

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25889072

研究課題名(和文) アプタマー技術を駆使したアルツハイマー病血液診断マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of surrogate plasma markers for early diagnosis of Alzheimer's disease

研究代表者

塚越 かおり (Tsukakoshi, Kaori)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20708474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：A 病変はアルツハイマー病(AD)初期に出現する特徴的な病変である。本研究では、A 病変を呈するADモデルマウスの血漿プロテオミクス解析を実施し、A 蓄積を察知する血液マーカーの候補タンパク質を4種類同定した。いくつかの候補タンパク質は翻訳後修飾を受けており、修飾の異なる分子は二次元電気泳動で分離されていた。そこでモデルマウス特異的変動が見られたタンパク質スポットに対し、アプタマーの探索実験を行った。ELISAの構築も完了している。以後ELISAとアプタマーを使った定量評価を通して、A 蓄積を検出するマーカータンパク質を完全同定できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of amyloid beta (Abeta) and tau deposition. It is revealed that Abeta plaques emerge first in progression of AD; therefore the blood-based biomarker to detect Abeta deposition is useful for early diagnosis of AD. We performed screening of blood-based biomarkers in AD model mice that we recently developed by using 2D-DIGE and identified four marker candidate proteins. We are validating those candidates by ELISA and aptamer-based assay.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 早期診断 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は認知症の主要な原因疾患であり、脳内にアミロイドβ (Aβ) とタウの異常蓄積が特徴的な病理として観察される。これらタンパク質の異常凝集の結果、神経細胞の変性と細胞死が引き起こされ、認知機能低下に繋がるとされている。Aβ病理の出現は初期に発生することから、近年はPET (陽電子放射断層撮像法) による脳内Aβの脳画像診断がADの早期診断方法として期待されている。しかし脳画像診断は①測定費用が高額である、②大型測定機器と放射線ラベルされた薬剤が必要である、③脳を直接測定することによる患者への身体的・時間的負担が大きい、などの課題から、普及性とスループットに優れたAD早期診断方法の開発が求められている。

以上を達成するには、血液中にあるAβの異常凝集に伴って変化するバイオマーカーの検出が診断方法として最適であると言える。しかし、これまで精力的にAD患者の血漿タンパク質が解析されているものの、個人差や投薬の影響にADに由来する変化が埋もれてしまうためか、同定されるタンパク質のいくつかは既存の研究の中で繰り返し出現する一方で (Kiddle et al., *J Alzheimers Dis*, 2014)、未だ有効なマーカータンパク質は見つかっていない。

2. 研究の目的

本研究では Aβ 蓄積によって変動する血液バイオマーカー候補タンパク質を同定することを目的とした。我々はアミロイド病理を極めて良く再現する AD モデルマウス: APP ノックインマウス (APP-KI マウス) の作製に成功している (Saito et al., *Nat Neurosci*, 2014)。APP-KI マウスは既存のモデルマウスと異なり表現型のバラつきが少ない特徴をもつ。本マウスを用いることで、ヒトよりも個体差や食事・環境の影響を除くことができ、真に Aβ 蓄積によって変動するタンパク質を探索できると考えた。また本研究においては、分子認識素子アプタマーをマーカー探索法を応用して作製することで、効率的にバリデーションを進めることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 2D-DIGE 法による血漿プロテオミクス

24ヶ月齢のADモデルマウスおよび野生型マウスから血液を採取した。採取した血液から血漿を調製し、解析の妨げとなるアルブミン・IgGを除去した後、二次元電気泳動の手法をベースとした2D-DIGE法により含まれるタンパク質の解析を行なった。野生型マウスと比較し有意に増加または減少したタンパク質スポットについてLC-MS/MSによる

タンパク質同定を行った。

(2) 候補タンパク質の評価

12ヶ月齢または24ヶ月齢のAPP-KIマウスまたは野生型マウス血漿をSDS-PAGEで分離し、ウエスタンブロッティングで目的タンパク質のバンド強度を指標に増減を観察した。バンド強度はImageJで定量し、統計解析に供した。

