

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790062

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病診断マーカー候補 p3 - Alc の解析

研究課題名(英文) Analysis of p3-Alc peptides, the novel biomarker for Alzheimer's disease

研究代表者

羽田 沙緒里 (Hata, Saori)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40581012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：認知症最大の疾患であるアルツハイマー病(AD)の発症機構には未解明な点が多く残されており、また発症初期段階における診断法や根本的な治療法は未だ確立されていない。本研究ではAD患者の脳脊髄液および血液中のp3-Alcの定量解析を行った。その結果、一定数の患者ではセクレターゼ切断機能変化が起こっていることを示唆するデータを得られた。p3-Alcは発症メカニズムの解明のためのツールだけではなく、セクレターゼによる切断変化が起こっている患者を捉えられることから新規診断マーカーや治療薬選択のためのマーカーとしても有力である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common senile dementia. However, the pathogenesis of AD remains unclear. Moreover, early detection methods and fundamental therapeutic methods for AD are not fully established.

In this study, I detected p3-Alc peptides from CSF samples and plasma samples of AD patients. Our results suggest that alternative processing of multiple gamma-secretase substrates may occur in some AD patients. These findings raise the possibility that the molecular pathogenesis of AD might involve gamma-secretase dysfunction. Measurement of p3-Alc levels may be useful in selecting subjects that might benefit from patient-specific therapy aimed at modulation of gamma-secretase function.

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

認知症患者の急増が社会的な問題となっており、その中でも最も患者数が多い疾患がアルツハイマー病(AD)である。ADは、原因遺伝子に変異を持つ家族性ADと、そのような遺伝子変異を持たない孤発性ADに分けられ、このうち孤発性ADが90%以上を占めると考えられている。孤発性ADの発症機構には未解明な点が多く残されており、早期診断法や根本的治療法も確立されていない。ADは脳内において神経細胞死などの病態変化が起こってから認知症を発症するまでに10~15年かかると推測されており、認知症発症後の治療薬投与では根本的治療が難しいと考えられる。そのため、根本的治療法開発のためにも、AD発症のメカニズム解明と発症の前段階あるいは早期に確実に診断できる診断法の確立が重要である。

AD患者脳では、アミロイド(A $\beta$ )が沈着した老人斑が特徴的な病理の1つとして認められ、神経細胞が生成するA $\beta$ の可溶性オリゴマーが神経毒性を示す事が明らかになってきた。A $\beta$ の生成・代謝がどのように変化しているのかを探ることが、発症機構の解明と創薬標的を同定する上で重要である。A $\beta$ は、I型膜タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)が細胞膜近傍で一次切断を受け、膜貫通領域でセクレターゼによる二回目の切断を受けることによって産生される。セクレターゼの切断サイトには多様性があり、その違いにより40アミノ酸の「A $\beta$ 40」および42アミノ酸の「A $\beta$ 42」が主に分泌される。これらのうち量的にマイナーな分子種であるA $\beta$ 42は、凝集しやすく、オリゴマー化することによって神経毒性を発揮することが明らかになっている。

## 2. 研究の目的

ADの大部分を占める孤発性ADの発症機構は多様であると考えられる。私は原因遺伝子に変異がない孤発性AD患者でも、家族性AD患者と同様にセクレターゼ切断変化によるA $\beta$ 42生成の質的・量的変化が起こり、それが発症原因となっている患者がいるのではないかと、という仮説を立てた。しかし、A $\beta$ 42は凝集性が高いため、患者サンプルを用いてA $\beta$ の正味の量的変化(A $\beta$ 42量の増加)・質的变化(A $\beta$ 42量比の増加)を捉えることは難しい。実際に、多くの孤発性AD患者の脳脊髄液(CSF)中に存在するA $\beta$ 42量は健常人と比較して有意に少ない。

I型膜タンパク質Alcadein(Alc)は、APPと同様に、細胞膜近傍で一次切断を受け、細胞膜内領域でセクレターゼによる切断を受けることによって、A $\beta$ 様のペプチドである「p3-Alc」を分泌する。培養細胞を用いた実験より、p3-AlcはA $\beta$ の産生変化を捉えられる可能性が示唆され、さらにp3-AlcはA $\beta$ 42とは異なり凝集性がないため、生体内におけるAPPのセクレターゼ切断変化を捉えるマーカーとしてp3-Alcを使用できるのではないかと考えた。AlcファミリーのうちAlcから分泌されるp3-Alcは35アミノ酸からなるメジャー分子種p3-Alc<sub>35</sub>に対し、38アミノ酸からなるp3-Alc<sub>38</sub>がA $\beta$ 42に対応するマイナー分子種である。AD患者におけるCSF中のp3-Alc<sub>38</sub>の産生比率の変化を調べるために、国内外の複数の機関から供与されたCSFを解析した。その結果、孤発性ADの発症初期段階からA $\beta$ 42に対応するp3-Alc<sub>38</sub>の比率増加が見られたことから、一定数の孤発性AD患者では、PS1遺伝子に変異を持つ家族性AD患者と同様に、セクレターゼによる基質切断変化が

