

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 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：2012～2014

課題番号：24659169

研究課題名(和文) 認知症早期臨床検査診断薬の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic agent for dementia

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アルツハイマー病患者の脳でタンパク質中のアルギニンがシトルリンに変換した異常なタンパク質(シトルリン化タンパク質と総称)が早期に出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加することを明らかにした。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。本研究では、シトルリン化タンパク質を指標とした認知症の早期臨床診断薬の開発を目的とし、シトルリン化タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることに成功した。これらの抗体を組み合わせ、シトルリン化タンパク質を高感度に検出するELISAシステムを構築する。

研究成果の概要(英文)：Peptidylarginine deiminases (PADs) are post-translational modification enzymes that citrullinate protein arginine residues. Abnormal protein citrullination by PAD2 has been closely associated with the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD). In this study, we tried to develop a novel method for sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of citrullinated proteins which may become a useful marker of human neurodegenerative diseases.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：認知症 臨床検査試薬 アルツハイマー病 老化 シトルリン化タンパク質

1. 研究開始当初の背景

認知症は脳の病的障害により発症し、アルツハイマー型、脳血管性、前頭側頭型、レビー小体型などに分類される。老化による「もの忘れ」は体験の一部を忘れるが、「認知症」では体験の全体を忘れる。日本での認知症患者数は既に200万人を超えているにも拘わらず、その臨床診断薬はまだない。我々は、以前にアルツハイマー型認知症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(シトルリン化タンパク質と総称)が早期に出現することを報告した。また、病状の進行程度(Braak Stageにより評価)に応じてシトルリン化タンパク質の量が増加することも明らかにした。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、正常脳にシトルリン化タンパク質は存在しない。このように、シトルリン化タンパク質は認知症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、シトルリン化タンパク質を指標とした認知症の早期臨床診断薬を開発する。即ち、シトルリン化タンパク質を高感度に検出するELISAシステム(酵素免疫測定法)を構築する。

3. 研究の方法

(1) 認知症患者脳におけるシトルリン化タンパク質の病理学的解析

アルツハイマー型認知症患者の脳(特に海馬とその周辺)では、病状の進行程度に応じシトルリン化タンパク質の異常な蓄積が観察された。また、アミロイドベータタンパク質(A β)陽性の老人斑やリン酸化タウタンパク質陽性の神経原線維変化とシトルリン化タンパク質陽性の染色部位がよく一致した。さらに症例数を増やすため、アルツハイマー型認知症患者の脳、正常脳について、同様の免疫組織学的検討を行う。シトルリン化タンパク質の検出は、我々が独自に開発した抗シトルリン抗体、化学的検出方法を用いることにより高感度に検出する。

(2) シトルリン化タンパク質のプロテオーム解析

認知症患者脳に存在するシトルリン化タンパク質を二次元電気泳動、質量分析計(MALDI-TOFMS)を用いたプロテオーム解析により全て同定する。今までにシトルリン化タンパク質としてミエリン塩基性タンパク質(MBP)、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、ピメンチンを同定している。また、今までに同定したシトルリン化GFAPのどのアルギニンがシトルリン化しているかをプロテオーム解析により決定する。

(3) 認知症の臨床検査診断薬の開発

認知症の早期診断を行う臨床検査診断薬を完成させるため、シトルリン化タンパク質を高感度に検出するELISAシステム(酵素免疫測定法)を構築し、認知症の早期診断を行う臨床検査診断薬を確立する。即ち、シトルリン化タンパク質特異的モノクローナル抗体を組み合わせ、認知症患者脳に存在するシトルリン化タンパク質に対して最も高感度なELISAシステムを構築する。

4. 研究成果

(1) シトルリン化タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を作製した。即ち、シトルリン化タンパク質を包括的に捉える特異的なモノクローナル抗体を作製するため、牛の胸腺由来ヒストンからH1ヒストンのみを除き、ヒトPAD2組換えタンパク質を用いて、ヒストンをシトルリン化した。ヒストンのシトルリン化を確認後、ジアセチルモノオキシムやアンチピリンなどの試薬を用いて、シトルリン化部位を化学修飾した。化学修飾シトルリン化ヒストンができたのを確認後、透析して免疫抗原とした。次に、化学修飾シトルリン化ヒストン抗原をマウスに免疫して抗体ができたのを確認した。常法に従い、化学修飾シトルリン化タンパク質に特異的クローンをスクリーニングした。その結果、化学修飾シトルリン化タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を9クローン得ることに成功した。また、個々のモノクローナル抗体について、反応性や特異性をELISA法、ウエスタン法、免疫染色法により確認した。これらの抗体を組み合わせ、化学修飾シトルリン化タンパク質を高感度に検出するELISAシステムを構築している。