(3) 転写膜を用いたアプタマーの探索

(1)で選択したマーカー候補タンパク質に結合するアプタマーをスクリーニングするため、以下の実験を行った。

- ① DNAライブラリの作製
- ② マーカー候補タンパク質への部分的蛍光標識と精製
- ③ 二次元電気泳動法による蛍光標識タンパク質と血漿タンパク質の再分離

4. 研究成果

2D-DIGE法では各タンパク質が単一スポットとして分離される。画像解析の結果、13個のスポットがAPP-KIマウス血漿中で変動していた。当初の計画では、ここでアプタマー作製を予定していたが、電気泳動像を見ると複数のスポットが同一分子量でありながら等電点が異なるものであった。そのようなスポットに含まれるタンパク質の種類は同一であると考え、実験計画を変更し、先にスポットに含まれるタンパク質をMS解析により同定した。予想通りいくつかのスポットは同一のタンパク質であり、13のスポットより4つのタンパク質が同定された (表1)。タンパク質Dについてはウエスタンブロッティング (WB) による再評価で差が見られなかった。タンパク質Aの再評価実験は現在準備中である。以下、タンパク質Cとタンパク質Bの評価結果の詳細について述べる。

表1. 同定したタンパク質のリスト。
4種類のタンパク質が増加または減少していた (特許取得中のため名前を伏せている)。

Protein ID	Change
A	↓ APP-KI
B	↑ APP-KI
C	↑ APP-KI
D	↓ APP-KI

タンパク質Cは8つのスポットから同定されたタンパク質であり、いずれのスポット強度もAPP-KIマウス血漿中で有意に増加していた。各タンパク質スポットが分離した理由

として翻訳後修飾の違いが考えられ、少なくとも APP-KI マウス中で濃度が増加しているタンパク質 C スポットには糖鎖が修飾していることを明らかにしている。タンパク質 C 特異抗体を用いた WB では、2D-DIGE の結果を再現することはできなかった。WB の評価では変化の見られなかったタンパク質 C スポット分も測り込むため、増加分の検出が難しい可能性がある。特定の翻訳後修飾を受けたタンパク質 C のみを評価することが必要と考え、タンパク質 C スポットは以降のアプタマー作製の標的分子とした。

タンパク質 B については、WB での評価で 2D-DIGE と同様の有意な増加を確認することができた。24 ヶ月齢の APP-KI マウス血漿中においてタンパク質 B の量は増加しており、また A β 蓄積がほとんどない 12 ヶ月齢の APP-KI マウス血漿中では増加していなかった (図 1)。この結果から、タンパク質 B は A β 蓄積を反映し増加する、目的としたマーカータンパク質であることが期待された。より定量的な評価を行うため、市販抗体と自作抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA を作製した。現在、マウス由来タンパク質 B の加齢依存性を測定しているところである。

さらに、今後共同研究者より脳画像診断で A β が脳に蓄積していることが確認されているヒト由来の血漿を得る予定である。当該血漿を対象としたタンパク質 B のバリデーションも ELISA や以降で作製するアプタマーを用いて行う予定である。

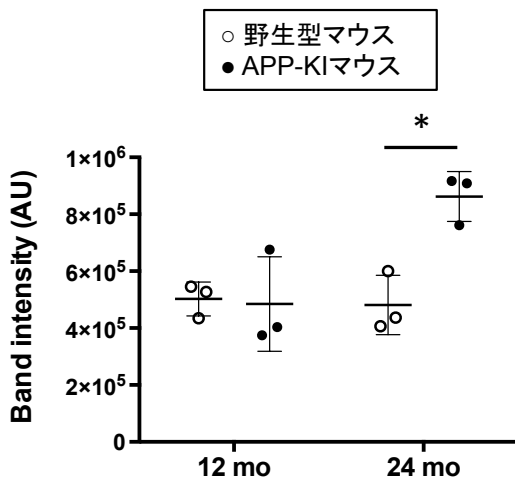


図 1. Immunoblotting for protein B in 12 and 24 month old APP-KI mice plasma samples. Levels of protein B were quantified as indicated in the graph. Data represent mean \pm SD (** p<0.01).

