

アルツハイマー病に関わる核タンパク質 ATBF1 の断片の定量的質量分析による新しい診断技術

育成研究：JSTイノベーションプラザ東海 平成20年度採択課題
「アルツハイマー病の早期診断試薬キットの開発」



代表研究者：名古屋市立大学大学院医学研究科・分子神経生物学 准教授 三浦裕

■ 研究概要

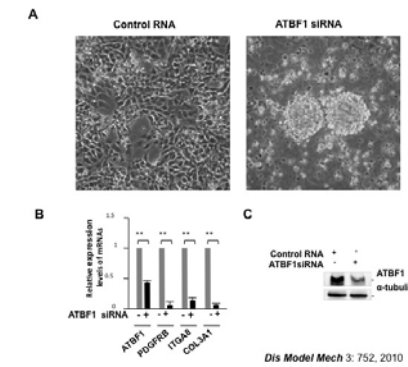
アルツハイマー病特異的に脳神経細胞から漏出する ATBF1 の特異的アミノ酸配列および、その特異的リン酸化修飾を定量的に検出する方法として、質量分析および特異抗体を活用した臨床診断技術開発。

■ 研究内容、研究成果

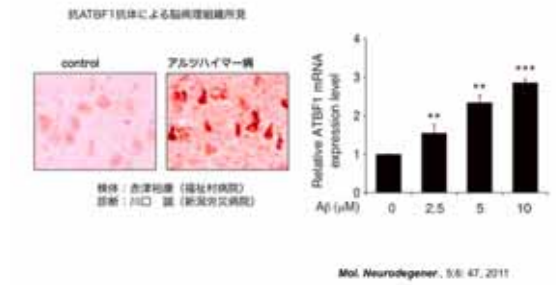
ATBF1 (AT-motif binding factor 1, Zfh-3) は申請者である三浦らが発見した 404-kDa の巨大 DNA 結合タンパク質である。細胞の分化(成熟過程)に重要な役割を果たす。特に神経細胞では細胞分裂を停止するための遺伝子群を活性化するスイッチとして機能を果たした後に、正常の成熟神経細胞では、その発現は抑制される。驚くべきことにアルツハイマー病の神経細胞では、この蛋白質の発現が異常に増加する現象を申請者らは発見し、この現象をアルツハイマー病診断に応用できる事を示して特許化した。ATBF1 が診断の指標となる理由は、アルツハイマー病脳内で増加する病的な A β 蛋白によって細胞が障害を受け、シグナルが活性化することによって ATBF1 が異常発現しその血中濃度が上昇するメカニズムと考えられる。この ATBF1 を検出することは A β オリゴマーの毒性をより鋭敏に検出すると考えられるので、A β の蓄積量による評価よりも、早期診断マーカーとして優れた性質を持っていると考えられる。本研究によって抗 ATBF1 特異抗体および定量的質量分析に必要な安定同位体プローブを作製した。

■ 今後の展開、将来の展望

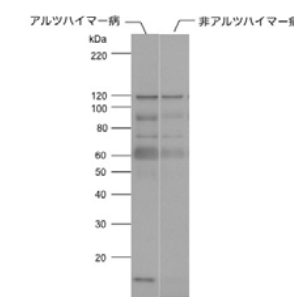
共同研究開発企業である医学生物学研究所 (MBL) によって ATBF1 の断片を N 末端から C 末端までの各部位ごとの特異性に配慮した 20 種類を超える抗 ATBF1 ウサキポリクローナル抗体を開発した。アルツハイマー病診断に有効な部位を特定した抗体は、ウサキポリクローナルであり、その特異性の限界から定量性の観点から診断用試薬としての実用的な性能を恒常的に維持することが難しい。現在は医学生物学研究所が保持している技術によりニワトリ抗 ATBF1 ポリクローナル抗体またはマウス抗 ATBF1 モノクローナル抗体への改良を展開して、より安定したアルツハイマー病診断用試薬としての抗体開発を進めている。抗 ATBF1 抗体は質量分析による標的の絶対定量法でも有効な試薬である。共同研究開発企業であるバイオシステクノロジー社は、atmol 濃度まで ATBF1 の定量線を描く感度まで絶対定量できることを確認した。ただし最終目標である臨床検体中には大量に夾雑タンパク質が存在する複雑系であり、その中に微量存在する ATBF1 断片を質量分析で単純に定量的に検出することは難しい。我々は最初に臨床検体を免疫沈降して濃縮精製した後に質量分析する方法の開発まで到達している。ただし、この方法では検出できる標的は免疫沈降に使う抗体の性能に依存するために、抗体で濃縮できない未知の ATBF1 断片は検出および定量は原理的に不可能である課題が残っている。そこで抗体に依存せずに安定同位体を内部標準として臨床検体から直接的に質量分析できる検出系の開発に着手している。今後は夾雑タンパク質の除去方法などを組み合わせることで、より簡便で高感度に直接的に質量分析によるスクリーニング法の開発を進める計画である。



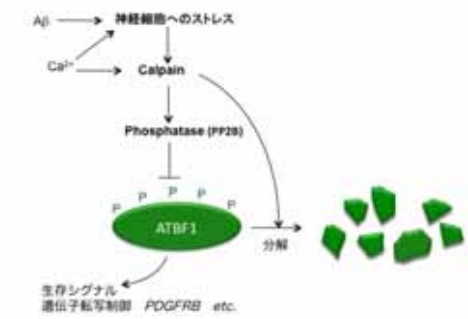
ATBF1 の siRNA で発現を抑制すると、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFRB)、インテグリン (ITGA8)、コラーゲン (COL3A1) などの細胞接着因子群の発現量が減少する。



A の刺激で ATBF1 の発現量が増加する。本来の核タンパク質としてではなく細胞質に異常タンパク質としてアルツハイマー病患者の脳組織で観察される。



細胞外に漏出する ATBF1 は 404-kDa ではなく小分子量断片として観察される。髄液サンプルを解析した結果、アルツハイマー病患者由来のサンプルで小分子量に切断された ATBF1 断片が増加していることが観察された。



生理的には ATBF1 は 404-kDa の核内タンパク質として PDGFRB などの遺伝子転写制御に寄与している。しかし神経細胞ストレスで、細胞質内でタンパク質分解酵素が活性化されると ATBF1 の分断化が進み、細胞外に漏出する形の ATBF1 断片を検出する。この断片を検出することは神経変性の細胞内部の兆候を捕らえる意味があり、アルツハイマー病の早期診断に役立つ。

研究体制

- ◆ **代表研究者**
〔名古屋市立大学・大学院医学研究科・分子神経生物学 准教授 三浦裕〕
- ◆ **研究者**
金泰善 (名古屋市立大学)、高楠 (名古屋市立大学)、董宇 (名古屋市立大学)、伊藤仁一 (名古屋市立大学)、長安祐子 (名古屋市立大学)、金澤智 (名古屋市立大学)、道川誠 (国立長寿医療センター)、鄭且均 (国立長寿医療センター)、赤津裕康 (福祉村病院長寿医学研究所)、川口誠 (独立行政法人労働者健康福祉機構 新潟労災病院)、福田哲也 (株式会社バイオシステクノロジーズ)、坂東泰彦 (株式会社バイオシステクノロジーズ)、西村俊秀 (株式会社バイオシステクノロジーズ)、橋口理宏 (株式会社 医学生物学研究所)、堀部卓郎 (株式会社 医学生物学研究所)、溝口信二 (株式会社 医学生物学研究所)、高浪貢士 (株式会社 医学生物学研究所)
- ◆ **共同研究機関**
国立長寿医療センター、福祉村病院長寿医学研究所、独立行政法人労働者健康福祉機構 新潟労災病院、株式会社バイオシステクノロジーズ、株式会社 医学生物学研究所

■ 研究期間

平成21年4月1日 ~ 平成33年3月31日