起こっている可能性が示唆された。p3-Alc は孤発性 AD の発症初期段階から質的・量的に変化する可能性が示唆されたことから、発症の前段階あるいは初期段階をとらえられるバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

本研究は AD 関連タンパク質である Alcadin の セクレターゼによる切断変化解析を行うことによって、p3-Alc が孤発性 AD の新規バイオマーカーとして応用できるかを検証するとともに、AD の発症機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では $\gamma$ セクレターゼの基質切断変化と孤発性 AD 発症メカニズムの関連性を検証するために、ヒトの CSF および血漿サンプルを用いて p3-Alc の定量解析を行った。

これまでに、毒性ペプチド A $\beta$ 42 に相当するマイナー-p3-Alc の産生比率が、孤発性 AD 患者において増加することを見出した。これは免疫沈降により回収した p3-Alc を TOF-MS 解析し、そのスペクトルから各ピークの相対的な比率を計算するという方法で解析を行った結果であり、この系は量的変化解析や多数サンプルの質的変化解析には向かないという欠点がある。これを解消するために p3-Alc 特異的抗体を用いた sELISA による定量系を確立した。これまでに確立した定量系は p3-Alc のトータルを定量できる系と、主要分子種である p3-Alc 35 を断端特異的に認識する抗体を用いた系である。いずれの系においても、CSF は希釈のみで定量可能であった。しかし、血液を用いた定量では血中に反応阻害物質が存在するため、希釈のみで定量することはできない。そのため、抽出操作をおこない、そのサンプルに関して定量を行った。実際の方法は、クロロホルムと

メタノールの混合液で血液から抽出操作を行い、その水相を乾固し、ELISA 用のバッファーで再溶解したものを定量用のサンプルとした。二種類の sELISA 系を用いて、孤発性 AD 患者 CSF・血中の p3-Alc を定量し、認知症の進行度合い等の関連を解析することによって、孤発性 AD と セクレターゼ基質切断機能変化の関連を探った。

## 4. 研究成果

### (1) CSF中のp3-Alc totalの定量解析

複数の医療機関から供与された CSF サンプルの解析を行った。その結果、CSF 中の p3-Alc 量が AD 患者において有意に増加しているコホートと、増加が顕著ではないコホートがあった。有意差がないコホートでは A $\beta$ 42 値の低下を AD 診断の指標としていたため、A 42 を診断の指標としていないコホートに関して A $\beta$ 42 の低値群、高値群に分類して p3-Alc 量の解析を行った。その結果、低値群では同じように有意差がなかったが、高値群では CSF 中の p3-Alc が AD 患者において有意に増加していた。以上の結果より、セクレターゼによる基質切断変化が起こっている患者を p3-Alc の定量によって捉えられることが示唆された。A 値が低下していないことにより見落とされてしまった AD 患者を p3-Alc 値の定量によって再度診断できる可能性もある。

### (2) 血漿中のp3-Alc totalの定量解析

複数の医療機関から供与された血液サンプルの p3-Alc total の定量解析を行った。3つのコホート血漿サンプルを解析した結果、すべてのコホートで血漿中の p3-Alc total 量が AD 患者において有意に増加した。また、AD 患者において血漿中 A 量と p3-Alc 量が有意に相関した。さらに血中 A の高値群と低値群に分類し p3-Alc 量を比較した場合、AD 患者では A 40 高値

群でp3-Alc 量が有意に多かったのに対し、他の神経疾患患者では有意な違いはなかった。以上の結果より、p3-Alc 量の増加は疾患特異的であり、ADに関連したセクレターゼ切断機能変化を捉えるマーカーとしてp3-Alcが有用であることが示された。

### (3) 血漿中のp3-Alc 35量の定量解析

p3-Alc 35を特異的に定量可能なsELISAの系を用いて、複数の医療機関から供与された血漿サンプルの定量解析を行った。主要分子種であるp3-Alc 35の量は、p3-Alc totalと有意に相関することが明らかとなった。血漿中p3-Alc 35は加齢に伴って増加する傾向があったため、非AD群とAD群においてage-matchedな検体を用いて比較解析を行った。その結果、AD群において血漿中p3-Alc 35が有意に増加していた。また、AD患者群の中でAD治療薬であるドネペジル投与群と非投与群において血漿中p3-Alc 35量を比較した結果、投与群のp3-Alc 35が有意に減少していることがわかった。このことは、治療薬の効果によって脳内の環境が改善し、それによりセクレターゼの切断が正常な状態に近づいた結果を反映している可能性がある。