以上の結果を受け、タンパク質 C とタンパク質 B に特異的なアプタマーを作製することとした。ライブラリは Tsukakoshi et al., Anal

Chem, 2012 で使用したものを用いることとした。この実験では標的タンパク質を含む試料を展開した二次元電気泳動後のゲルを使いスクリーニングする。操作は以下のステップからなる。

- ① APP-KI マウス血漿タンパク質を蛍光標識する。蛍光標識済タンパク質を二次元電気泳動で分離し、アプタマーの標的タンパク質を含むスポットを切り出し、タンパク質をゲルから抽出する。
- ② 抽出タンパク質と血漿タンパク質 (蛍光は標識しない) を混合し、二次元電気泳動で展開、ゲル中の全てのタンパク質をメンブレンに転写する。
- ③ DNA ライブラリとメンブレンをインキュベートし、標的タンパク質と結合した DNA を蛍光を指標に抽出する。
- ④ 抽出した DNA を PCR 増幅し、相補鎖を除去して次のライブラリを作製する。

①で抽出した蛍光標識タンパク質の精製度を SDS-PAGE で確認したところ、全てのスポットから抽出したタンパク質は単一バンドとして観察され、目的通りの精製が出来ていると考えられた。そこで②の操作に移ったところ、転写した低蛍光ニトロセルロースメンブレンに予想外の高いバックグラウンド蛍光があり、タンパク質に標識した蛍光を観察することができなかった。この結果、アプタマー作製は期間内に完了することができなかったが、ライブラリと標的タンパク質の蛍光標識・精製・転写は成功していることから、メンブレンを再検討することでマーカー候補タンパク質評価に有用なアプタマーを獲得できると考えている。

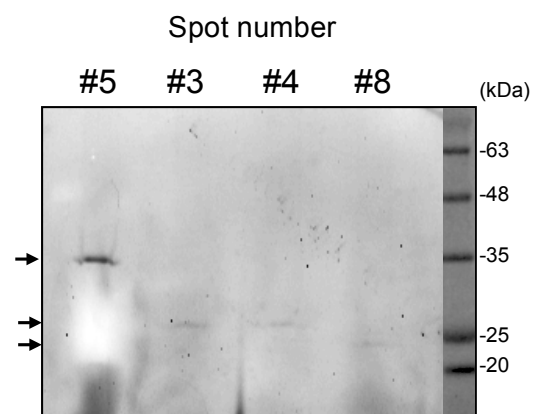


図 2. 2D-DIGE ゲルから精製したマーカー候補タンパク質。タンパク質に修飾した CyDye の蛍光を測定し、精製度を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

①塚越かおり、西道隆臣、アミロイドβ代謝の分子機構から紐解くアルツハイマー病、生体の科学、査読無、65(1)、2014、69-73

〔学会発表〕（計3件）

① K. Tsukakoshi, J. Takano, R. Fujioka, E. Hosoki, T. Saito, A. Takashima and T.C. Saido, POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION(S) OF TAU PROTEIN IN APP KNOCK-IN MICE. ADPD2015, 2015年3月20日, Nice, France

②塚越かおり、斉藤貴志、西道隆臣、APP・タウダブルノックインマウスの作製、第33回日本認知症学会学術集会、2014年12月1日、バンフィコ横浜（神奈川・横浜）

③ K. Tsukakoshi, T. Saito, and T.C. Saido, Screening of plasma protein biomarker candidates for Alzheimer's disease using single APP locus knockin mice. AAIC2014, 2014年7月15日, Copenhagen, Denmark

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）
なし

○取得状況（計0件）
なし

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚越 かおり (TSUKAKOSHI, Kaori)
理化学研究所・脳科学総合研究センター・
研究員
研究者番号：20708474

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし