数の脳領域について各種 A β の測定を行った。超高感度 ELISA については、従来の ELISA に比べて 100 倍程度の感度が高い ELISA を立ち上げることが出来た。本研究にて導入できた ELISA を用いて、動物モデルでの A β 測定を行い、報告している (Shinohara et al., FASEB J 2020, Shinohara et al., FASEB BioAdvances 2021)。
- タウの蓄積を評価する ELISA を構築するために、複数の ELISA を導入、比較したところ、中間部位から C 末端部位を認識する抗体を組み合わせた ELISA がアルツハイマー病脳で蓄積しているタウを最も的確に定量評価できることが判明した。また 14 か所の脳領域でタウの量を測定すると、Braak ステージで定義される、病態初期には一部の辺縁系 (7) にのみ

限局した広がりを示すなどと一致することも分かった(図2)。この結果を学術誌に報告した。(Shinohara et al., J Neuropathol & Exp Neurol 2021)。

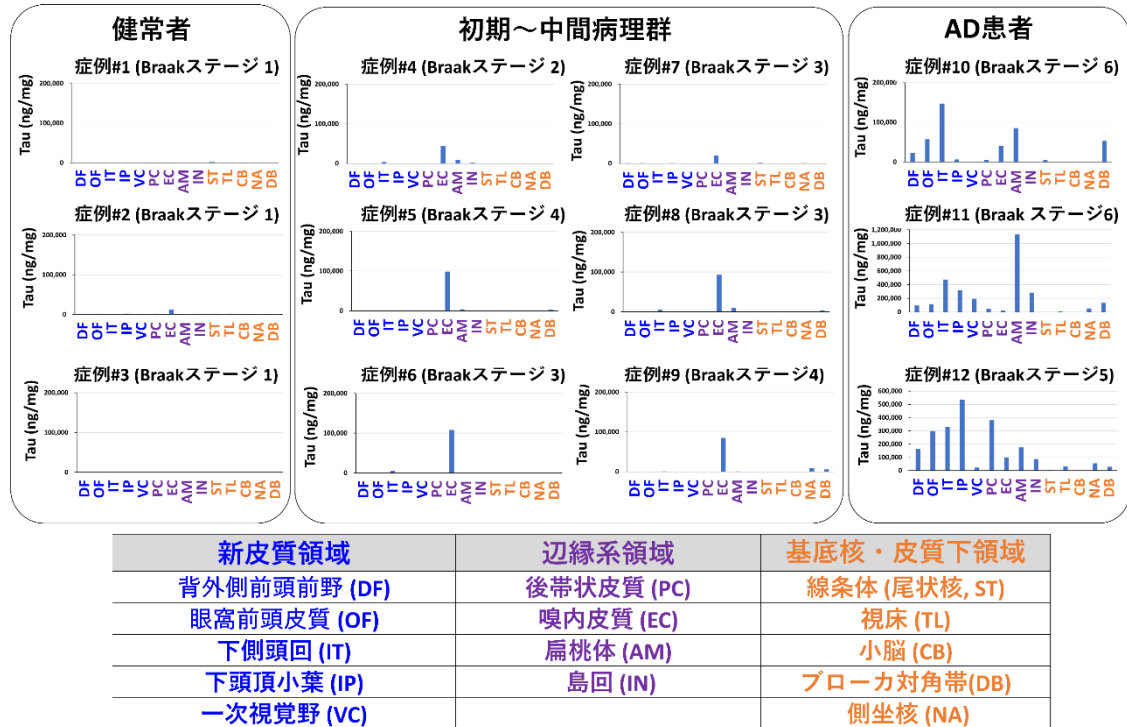


図2 . 開発した ELISA による、脳内でのタウ蓄積の広がりの評価

- A の代謝やアルツハイマー病態への関与が予想されるいくつかの候補分子についての ELISA を開発した。

(3) 実験モデルでの検証

- 剖検脳の多数の領域を対象とした網羅的遺伝子発現解析により、全長型 A や断片化 A やタウの特徴的な領域分布と相関する遺伝子、経路を同定した。特に、全長型 A はシナプス関連の遺伝子と多く相関しており、そのことは我々の以前の研究結果(Shinohara et al., Acta Neuropathologica 2013, Shinohara et al., Brain 2014)を裏付けるものと考えているが、さらに別の遺伝子、経路も相関していることも判明した。また断片化 A やタウについては、別の遺伝子群が相関していることも判明した。同定した遺伝子、経路が各種 A やタウの蓄積の鍵となっているのではと考えており、それらの関与を検証する研究を、in vivo マイクロダイアリシスや、培養細胞系、タウ伝搬モデルなどを導入し、進めようとしている。
- APP マウスの脳からの抽出液を、抗 A 抗体で免疫沈降(IP)して、A に結合する因子を同定することを試みた。条件検討を重ねた結果、夾雑物が少ない形で銀染色でも A が確認できるようになった。抗 A 抗体特異的に見出されたバンドを質量分析にて同定する作業を進めた。ソフトウェアの不具合などがあり、研究期間内に同定したピークの解析をすることが出来なかった。引き続き研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shinohara M, Tashiro Y, Suzuki K, Fukumori A, Bu G, Sato N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Alzheimers Dement (Amst) .	6. 最初と最後の頁 e12006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dad2.12006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shinohara M, Tashiro Y, Shinohara M, Hirokawa J, Suzuki K, Onishi-Takeya M, Mukouazono M, Takeda S, Saito T, Fukumori A, Saido TC, Morishita R, Sato N.	4. 巻 34
2. 論文標題 Increased Levels of A 42 Decrease the Lifespan of Ob/Ob Mice With Dysregulation of Microglia and Astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 2425-2435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901028RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shinohara M, Kanekiyo T, Tachibana M, Kurti A, Shinohara M, Yuan Fu, Jing Zhao, Xianlin Han, Patrick M Sullivan, G William Rebeck, John D Fryer, Michael G Heckman, Guojun Bu	4. 巻 9
2. 論文標題 APOE2 is associated with longevity independent of Alzheimer's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shinohara M, Kikuchi M, Onishi-Takeya M, Tashiro Y, Suzuki K, Noda Y, Takeda S, Mukouazono M, Nagano S, Fukumori A, Morishita R, Nakaya A, Sato N	4. 巻 3
2. 論文標題 Upregulated expression of a subset of genes in APP;ob/ob mice: Evidence of an interaction between diabetes linked obesity and Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 323-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2020-00151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara M, Suzuki K, Bu G, Sato N	4. 巻 -
2. 論文標題 Interaction Between APOE Genotype and Diabetes in Longevity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease,	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-210125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinohara M, Hirokawa J, Shimodaira A, Tashiro Y, Suzuki K, Ghani G, Fukumori A, Matsubara T, Morishima M, Saito Y, Murayama S, Sato N	4. 巻 -
2. 論文標題 ELISA Evaluation of Tau Accumulation in the Brains of Patients with Alzheimer Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology and Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 篠原 充
2. 発表標題 サンドイッチELISAを活用した剖検脳研究からの知見
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原 充
2. 発表標題 ob/obマウスにおけるA ₄₂ の増加は寿命を短くさせる
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原 充
2. 発表標題 危険因子にも着目したアルツハイマー病の治療標的の同定と治療薬の開発
3. 学会等名 第8回 大阪大学神経難病フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Shinohara
2. 発表標題 Increased Levels of A _β 42 Decrease the Lifespan of Ob/Ob Mice with Dysregulation of Microglia and Astrocytes
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Shinohara
2. 発表標題 Implications from Alzheimer's disease risk factors
3. 学会等名 The 5th NCGG-ICAH Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原 充
2. 発表標題 Insights from biochemical analyses of regional distribution of Alzheimer's pathologies
3. 学会等名 ICN2018 TOKYO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原 充
2. 発表標題 アルツハイマー病危険因子APOEの認知機能や長寿に対する作用
3. 学会等名 第20回関西・中部認知症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原 充
2. 発表標題 危険因子にも着目したアルツハイマー病の病態機構の解明、治療薬開発の研究
3. 学会等名 第62回日本老年医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原 充, 鈴木 香, Bu Guojun, 里 直行
2. 発表標題 APOE 多型と糖尿病の認知機能や寿命への交互作用の検討
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原 充, 田代 善崇, 鈴木 香, 福森 亮雄, 森島 真帆, 村山 繁雄, 里 直行
2. 発表標題 タウELISA の剖検脳での検討
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原 充
2. 発表標題 原因因子や危険因子に着目した病態解明, 治療薬開発
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Mitsuru Shinohara, Naoyuki Sato	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 17
3. 書名 The Roles of Apolipoprotein E, Lipids, and Glucose in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease	

1. 著者名 Mitsuru Shinohara, Naoyuki Sato	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 17
3. 書名 Diabetes Mellitus, A risk factor for Alzheimer's Disease	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤津 裕康 (Akatsu Hiroyasu) (00399734)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菊地 正隆 (Kikuchi Masataka) (90722538)	大阪大学・医学系研究科・特任講師（常勤） (14401)	
研究分担者	齊藤 祐子 (Saito Yuko) (60344066)	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 (82674)	
研究分担者	村山 繁雄 (Murayama Shigeo) (50183653)	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 (82674)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関