本研究によって、遺伝子変異を持たない孤発性ADに患者でもセクレターゼの機能変化が起こり、それが発症に関わる患者がいる可能性があることがわかった。また発症の初期段階からp3-Alcが質的にも量的にも変化することや、治療薬の有無によっても量的に変化したことから、p3-Alcは発症メカニズムの解明のためのツールだけでなく、セクレターゼによる切断変化が起こっている患者を捉えられることから新規診断マーカーや治療薬選択のためのマーカーとしても有力であり、また p3-Alc値の定量・定

性によるAD発症予備群の検出できる可能性も示唆された。

### 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7件)

1. Waragai, M., Hata, S., Suzuki, T., Ishii, R., Fujii, C., Tokuda, T., Arai, A., Ohrui, T., Higuchi, S., Yoshida, M., Igarashi, K., Moriya, M., Iwai, N., Uemura, K. Utility of SPM8 plus DARTEL (VSRAD) combined with magnetic resonance spectroscopy as adjunct techniques for screening and predicting dementia due to Alzheimer's disease in clinical practice. *J. Alzheimer Dis.* in press 査読有
2. Omori, C., Kaneko, M., Nakajima, E., Akatsu, H., Waragai, M., Maeda, M., Morishima-Kawashima, M., Saito, Y., Nakaya, N., Taru, H., Yamamoto, T., Asada, T., Hata S., Suzuki T., J-ADNI Increased levels of plasma p3-Alc $\alpha$ 35, a major fragment of Alcadeina by  $\gamma$ -secretase cleavage, in Alzheimer's disease (2014) *J. Alzheimer Dis.* 39, 861-870 (§Co-corresponding author) 査読有 DOI: 10.3223/JAD-131610
3. Piao, Y., Kimura, A., Urano, S., Saito, Y., Taru, H., Yamamoto, T., Hata, S., Suzuki, T. (2013) Mechanism of intramembrane cleavage of Alcadeins by  $\gamma$ -secretase. *PLoS ONE* 8, e62431. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0062431
4. Maruta, C., Saito, Y., Hata, S., Gotoh, N., Suzuki, T., Yamamoto, T. (2012)

Constitutive cleavage of the single-pass transmembrane protein Alcadein $\alpha$  prevents aberrant peripheral retention of Kinesin-1. **PLoS ONE** 7, e43058. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0043058

5. Matsushima, T., Saito, Y., Elliott, J. E., Iijima-Ando, K., Nishimura, M., Kimura, N., **Hata, S.**, Yamamoto, T., Nakaya, T., Suzuki, T. (2012) Membrane-microdomain localization of amyloid  $\beta$ -precursor protein (APP) C-terminal fragments is regulated by phosphorylation of cytoplasmic Thr668 residue. **J. Biol. Chem.** 287, 19715-17924. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M111.334847
6. **Hata, S.**, Taniguchi, M., Piao, Y., Ikeuchi, T., Fagan, A. M., Holtzman, D. M., Bateman, R., Gandy, S., Urakami, K., Suzuki, T., J-ADNI (2012) Multiple  $\gamma$ -secretase product peptides are coordinately increased in concentration in the CSF of a subpopulation of sporadic Alzheimer's disease subjects. **Mol. Neurodegener.** 7, 16. 査読有  
DOI: 10.1186/1750-1326-7-16
7. Kamogawa, K., Kohara, K., Tabara, Y., Takita, R., Miki, T., Konno, T., **Hata, S.**, Suzuki, T. (2012) Utility of plasma levels of soluble p3-Alcadein $\alpha$  as a biomarker for sporadic Alzheimer's disease. **J. Alzheimer Dis.** 31, 421-428. 査読有  
DOI: 10.3233/JAD-2012-120601

〔学会発表〕(計 22 件)

1. **Hata, S.** p3-Alc peptide in the CSF

and plasma of sporadic Alzheimer's disease patients. Society for Neuroscience annual meeting Neuroscience 2013, November 9-13 2013, San Diego, USA

2. **羽田沙緒里**, Function of Alcadein and its metabolite, p3-Alc, 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11-13 日、横浜
3. **Hata, S.** Quantitative alteration of p3-Alc peptides in CSF of Alzheimer's disease patients, Alzheimer's Association International Conference 2013, July 13-18 2013, Boston, USA
4. **羽田沙緒里**, 脳脊髄液・血液診断マーカーとしての p3-Alc の解析、第 31 回日本認知症学会学術集会 2012 年 10 月 26 日-28 日、筑波
5. **Hata, S.** Increased p3-Alc peptides in the CSF and plasma of sporadic Alzheimer's disease patients. Alzheimer's Association International Conference 2012, July 14-19 2012, Vancouver, Canada

〔その他〕

ホームページ等

<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