(2) ヒトグリア線維性酸性タンパク質組換えタンパク質(rhGFAP)とヒト2型PAD(hPAD2)組換えタンパク質を用いて、シトルリン化ヒトGFAP(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。さらに、抗原としてCit-GFAPをマウスに免疫し、Cit-hGFAPに反応するモノクローナル抗体を得ることができた。免疫組織染色により、作製したモノクローナル抗体は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。また、Cit-hGFAPを定量するサンドイッチELISAも開発した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Jang, B., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., Choi, E.K. : [Mini-Review] Peptidylarginine deiminase and protein citrullination in prion diseases: Strong evidence of neurodegeneration. Prion 7 42-46

(2013) (査読有)

doi: 10.4161/pri.22380

Ishigami, A., Uchida, Y., Miyazaki, T., Handa, S., Choi, E.K., Kim, Y.S., Kasahara, Y., Maruyama, N. : Two novel sandwich ELISAs identify PAD4 levels and PAD4 autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 23 794-803 (2013) (査読有)

doi: 10.1007/s10165-012-0748-0

Jang, B., Jeon, Y.C., Choi, J.K., Park, M., Kim, J.I., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., Choi, E.K. : Peptidylarginine deiminase modulates the physiological roles of enolase via citrullination: links between altered multifunction of enolase and neurodegenerative diseases. *Biochem. J.* 445 183-192 (2012) (査読有)

doi: 10.1042/BJ20120025

[学会発表](計8件)

石神昭人 : PAD14測定系の確立と臨床応用. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会 シンポジウム4「シトルリン化と自己免疫(リウマチ性疾患)」, 東京, 2014.4.24

増富裕文、下門顕太郎、丸山直記、石神昭人 : ヒトグリオーマ細胞株 U-251MG 細胞における cAMP による PAD2 の誘導. 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.10.15-18

加賀美弥生、丸山直記、石神昭人 : シトルリン化タンパク質特異的モノクローナル抗体の作製と特異性の解析. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25-27

増富裕文、下門顕太郎、石神昭人 : ヒトグリオーマ細胞株 U-251MG 細胞での PAD2 誘導に伴うシトルリン化タンパク質の増加. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25-27

Kagami, Y., Shimada, N., Handa, S., Choi, E.K., Kim, Y.S., Ito, H., Maruyama, N., Ishigami, A. : Age-related changes of peptidylarginine deiminase 2 in the mouse brain. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG 2013), Seoul, Korea, 2013.6.26

Kim, H.J., Jang, B., Jin, J.K., Jeon, Y.C., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., Choi, E.K. : Peptidylarginine deiminase 2-mediated protein citrullination in prion disease. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG 2013), Seoul,

Korea, 2013.6.26

加賀美弥生、半田節子、根本哲生、丸山直記、石神昭人 : 腫瘍組織におけるシトルリン化タンパク質の局在と病態との相関. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12.11-14

半田節子、加賀美弥生、内田好昭、笠原靖、丸山直記、石神昭人 : 関節リウマチの早期診断を目指した新規 hPAD4 測定法及び hPAD4 自己抗体検出法の確立. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012.12.14-16

[図書](計2件)

Ishigami, A., Choi, E.K., Kim, Y.S., Maruyama, N. : Deimination in Alzheimer's Disease. In: Protein Deimination in Human Health and Disease. Nicholas, Anthony; Bhattacharya, Sanjoy (Eds.), Springer, pp.237-255 (2014)

Choi, E.K., Jang, B., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.K. : Deimination in Prion Diseases. In: Protein Deimination in Human Health and Disease. Nicholas, Anthony; Bhattacharya, Sanjoy (Eds.), Springer, pp.219-235 (2014)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
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