

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890001

研究課題名（和文） アルカデイン代謝産物 p3-Alc の解析

研究課題名（英文） Analysis of p3-Alc, metabolic product of Alcadein

研究代表者

羽田 沙緒里 (HATA SAORI)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：40581012

研究成果の概要（和文）：

未解明な点が多く残されている孤発性アルツハイマー病(AD)の発症機構を解明するために、AD 関連タンパク質 Alcadein の代謝産物である p3-Alc の解析を行った。孤発性 AD 患者の脳脊髄液および血液から p3-Alc を検出し解析したところ、AD 発症初期から疾患特異的に p3-Alc が質的・量的に変化していることを見出した。p3-Alc を切り出す切断酵素の機能変化が孤発性 AD の発症に関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the pathogenesis of sporadic type of Alzheimer's disease (AD), I analyzed AD-related peptide, p3-Alc, which is the metabolic product of Alcadein protein. In cerebrospinal fluid and blood of subjects with sporadic AD, p3-Alc peptides showed quality and quantity alteration. This result indicates that dysfunction of Alc-cleaving secretase can be acquired and it may link to the onset of sporadic AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む先進諸国では認知症最大の疾患であるアルツハイマー病(AD)患者の増加が社会的な問題となっているが、その大部分を占める孤発性ADの発症機構には不明な点が多く残されている。

AD患者脳特有にみられる老人斑の主要構成成分であるアミロイドβ(Aβ)がADの発症に深く関与していると考えられているが、Aβは凝集性が高いために遺伝子変異を持たない孤発性ADにおけるAβの産生変化を捉えることは難しい。

Aβは、前駆体タンパク質APPがセクレターゼによる二段階の切断を受けることによって産生される。同じ酵素・同じ切断様式で代謝されるI型膜タンパク質Alcadeinは、二段階の切断によって非凝集性ペプチドの「p3-Alc」を分泌する。これまでの解析からp3-AlcはAβの切断変化を捉えうるペプチドであることを明らかにしてきた(Hata et al, *J Biol Chem*, 2009)。

2. 研究の目的

APPおよび切断酵素の遺伝子に変異を持たない孤発性AD患者においても、変異を持つ家族性ADと同様に切断酵素の機能変化が起こっているのではないかという仮説を立てた。これを検証するために、Aβの切断変化を捉えうる非凝集性ペプチドp3-Alcの解析を行い、孤発性AD発症機構の解明を行う。

(1) 孤発性AD患者におけるp3-Alcの質的変化の検証

APP、Alcの二段階目の切断を行うγセクレターゼの切断サイトには多様性があるため、

Aβ、p3-Alcには分子量の異なる複数の分子種がある。Aβのマイナー分子種であるAβ42は凝集性が高く、神経毒性を有していることから、Aβ42の産生比増加が孤発性AD患者でも起こっている可能性を考えた。しかしAβ42は凝集性が高いため、正味の産生量比変化を検出するのは難しい。

非凝集性ペプチドであるp3-Alcのマイナー分子種の産生比率の変化はAβ42の産生比率変化と協調的である(Hata et al, *J Biol Chem*, 2009)ことから、生体内におけるAβの質的变化を検証することができる。そこで本研究では孤発性AD患者においてp3-Alcの質的变化(マイナー分子種の産生量比変化)が起こっているかどうかを検証し、孤発性AD患者でもγセクレターゼの切断機能変化が起こるかを調べる。

(2) 孤発性AD患者におけるp3-Alcの量的変化の検証

γセクレターゼの機能変化は、基質の切断サイトを変化させることだけではなく、基質の切断活性自体にも影響している可能性がある。そのため、孤発性AD患者においてp3-Alcの分泌量が変化しているかどうかを定量解析によって明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、脳脊髄液および血液中に分泌されたp3-Alcの解析を行う(図1)。

(1) 孤発性AD患者の脳脊髄液中のp3-Alcの質的変化の解析

発症初期の孤発性AD患者、健常人、他の神経疾患患者の脳脊髄液(CSF)からp3-Alcを抗p3-Alc抗体を用いて免疫沈降により回

取し、MALDI TOF/MS 解析を行った。各分子種のピーク面積比を求めることによって、各分子種の産生比率を調べた。

(2) 孤発性 AD 患者の血液中の p3-Alc の量的変化解析

孤発性 AD 患者、健常人の血漿から p3-Alc を抽出し、p3-Alc を特異的に定量可能な sELISA 系を用いて、血漿中の p3-Alc の定量解析を行った。

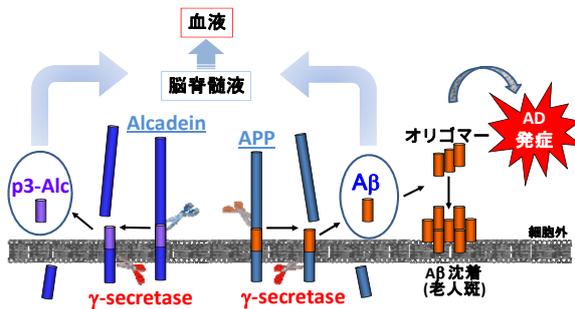


図1. APPとAlcadeinの代謝

4. 研究成果

(1) 孤発性 AD 患者の脳脊髄液中の p3-Alc の質的変化解析

健常人 (CDR 0)、認知症疑い AD 患者 (CDR 0.5)、軽度認知症 AD 患者 (CDR 1)、他の神経疾患患者 (OND) の髄液サンプルを用いて、p3-Alc のマイナー分子種 (p3-Alc α 38) の産生比率をもとめた。

その結果、発症初期の孤発性 AD 患者 (CDR 0.5、CDR 1) では、健常人および他の神経疾患患者と比較して、p3-Alc のマイナー分子種の産生比率が有意に高かった (図 2) (Hata et al, *Ann Neurol*, 2011)。

このことから、少なくとも一定数の孤発性 AD 患者では γ セクレターゼの切断基質の質的変化が起こっている可能性を示唆することができた。

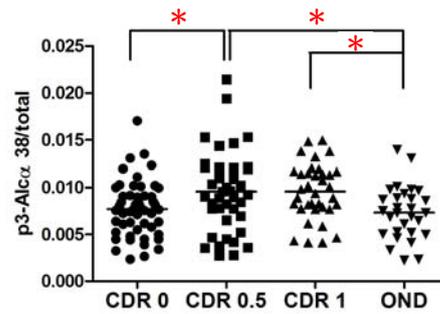


図2. 孤発性AD患者におけるp3-Alcの質的変化

(2) 孤発性 AD 患者の血液中の p3-Alc の量的変化解析

孤発性 AD 患者群と非 AD 群の血漿から p3-Alc を抽出し、sELISA で定量を行った。その結果、AD 患者群では血中の p3-Alc が非 AD 群と比較して有意に多かった (図 3) (Konno, Hata et al, *Mol Neurodegener*, 2011)。

このことから、孤発性 AD において、 γ セクレターゼの基質切断自体も変化している可能性があることを明らかにした。

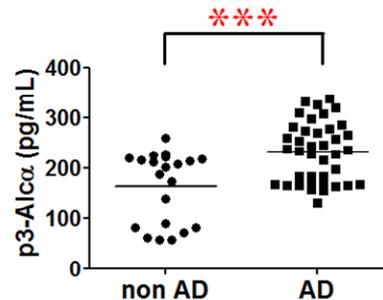


図3. 孤発性AD患者におけるp3-Alcの量的変化

以上より、私は遺伝子変異がない孤発性 AD でも γ セクレターゼの切断基質の質的・量的変化が起こり、それが発症に関与している可能性を初めて示した。

本研究は、AD の新たな発症メカニズムの提唱をおこなったのみならず、いまだ確立していない早期 AD 診断法の開発にも貢献できる可能性を示すものである。

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 4 件)

① Hata, S., Fujishige, S., Araki, Y., Taniguchi, M., 他 20 名、Alternative processing of γ -secretase substrates in common forms of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Evidence for γ -secretase dysfunction、*Annals of Neurology*、査読あり、69、2011、1026-1031

DOI: 10.1002/ana.22343

② [§]Konno T, [§]Hata S., 他 11 名([§] Equal contribution)、Coordinated increase of γ -secretase reaction products in the plasma of some female Japanese sporadic Alzheimer's disease patients: quantitative analysis of p3-Alc α with a new ELISA system., *Molecular Neurodegeneration*, 査読あり、6、2011、76

DOI:10.1186/1750-1326-6-76

③ 羽田沙緒里、今野禎子、鈴木利治、新しいバイオマーカー；アルカデイン、*Pharma Medica*、査読なし、28、2010、15-19

[学会発表] (計 16 件)

① 羽田沙緒里 浦上克哉、谷口美也子、池内健、鈴木利治、アルツハイマー病の新たな生化学的マーカー、第 1 回 認知症予防学会 学術大会、2011 年 9 月 9 日-11 日、米子コンベンションセンター (鳥取)

② Hata, S. Urakami, K., Taniguchi, M.,

Akatsu, H., Gandy, S., Suzuki, T.、Alternative γ -secretase processing in sporadic Alzheimer's disease suggested by p3-Alc peptide, metabolic product of Alcadin、Alzheimer's Association International Conference 2011、July 16-21 2011、Porte de Versailles (France)

③ 羽田沙緒里、p3-Alc のアルツハイマー病発症サロゲートマーカーおよび診断バイオマーカーとしての応用、日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月 28-31 日、ツインメッセ静岡 (静岡)

④ Saori Hata、p3-Alc Peptides Are Generated by α - and γ -secretase Cleavage of Alcadin and Indicate Alzheimer's Disease-Related γ -secretase Dysfunction、The American Society for Cell Biology, Annual Meeting、December 11-15 2010、Pennsylvania Convention Center (USA)

⑤ Saori Hata、 γ -secretase dysfunction in sporadic Alzheimer's disease suggested by p3-Alc peptide, metabolic product of Alcadin、Alzheimer's Association ICAD2010、July 10-15 2010、Hawai'i Convention center (USA)

[図書] (計 1 件)

① Saori Hata, Yuhki Saito, Toshiharu Suzuki, Wiley-VCH, Lipids and Cellular Membranes in Amyloid Disease (Edited by Jelinek, R.), 2011, 177-194

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：アルカデインペプチド切断物による認知症またはアルツハイマー病診断方法
または予後予測方法

発明者：鈴木利治、伴（羽田）沙緒里、清藤勉、柏原昌次

権利者：国立大学法人北海道大学、株式会社免疫生物研究所

種類：特願

番号：特願 2011-82975

出願年月日：2011 年 4 月 4 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/shinkei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 沙緒里 (HATA SAORI)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：40581012

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし