

2005-00362B

厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究

平成16～17年度 総合研究報告書

主任研究者 石神 昭人

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究 ----- 1

石神 昭人

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 14

アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究

主任研究者 石神 昭人 東京都老人総合研究所・老化制御・主任研究員

研究要旨

アルツハイマー病（AD）での特徴的な病理所見としてアミロイドベータ蛋白質（A β ）が蓄積した老人斑やリン酸化タウ蛋白質が蓄積した神経原線維変化は有名である。これら蛋白質は、本来、正常な機能を果たしていたものがやがて様々な修飾を受け異常化し、神経細胞の内側や外側に蓄積したためと考えられる。異常蛋白質の蓄積は、アルツハイマー病をはじめ多くの神経変性疾患（神経難病）で観察される。我々は、アルツハイマー病の脳で蛋白質中のアルギニンという塩基性アミノ酸がシトルリンという中性アミノ酸に変換された異常な蛋白質（シトルリン化蛋白質と総称）が多く出現することを初めて見出した。本研究では、シトルリン化蛋白質やシトルリン化蛋白質産生酵素（ペプチジルアルギニンデアミナーゼ；PAD）を高感度に検出するELISAシステム（酵素免疫測定法）を開発し、アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査試薬を開発する。また、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の引き金となるか明らかにする。

初年度（2年計画の1年目）の研究により、アルツハイマー病の脳では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度（Braak Stageにより評価）に応じてその量が増加することを明らかにした（Ishigami, A. et al. *J. Neurosci. Res.* **80** 120-128 (2005)）。免疫組織染色により、シトルリン化蛋白質陽性細胞は、主に反応性アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどのグリア細胞であった。また、神経細胞の一部も染色された。同時に、アミロイドベータ蛋白質（A β ）やリン酸化タウに対する抗体を用いた連続切片による免疫組織染色を行った。その結果、A β 陽性の老人斑やリン酸化タウ陽性の神経原線維変化とシトルリン化蛋白質陽性の染色部位が良く一致した。A β やリン酸化タウがシトルリン化されているかは未だ明らかではない。更に、シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析により、アルツハイマー病の脳では、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)、ビメンチンがシトルリン化されていることも同定した。これらの研究成果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の発症や進行に深く関与していることを強く示唆している

次年度（2年計画の2年目）は、アルツハイマー病の早期診断を行うELISAシステムを開発するため、PADやシトルリン化蛋白質に対する多種多様なモノクローナル抗体を作製した。PADに対するモノクローナル抗体は約30種類確立した。検出感

度の高いELISAシステムを開発するため、特異性の高い固相抗体、標識抗体の組み合わせを検討している。更に、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の引き金となるか明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによるPADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析した。PADの酵素活性発現には、高濃度カルシウムイオンを必要とする。酸化ストレスは、一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、細胞死（アポトーシス）を誘導する。アルツハイマー病の原因の一つにも挙げられる。今回、神経細胞やグリア細胞に様々な酸化ストレスを与えたところ、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。これらの結果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の引き金となる可能性を強く示唆している。

これら研究成果から、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の発症や進行に深く関与する可能性を強く示唆する多くのデータを得た。更に、神経細胞やグリア細胞を用いた基礎研究からもシトルリン化蛋白質が早期細胞障害時に出現することは明らかである。従って、PAD、シトルリン化蛋白質のELISAシステムはアルツハイマー病の早期診断薬に成りうる可能性が高い。

【研究組織】

分担研究者

石神 昭人 東京都老人総合研究所・
主任研究員

半田 節子 東京都老人総合研究所・
研究助手

久保 幸穂 東京都老人総合研究所・
研究助手

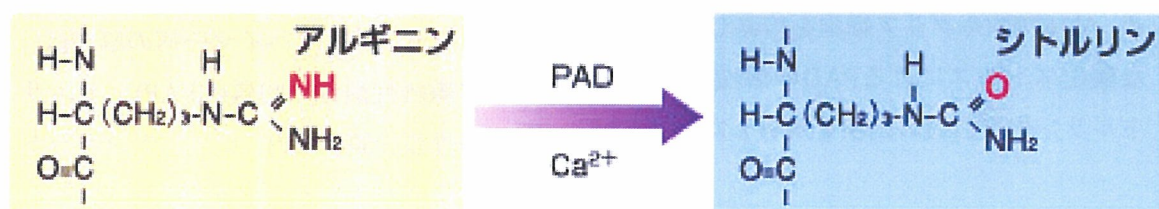
A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) での特徴的な病理所見としてアミロイドベータ蛋白質 (A β) が蓄積した老人斑やリン酸化タウ蛋白質が蓄積した神経原線維変化は有名である。これら蛋白質は、本来、正常な機能を果たしていたものがやがて様々な修飾を受け異常化し、神経細胞の内側や外側に蓄積したためと考えられる。異常蛋白質の蓄積は、アルツハイマー病をはじめ多くの神経変性疾患 (神経難病) で観察される。我々は、アルツハイマー病の脳で蛋白質中のアルギニンという塩基性アミノ酸がシトルリンという中性アミノ酸に変換された異常な蛋白質 (シトルリン化蛋白質と総称) が多く出現することを初めて見出した (Ishigami, A. et al. *J. Neurosci. Res.* **80** 120-128 (2005))。元来、シトルリンは、遺伝暗号にないアミノ酸である。従って、DNAから蛋白質が合成される過程でシトルリンが挿入される可能性はない。我々は、アルギニンをシトルリンに変換する酵素も同定した (Ishigami, A. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* **407** 25-31 (2002))。この酵素は、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、正常な脳では PAD 酵素の反応産物であるシトルリン化蛋白質はほとんど存在しない (Asaga, H. and Ishigami, A. *Neurosci. Lett.* **299** 5-8 (2001))。その理由は、PAD の酵素活性の発現に、1 mM 以上の高いカルシウム濃度を必要とするからである。通常、細胞内のカルシウム濃度は 0.1 μ M 程度に低く抑えられている。我々は、シトルリン化蛋白質が生ずる機構として酸化ストレス、脳虚血、老化を想定している。特に酸化ストレスはアルツハイマー病の原因のひとつにも挙げられる。神経細胞やそれを支えるグリア細胞は酸化ストレスを受けると一過的に細胞内カルシウム濃度が上昇する。細胞内カルシウム濃度の上昇は PAD を活性化し、シトルリン化蛋白質を産生する。アルツハイマー病の進行とシトルリン化蛋白質の蓄積には密接な関係が予想される。

本研究では、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の引き金となるか明らかにする。即ち、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによる PAD の活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析する。また、シトルリン化蛋白質や PAD を高感度に検出する ELISA システム (酵素免疫測定法) を確立し、アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査試薬を開発する。シトルリン化蛋白質が早期細胞障害時に出現することからアルツハイマー病の早期診断薬に成りうる可能性が高い。

シトルリン化蛋白質 ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) により 構成アミノ酸のアルギニンがシトルリンに変換される



B. 研究方法

① シトルリン化蛋白質の病理学的解析

シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の進行程度 (Braak Stage)により評価) に応じて蓄積するか明らかにするため、シトルリン化蛋白質の免疫組織染色を行った。シトルリン化蛋白質は、我々が開発した抗シトルリン抗体、化学修飾法を用いて高感度に検出した。また、PADやアルツハイマー病関連蛋白質、アミロイドベータ蛋白質 (A β) やリン酸化タウについても同様に解析した。

② プロテオーム解析

アルツハイマー病の脳に蓄積するシトルリン化蛋白質を同定するため、二次元電気泳動法、質量分析計を用いたプロテオーム解析を行った。プロテオーム解析は、研究所内プロテオーム共同研究センターと共同で行った。

③ アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査試薬の開発

シトルリン化蛋白質の出現がアルツハイマー病の発症要因であるならば、発症前の患者血清、脳脊髄液中には、シトルリン化蛋白質やPADが存在する。従って、これら蛋白質を検出する臨床検査試薬はアルツハイマー病の早期診断薬に成りうる。そのため、シトルリン化蛋白質やPADに対するモノクローナル抗体を多数、作製した。

④ アルツハイマー病の発症機序の解明

シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の引き金となるか明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによるPADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析した。

(倫理面への配慮)

アルツハイマー病の患者脳は東京都老人医療センター、東京都老人総合研究所共同の国内唯一のブレインバンクより供与された。本研究は、東京都老人総合研究所倫理委員会、東京都老人医療センター倫理委員会の承認を得ている。また、本研究では、死後剖検脳を用いる。個人の情報は公表しない。遺族の同意を得る。病院の承諾書を得る。剖検同意書の範囲内で実施する。研究により生じた対象者への不利益及び危険性はない。など倫理面において最大の配慮を行い、倫理面の問題がないと判断した

C. 研究結果

① シトルリン化蛋白質の病理学的解析

免疫組織染色により、アルツハイマー病の脳では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度 (Braak Stage)により評価) に応じてその量が増加することを明らかにした。強染された細胞は、主に反応性アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどのグリア細胞であった。また、神経細胞の一部も染色された。同時に、アミロイドベータ蛋白質 (A β) やリン酸化タウに対する抗体を用いた連続切片による免疫組織染色を行った。その結果、A β 陽性の老人斑やリン酸化タウ陽性の神経原線維変化とシトルリン化蛋白質陽性の染色部位が良く一致した。A β やリン酸化タウがシトルリン化されているかは未だ明らかではない。

② プロテオーム解析

シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析により、アルツハイマー病の脳では、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)、ビメンチンがシトルリン化されていることを同定した。抗シト

ルリン抗体を用いた解析から、これら以外にも多数のシトルリン化蛋白質を検出した。シトルリン化GFAP、MBP、ビメンチンの特異的に検出するELISAシステムはアルツハイマー病に特異的な臨床検査試薬に成りうる。

③ アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査試薬の開発

アルツハイマー病の早期診断を行うELISAシステムを開発するため、PADやシトルリン化蛋白質に対する多種多様なモノクローナル抗体を作製した。PADに対するモノクローナル抗体は約30種類確立した。検出感度の高いELISAシステムを開発するため、特異性の高い固相抗体、標識抗体の組み合わせを検討中である。

④ アルツハイマー病の発症機序の解明

シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の引き金となるか明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによるPADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析した。PADの酵素活性発現には、高濃度カルシウムイオンを必要とする。酸化ストレスは、一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、細胞死（アポトーシス）を誘導する。アルツハイマー病の原因のひとつにも挙げられる。神経細胞やグリア細胞に様々な酸化ストレスを与えたところ、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。これらの結果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の引

き金となる可能性を強く示唆している。

D. 考察

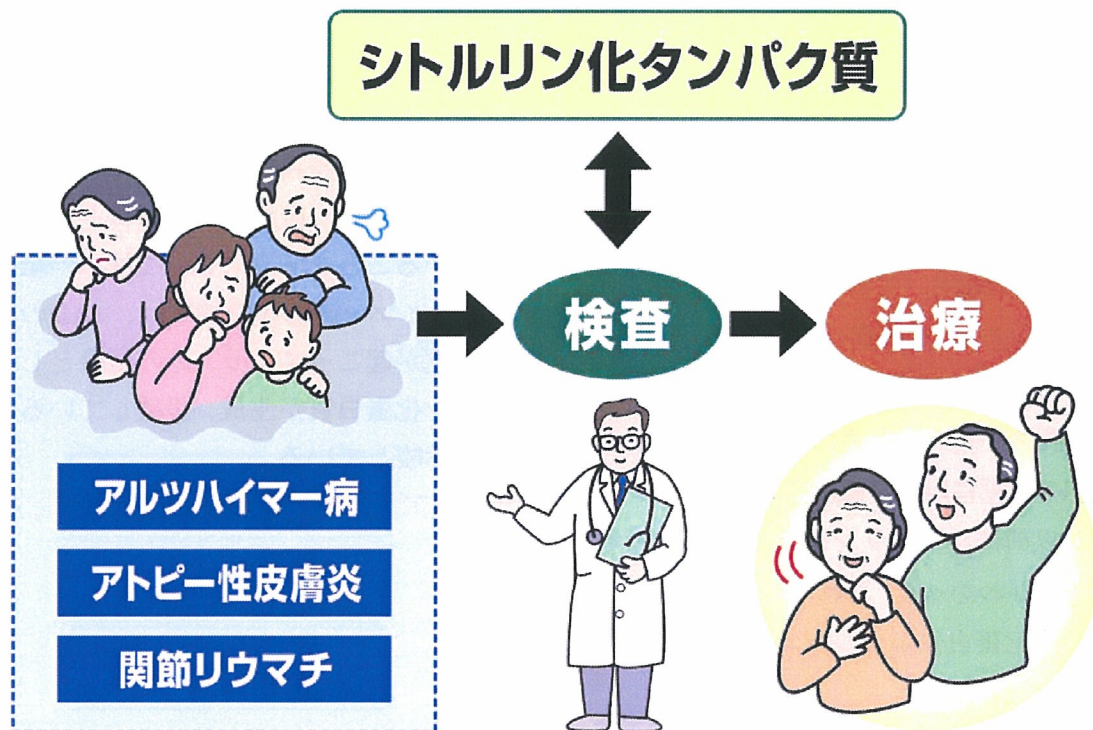
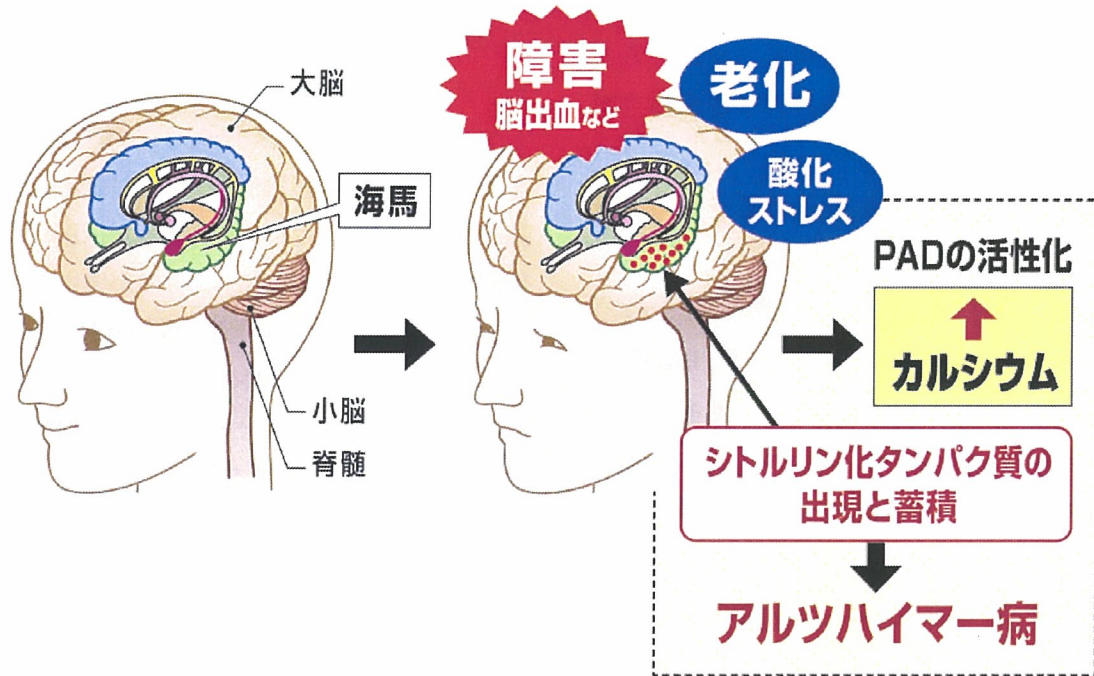
今までの研究成果から、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の発症や進行に深く関与している可能性を強く示唆する多くのデータを得た。また、神経細胞やグリア細胞を用いた基礎研究からもシトルリン化蛋白質が早期細胞障害時に出現することは明らかである。従って、PAD、シトルリン化蛋白質のELISAシステムはアルツハイマー病の早期診断薬に成りうる可能性が高い。2年という研究期間内に期待される十分な研究成果を得た。

E. 結論

アルツハイマー病患者の脳では、シトルリン化蛋白質が多く存在することを明らかにした。また、 $A\beta$ 陽性の老人斑やリン酸化タウ陽性の神経原線維変化とシトルリン化蛋白質陽性の染色部位が良く一致した。一方、正常脳では、シトルリン化蛋白質は、ほとんど検出されなかった。

シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析により、アルツハイマー病患者の脳では、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)、ビメンチンがシトルリン化されていることを同定した。これらの結果は、アルツハイマー病患者の脳では、PADの異常な活性化が起こっており、その結果としてシトルリン化蛋白質が生成、蓄積していることを強く示唆している。

シトルリン化タンパク質とアルツハイマー病



F. 研究発表

1. 論文発表

Ishigami, A., Kondo, Y., Nanba, R., Ohsawa, T., Handa, S., Kubo, S., Akita, M. and Maruyama, N. : SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 575-580 (2004)

Mori, T., Ishigami, A., Seyama, K., Onai, R., Kubo, S., Shimizu, K., Maruyama, N. and Fukuchi, Y. : Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of senile lung. *Pathol. Int.* 54 167-173 (2004)

Kondo, Y., Ishigami, A., Kubo, S., Handa, S., Gomi, K., Hirokawa, K., Kajiyama, N., Chiba, T., Shimokado, K. and Maruyama, N. : Senescence marker protein-30 is a unique enzyme that hydrolyzes diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) in the liver. *FEBS Lett.* 570 57-62 (2004)

Maruyama, N., Ishigami, A., Kuramoto, M., Handa, S., Kubo, S., Imasawa, T., Seyama, K., Shimosawa, T., Kasahara, Y. : Senescence Marker Protein-30 Knockout Mouse as an Aging Model. *Ann. NY Acad. Sci.* 1019 383-387 (2004)

Feng, D., Kondo, Y., Ishigami, A., Kuramoto, M., Machida, T., Maruyama, N. : Senescence Marker Protein-30 as a Novel Antiaging Molecule. *Ann. NY Acad. Sci.* 1019 360-364 (2004)

Matsuyama, S., Kitamura, T., Enomoto, N., Fujita, T., Ishigami, A., Handa, S., Maruyama, N., Zheng, D., Ikejima, K., Takei, Y. and Sato, N. : Senescence marker protein-30 (SMP30)

regulates Akt activity and contributes to cell survival in Hep G2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 386-390 (2004)

Jung, K.J., Ishigami, A., Maruyama, N., Takahashi, R., Goto, S., Yu B.P. and Chung, H.Y. : Modulation of gene expression of SMP-30 by LPS and calorie restriction during aging process. *Exp. Gerontol.* 39 1169-1177 (2004)

Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N. and Maruyama, N. : Abnormal accumulation of deiminated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 80 120-128 (2005)

Ishigami, A., Fujita, T., Inoue, H., Handa, S., Kubo, S., Kondo, Y. and Maruyama, N. : Senescence Marker Protein-30 (SMP30) induces formation of microvilli and bile canaliculi in Hep G2 cells. *Cell & Tissue Res.* 320 243-249 (2005)

Ishii, K., Tsubaki, T., Fujita, K., Ishigami, A., Maruyama, N., Akita, M. : Immunohistochemical localization of senescence marker protein-30 (SMP30) in the submandibular gland and ultrastructural changes of the granular duct cells in SMP30 knockout mice. *Histol. Histopathol.* 20 761-768 (2005)

Feng, D., Imasawa, T., Nagano, T., Kikkawa, M., Takayanagi, K., Ohsawa, T., Akiyama, K., Ishigami, A., Toda, T., Mitarai, T., Machida, T. and Maruyama, N. : Citrullination preferentially

proceeds in glomerular Bowman's capsule and increases in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 68 84-95 (2005)

Jung, K.J., Maruyama, N., Ishigami, A., Yu, B.P. and Chung, H.Y. : The redox-sensitive DNA binding sites responsible for the age-related down-regulation of SMP30 by the ERK pathway and its reversal by calorie restriction. *Antioxidants & Redox Signaling* (in press)

Son, T.G., Zou, Y., Jung, K.J., Je, J.H., Yu, B.P., Ishigami, A., Maruyama, N. and Lee, J. : The increased protein oxidation and the altered expression of Ca²⁺ regulatory proteins in senescence marker protein 30 deficient brain. *Mech. Aging Dev.* (in press)

Yumura, W., Imasawa, T., Suganuma, S., Ishigami, A., Handa, S., Kubo, S. and Maruyama, N. : Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice. *Histol. Histopathol.* (in press)

Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y., Handa, S., Kubo, S., Shimokado, K., Goto, S., Nishikimi, M., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Senescence Marker Protein 30 Functions as Gluconolactonase in L-Ascorbic Acid Biosynthesis and Its Knockout Mice Are Prone to Scurvy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (in press)

森貴紀、瀬山邦明、石神昭人、丸山直記、福地義之助 : Senescence marker protein-30 ノックアウトマウス. *分子呼吸器病* 9 55-60 (2005)

丸山直記、石神昭人、近藤嘉高 : 老化の分子異常～臨床検査医学への貢献. *臨床病理*

53 728-734 (2005)

石神昭人、山本尚吾、田口ひろみ、丸山直記 : アルツハイマー病でのシトルリン化蛋白質の異常な蓄積. *日本未病システム学会雑誌* 11 84-85 (2005)

丸山直記、石神昭人 : 老年病におけるシトルリン化蛋白質の病態生理学的意義. *日本老年医学会雑誌* 42 519-522 (2005)

丸山直記、石神昭人 : タンパク質のシトルリン化と病態. *最新医学* 60 2498-2501 (2005)

2. 学会発表

石神昭人、半田節子、丸山直記 : 加齢指標蛋白質 SMP30 が持つ酸化ストレス抑制作用. 第 124 回日本薬学会, 大阪, 2004.3.29-31

丸山直記、石神昭人 : 老化抑制遺伝子 SMP30 欠損動物に出現する老化病態. 第 93 回 日本病理学会, 札幌, 2004.6.9-11

丸山直記、石神昭人 : アルツハイマー病の患者脳における脱イミノ化蛋白質. 第 93 回 日本病理学会, 札幌, 2004.6.9-11

今澤俊之、馮冬芸、石神昭人、永野忠相、高柳佳織、小澤孝宏、戸田年総、長田道夫、御手洗哲也、丸山直記 : 腎において糸球体ポーマン囊特異的に認められる脱イミノ化反応の解析. 第 93 回 日本病理学会, 札幌, 2004.6.9-11

今澤俊之、馮冬芸、石神昭人、大澤多加子、永野忠相、戸田年総、丸山直記、御手洗哲也 : 糸球体ポーマン囊特異的に認められる脱イミノ化蛋白質の同定. 第 47 回 日本腎臓学会, 宇都宮, 2004.6.27-29

石神昭人、田口ひろみ、小林沙織、大澤多加子、齊藤祐子、村山繁雄、丸山直記：アルツハイマー病の発症における脱イミノ化蛋白質の関与. 第 27 回日本基礎老化学会, 東京, 2004.6.17-18

近藤嘉高、石神昭人、下門顕太郎、丸山直記：SMP30 は肝臓で唯一の DFPase である. 第 27 回日本基礎老化学会, 東京, 2004.6.17-18

Taguchi, H., Ishigami, A., Kobayashi, S., Machida, T., Maruyama, N. : Abnormal accumulation of deiminated proteins in Alzheimer's disease. 第 77 回日本生化学会, 横浜, 2004.10.13-16

近藤嘉高、石神昭人、下門顕太郎、丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 における gluconolactonase 活性の同定. 第 77 回日本生化学会, 横浜, 2004.10.13-16

久保幸穂、重本和宏、石神昭人、半田節子、丸山直記：筋細胞におけるアセチルコリン受容体凝集の解析と応用. 第 11 回東京都老年学会, 東京, 2004.11.5

Ishigami, A., Taguchi, H., Kobayashi, S., Kondo, Y. Saito, Y. and Maruyama, N. : Abnormal accumulation of deiminated proteins in the hippocampus from Alzheimer's disease. The Society for Neuroscience 34rd Annual Meeting, San Diego, 2004.10.23-27

石神昭人、田口ひろみ、小林沙織、山本尚吾、浦野四郎、丸山直記: シトルリン化蛋白質とアルツハイマー病. 第 27 回日本分子生物学会, 横浜, 2004.12.8-11

石神昭人、丸山直記: アルツハイマー病でのシトルリン化蛋白質の異常な蓄積. 第 11 回日本未病システム学会, さいたま 2005.1.8-9

石神昭人、丸山直記：アルツハイマー病とシトルリン化蛋白質. 第 125 回日本薬学会, 東京, 2005.3.29-31

石神昭人：アルツハイマーとアトピーにひそむ謎のタンパク質. 「科学技術週間」参加行事特別講演 東京都老人総合研究所, 東京, 2005.4.21

石神昭人：加齢臓器障害発症における SMP30 の役割解明. 第 47 回日本老年医学会, 東京, 2005.6.15-17

石神昭人：老化研究の基礎と応用. 日本機械学会関東支部 第 12 期総会 ワークショップ, 埼玉, 2006.3.10-11

井内陽子、石神昭人、丸山直記、錦見盛光：ラットグルコノラクトナーゼの SMP30 としての同定. 日本ビタミン学会第 57 回大会, 三重, 2005.5.26-27

佐藤匡、石神昭人、佐藤安訓、丸山直記、森貴紀、児玉裕三、瀬山邦明、福地義之助: SMP30 ノックアウトマウスの肺におけるカルボニル化蛋白質量の加齢変化. 第 47 回日本老年医学会, 東京, 2005.6.15-17

佐藤安訓、石神昭人、佐藤匡、後藤佐多良、丸山直記: SMP30 ノックアウトマウスにおけるカルボニル化蛋白質の増加. 第 28 回日本基礎老化学会, 東京, 2005.6.15-17

近藤嘉高、石神昭人、下門顕太郎、丸山直記: SMP30 はグルコノラクトナーゼである. 第

28回日本基礎老化学会, 東京, 2005.6.15-17

今澤俊之、馮冬芸、田口ひろみ、町田武生、山本尚吾、久保幸穂、半田節子、石神昭人、丸山直記: 腎系球体ボウマン嚢におけるシトルリン化蛋白質の同定. 第28回日本基礎老化学会, 東京, 2005.6.15-17

青島拓也、石神昭人、高原英成、高坂哲也: マウス精子形成過程における新規蛋白質アルギニン脱イミノ化酵素(PAD6)の特異的発現とシトルリン化蛋白質の証明. 第98回日本繁殖生物学会, 静岡, 2005.9.14-16

Handa, S., Kubo, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Senescence marker protein-30 (SMP30) protects oxidative stress. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Kondo, Y., Inai, Y., Nishikimi, M., Shimokado, K., Maruyama, N., Ishigami, A. : Recombinant rat SMP30 protein expressed in *E. coli* using a chaperon co-expression system exhibits gluconolactonase activity. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Sato, Y., Inai, Y., Nishikimi, M., Goto, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : SMP30-knockout mouse is a L-ascorbic acid deficiency mouse. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Inai, Y., Sato, Y., Maruyama, N., Ishigami, A., Nishikimi, M. : *In vivo* evidence that SMP30 is gluconolactonase functioning in L-ascorbic acid biosynthesis. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Yamamoto, S., Fukai, N., Urano, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Oxidative stress induces

citrullinated proteins in SH-SY5Y cells. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

山本尚吾、浦野四郎、丸山直記、石神昭人: SH-SY5Y細胞における酸化ストレス誘導シトルリン化蛋白質の解析. 第29回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会, 神戸, 2005.10.26-27

Kondo, Y., Shimokado, K., Maruyama, N., Ishigami, A. : Multiple functions of Senescence Marker Protein-30 (SMP30). The 7th KOREA-JAPAN Joint Symposium on Cancer and Aging Research, Muju, Korea, 2005.11.3-5

Ishigami, A., Yamamoto, S., Kubo, S., Handa, S., Fukai, N., Yucho, Y., Taguchi, H., Saito, Y., Murayama, S. and Maruyama, N. : Citrullinated proteins and Alzheimer's disease. The Society for Neuroscience 35rd Annual Meeting, Washigton D.C., 2005.11.12-16

Kitamura, T., Enomoto, N., Matsuyama, S., Zheng, D., Ikejima, K., Takei, Y., Fujita, T., Ishigami, A., Handa, S., Mauryama, N., Satao, N. : Aging and hepatocyte apoptosis: role of senescence marker protein-30 (SMP30). Internationa Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Liver Pathophysiology, Tokyo, 2005.11.16-17

Inai, Y., Sato, Y., Kondo, Y., Maruyama, N., Ishigami, A., Nishikimi, M. : Senescence marker protein-30 functions as gluconolactonase in ascorbic acid biosynthesis. International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, Awaji, Japan, 2005.11.6-11

井内陽子、佐藤安訓、丸山直記、石神昭人、
錦見盛光 : Senescence Marker Protein-30
(SMP30) はアスコルビン酸合成経路で働く
グルコノラクトナーゼである-ノックアウト
マウスを用いた証明-. 第118回ビタミンC研
究委員会, 東京, 2005.11.19

近藤嘉高、佐藤安訓、井内陽子、錦見盛光、
丸山直記、石神昭人 : ラットグルコノラク
トナーゼのSMP30としての同定 (続報) . 第
118回ビタミンC研究委員会, 東京,
2005.11.19

佐藤安訓、井内陽子、後藤佐多良、錦見盛光、
丸山直記、石神昭人 : SMP30ノックアウトマ
ウスにおける酸化ストレスの亢進. 第118回
ビタミンC研究委員会, 東京, 2005.11.19

石神昭人、佐藤安訓、井内陽子、近藤嘉高、
半田節子、久保幸穂、後藤佐多良、錦見盛光、
丸山直記 : SMP30 ノックアウトマウス-ビ
タミン C 欠乏、壊血病モデルマウス-. 第
126回日本薬学会, 仙台, 2006.3.28-30

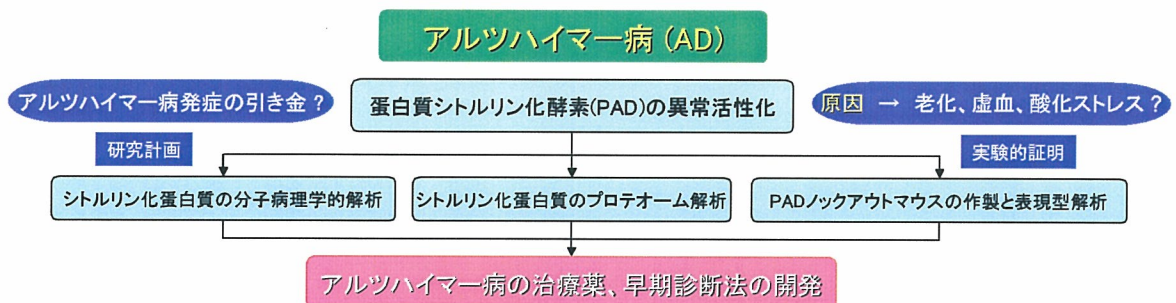
II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

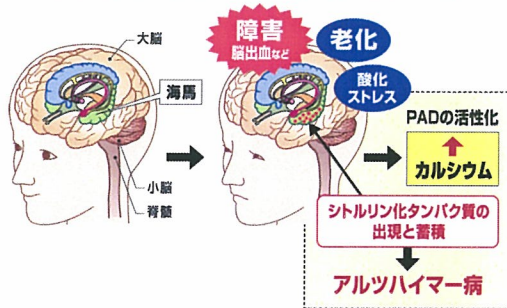
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N., Maruyama, N.	Abnormal accumulation of deiminated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease.	J. Neurosci. Res	80	120-128	2005
Feng, D., Imasawa, T., Nagano, T., Kikkawa, M., Takayanagi, K., Ohsawa, T., Akiyama, K., Ishigami, A., Toda, T., Mitarai, T., Machida, T., Maruyama, N.	Citrullination preferentially proceeds in glomerular Bowman's capsule and increases in obstructive nephropathy.	Kidney Int.	68	84-95	2005
丸山直記、 石神昭人	タンパク質のシトルリン化と病態	最新医学	60	2498-2501	2005
石神昭人、 山本尚吾、 田口ひろみ、 丸山直記	アルツハイマー病でのシトルリン化蛋白質の異常な蓄積	日本未病システム学会雑誌	11	84-85	2005
丸山直記、 石神昭人	老年病におけるシトルリン化蛋白質の病態生理学的意義	日本老年医学会雑誌	42	519-522	2005

丸山直記、 石神昭人、 近藤嘉高	老化の分子異常～臨床 検査医学への貢献	臨床病理	53	728-734	2005
石神昭人、 丸山直記	シトルリン化蛋白質と 関節リウマチ	医学のあゆ み	211	253-254	2004

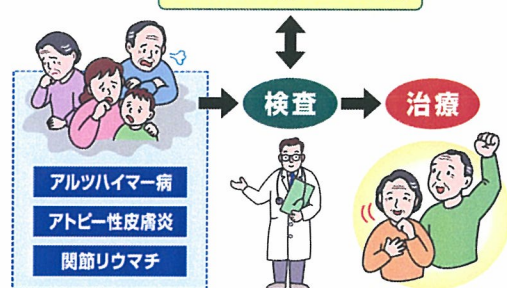
アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発



シトルリン化タンパク質とアルツハイマー病



シトルリン化タンパク質



東京都老人総合研究所 老化制御 石神昭人

Abnormal Accumulation of Citrullinated Proteins Catalyzed by Peptidylarginine Deiminase in Hippocampal Extracts From Patients With Alzheimer's Disease

Akihito Ishigami,^{1*} Takako Ohsawa,² Masaharu Hiratsuka,³ Hiromi Taguchi,¹ Saori Kobayashi,¹ Yuko Saito,⁴ Shigeo Murayama,⁴ Hiroaki Asaga,⁵ Tosifusa Toda,⁶ Narimichi Kimura,² and Naoki Maruyama¹

¹Department of Molecular Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

²Cellular Signaling Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

³Department of Molecular and Cell Genetics, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Tottori-shi, Tottori, Japan

⁴Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

⁵Biological Science Laboratory, Meiji University, Suginami-ku, Tokyo, Japan

⁶Proteomics Collaboration Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

Citrullinated proteins are the products of a posttranslational process in which arginine residues undergo modification into citrulline residues when catalyzed by peptidylarginine deiminases (PADs) in a calcium ion-dependent manner. In our previous report, PAD2 expressed mainly in the rat cerebrum became activated early in the neurodegenerative process. To elucidate the involvement of protein citrullination in human neuronal degeneration, we examined whether citrullinated proteins are produced during Alzheimer's disease (AD). By Western blot analysis with antimodified citrulline antibody, citrullinated proteins of varied molecular weights were detected in hippocampal tissues from patients with AD but not normal humans. Two of the citrullinated proteins were identified as vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) by using two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. Interestingly, PAD2 was detected in hippocampal extracts from AD and normal brains, but the amount of PAD2 in the AD tissue was markedly greater. Histochemical analysis revealed citrullinated proteins throughout the hippocampus, especially in the dentate gyrus and stratum radiatum of CA1 and CA2 areas. However, no citrullinated proteins were detected in the normal hippocampus. PAD2 immunoreactivity was also ubiquitous throughout both the AD and the normal hippocampal areas. PAD2 enrichment coincided well with citrullinated protein positivity. Double immunofluorescence staining revealed that citrullinated protein- and PAD2-positive cells also coincided with GFAP-positive cells, but not all GFAP-positive cells were positive for PAD2. As with GFAP, which is an astrocyte-specific marker protein, PAD2 is distributed mainly in astrocytes. These collective results, the

abnormal accumulation of citrullinated proteins and abnormal activation of PAD2 in hippocampi of patients with AD, strongly suggest that PAD has an important role in the onset and progression of AD and that citrullinated proteins may become a useful marker for human neurodegenerative diseases. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Alzheimer's disease; astrocyte; citrulline; glial fibrillary acidic protein; PAD; vimentin

Numerous proteases and posttranslational modification enzymes participate in neurodegeneration, such as that in patients with Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (Keller et al., 2000; Maccioni et al., 2001). However, little attention has been paid to one such group of agents, peptidylarginine deiminases (PADs; EC 3.5.3.15; Rogers and Simmonds, 1958; Kubilus et al., 1980; Kubilus and Baden, 1983; Ishigami et al., 1996). PADs are a group of posttranslational modification enzymes that citrullinate (deiminate) protein arginine residues in a calcium ion-dependent manner, yielding citrulline residues. Enzymatic citrullination abolishes positive charges of native protein molecules, inevitably causing significant alterations in their structure and functions (Lamensa and Moscarello, 1993; Imparl et al., 1995; Tarcsa et al., 1996). In mammalian tissues, PADs are found as

*Correspondence to: Akihito Ishigami, PhD, Department of Molecular Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan. E-mail: ishigami@tmig.or.jp

Received 4 October 2004; Revised 22 December 2004; Accepted 4 January 2005

Published online 9 February 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20431

TABLE I. Subject Demographic Data*

	Age (years)	PMI (hr)	Gender	BW (g)	Braak stage	
					NFT	SP
AD	84.5 ± 1.4	7.9 ± 2.1	3 M/7 F	1,104 ± 99	VI (10)	C (10)
Control	79.2 ± 1.6	6.5 ± 2.4	5 M/4 F	1,226 ± 31	I (9)	0 (6), A (3)

*Data are expressed as mean ± SEM. Parentheses indicated the number of subject. PMI, post-mortem interval; BW, brain weight; NFT, neurofibrillary tangle; SP, senile plaque; AD, Alzheimer disease.

five different isoforms (i.e., types 1–4, 6), which differ in specificity for various synthetic substrates, such as benzoyl-L-arginine ethyl ester and benzoyl-L-arginine, and in tissue distribution (Watanabe et al., 1988; Terakawa et al., 1991; Chavanas et al., 2004). All these isoforms display nearly identical amino acid sequences (Watanabe and Senshu, 1989; Tsuchida et al., 1993; Nishijyo et al., 1997; Ishigami et al., 1998; Nakashima et al., 1999; Rušđ et al., 1999), but they appear to be dissimilar in tissue-specific expression, as evidenced by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Ishigami et al., 2001). Among them, only PAD2 has been proved to be an occupant of the rat central nervous system (Kubilus and Baden, 1983; Watanabe et al., 1988; Terakawa et al., 1991). Immunocytochemical studies have localized PAD2 in glial cells, especially astrocytes (Vincent et al., 1992; Asaga and Ishigami, 2000, 2001), microglial cells (Vincent et al., 1992; Asaga et al., 2002), and oligodendrocytes (Akiyama et al., 1999). Because citrullinated proteins were rarely located in the enzyme-positive glial cells examined with our sensitive detection method (Senshu et al., 1992), we assumed that PAD2 is normally inactive (Asaga and Ishigami, 2000, 2001; Asaga et al., 2002). However, glial fibrillary acidic protein (GFAP) was highly susceptible to the attack of PAD2 in excised rat brains deliberately left at room temperature (Asaga and Senshu, 1993). These findings provided a clue that PAD2 normally remains inactive but becomes active and citrullinates cellular proteins when the intracellular calcium balance is upset during neurodegenerative changes.

The pathological presentation of AD involves the selective death of pyramidal neurons and an accumulation of two main abnormal protein aggregates, senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs; Katzman, 1986; Smith, 1998). Although NFTs and SPs are found in many areas of the cerebrum, they are concentrated mainly in the hippocampus and cerebral cortex. The former site actually appears to be more important, since pathological indices are first localized in that region (Maccioni et al., 2001). Our previous report indicates that levels of PAD2 are more than threefold higher in the hippocampus than in the cortex of rat brains (Asaga and Ishigami, 2000). Moreover, PAD2 activates and citrullinates various cerebral proteins under hypoxic conditions (Asaga and Ishigami, 2000) and during kainic acid-evoked neurodegeneration (Asaga and Ishigami, 2001; Asaga et al., 2002), suggesting the involvement of protein citrullination in neurodegenerative processes. The present study was therefore designed to test the hypothesis that PAD2 plays a role in AD and that citrullinated proteins

are active participants in the neurodegenerative process, particularly in the hippocampus.

MATERIALS AND METHODS

Human Subjects

Brain specimens used in this study were removed at autopsy from 10 patients with AD (seven women and three men) and nine (four women and five men) normal subjects. The subjects' demographic data are summarized in Table I. Specimens were taken from the hippocampus and divided into two parts. One part was fixed with 4% paraformaldehyde and processed for paraffin embedding. Another part was immediately frozen in dry ice. All AD patients met accepted criteria for the neuropathologic diagnosis of AD based on the National Institute of Aging (NIA)-Reagan Institute Criteria for the Neuropathological Diagnosis of AD (1997), combining abundant neuritic plaques in the neocortex (definite AD with Consortium to Establish a Registry for AD Criteria) and a profusion of NFTs in the limbic and neocortical areas (Braak and Braak stage VI). Normal subjects used as controls were individuals with no history of dementia or other neurologic disorders. Neuropathologic evaluation of control brains revealed only age-associated gross and histopathologic alterations (Braak and Braak NFT stage I and senile plaque stage 0 or A). The human studies were approved by the Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (TMIG) Review Boards.

Preparation of Tissue Samples

Frozen hippocampi of AD and control subjects' brains were homogenized in a lysis buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1% NP-40) with a Polytron homogenizer. For sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), an aliquot of the homogenates was mixed with an equal volume of 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.005% bromophenol blue (sample buffer) and heated in boiling water for 5 min. The protein content of cell homogenates was measured by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as a standard.

Detection of Citrullinated Proteins

Citrullinated proteins were detected by Western blotting as described previously (Senshu et al., 1992). Briefly, equal amounts of protein (10 µg/lane) were separated by SDS-PAGE on vertical slab 10% acrylamide gels (1 mm × 9 cm) by the method of Laemmli (1970). Proteins were then electrophoretically transferred from acrylamide gels onto a membrane of poly-

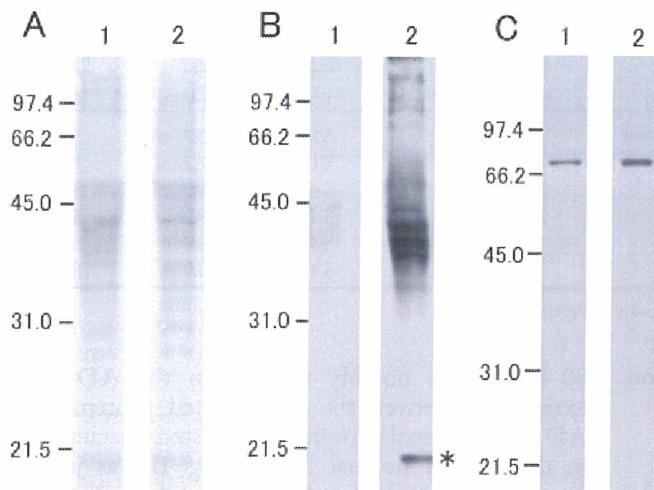


Fig. 1. Western blot analysis of citrullinated proteins and PAD2 in the hippocampus of AD and control brain. Tissue homogenates (10 μ g) were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. **A:** Typical protein profiles detected by amido black staining. **B:** Citrullinated protein profiles detected as described in Materials and Methods. **C:** Immunoreactive PAD2 profiles. Lane 1, age-matched control; lane 2, AD. Asterisks indicate the citrullinated MBP.

vinylidene difluoride (PVDF; Millipore, Billerica, MA) by the method of Towbin et al. (1979). Citrulline residues on the membrane were modified by overnight incubation at 37°C in modification medium [1 volume of 1% diacetyl monoxime/0.5% antipyrine/1 N acetic acid, and two volumes of a mixture of 85% H_3PO_4 /98% H_2SO_4 / H_2O (20/25/55) containing 0.025% $FeCl_3$]. The membrane was then incubated successively with antimodified citrulline IgG antibody produced in a rabbit and with purified (Senshu et al., 1992), horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad, Hercules, CA). Chemiluminescence signals were detected on Kodak XAR films with ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Proteome Analysis

Protein extraction and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) were performed as reported previously (Toda et al., 1998; see also <http://proteome.tmg.or.jp/2D/2DE.method.html>). Briefly, 100 mg of tissue sample were crushed in liquid nitrogen and lysed with 300 μ l of 5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 1% Pharmalyte (pH 3–10; Amersham Bioscience), 1% dithiothreitol (DTT), and 1% proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) with sonication. One hundred micrograms of protein were loaded onto gel strips with an immobilized pH gradient (pH 4–7; 18 cm; Amersham Biosciences), and isoelectric focusing was performed on a Cool-PhoreStar model 3610 (Anatech, Tokyo, Japan). After isoelectric focusing, strips were equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M urea, 2 M thiourea, 2% SDS, 30% glycerol, and 1% DTT for 30 min and then with the same solution containing 4% iodoacetamide instead of DTT for 30 min. Each equilibrated strip was mounted on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and fixed

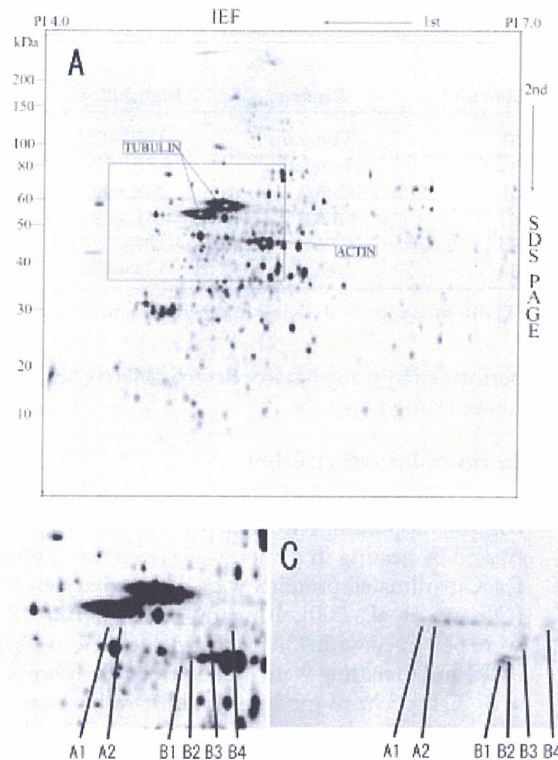


Fig. 2. Proteome analysis of citrullinated proteins in the hippocampus of AD brain. **A:** Two-dimensional protein profiles of the AD hippocampus. Proteins were separated on the basis of pI (x-axis) and molecular mass (y-axis). Spots were visualized with Sypro Ruby gel staining. IEF, isoelectric focusing. Tubulin and actin were identified by peptide mass fingerprinting and a subsequent database search. **B:** Enlarged proteins of AD hippocampus from 2-DE gels indicated as a rectangular area in A. **C:** Western blot analysis of citrullinated proteins from 2-DE gels indicated as rectangular area in A. Numbered spots were identified by mass spectrometry.

with shark-tooth combs. SDS-PAGE was performed on a vertical format using a Tricine buffer system. After second-dimension electrophoresis, gels were fixed in 10% methanol and 6% acetic acid for 30 min, and protein spots were visualized by Sypro Ruby (Molecular Probes, Eugene, OR) staining, following the manufacturer's recommendations.

A square (8 \times 8 cm) containing tubulin was cut off from the gel slab and then applied to Western blots to detect the citrullinated proteins according to the method described above, because these citrullinated proteins were previously detected at the same position of tubulin on 2-DE using minislab gel (8 \times 8 cm). At this time, the citrullinated proteins were detected by using the highly sensitive reagent ECL Advance (Amersham Bioscience). Thereafter, the protein spots visualized with Cypro Ruby and matched with the citrullinated proteins were excised with a Proteome-Works Spot Cutter (Bio-Rad) followed by in-gel digestion with trypsin according to the manufacturer's specifications. The digested peptide was directly mixed with an equal volume of 10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, and peptide mass spectra were obtained on an AXIMA-CFR MALDI-TOF-MASS (Shimadzu, Kyoto, Japan) platform. Peptide mass mapping was

TABLE II. Proteins Identified From 2-DE Gels of AD Hippocampus by MALDI-TOF Mass Spectrometry

Spot no. ^a	Protein	Probability	Sequence coverage (%)	NCBI accession Nos.	Theoretical value		Experimental value	
					pI	kDa	pI	kDa
A1	Vimentin	3.8E+02	68	CAA39600	5.1	53.7	5.1	49.2
A2	Vimentin	4.3E+02	71	CAA39600	5.1	53.7	5.1	49.1
B1	GFAP	3.1E+02	53	NP_002046	5.4	49.9	5.2	43.5
B2	GFAP	3.3E+02	57	NP_002046	5.4	49.9	5.2	44.8
B3	GFAP	3.2E+02	55	NP_002046	5.4	49.9	5.3	47.4
B4	GFAP	3.3E+02	60	NP_002046	5.4	49.9	5.3	49.9

^aThe numbering and lettering corresponding to the 2-DE gets image shown in Figure 2A.

performed by using Mascot Search (Matrix Science Ltd., London, United Kingdom).

Immunohistochemistry

The paraffin-embedded sections (6- μ m-thick) of AD and control hippocampi were deparaffinized, rehydrated, and pretreated by heating in a microwave oven for 10 min in citrate buffer. Citrullinated proteins were detected as described previously (Ohsawa et al., 2001; Ishigami et al., 2002a). Briefly, sections were postfixated with 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde, and then they were incubated in the modification medium at 37°C for 3 hr to modify citrulline residues in situ. Immunostaining of citrullinated proteins was performed with antimodified citrulline IgG and the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) using 3,3'-diaminobenzidine as a chromogenic substrate. Human PAD2 and GFAP were stained with rabbit anti-human PAD2 prepared as described previously (Ishigami et al., 2002b) and monoclonal antibodies to GFAP (Sigma-Aldrich), respectively. Sections were also subjected to hematoxylin staining for histological examinations. To evaluate the degree of citrullinated protein and PAD2 immunoreactivity, we used a scoring system, in which immunoreactivity was arbitrarily defined from grade 0 (no immunoreactivity detected) to grade 4 (the most intensive immunoreactivity detected). The scores obtained from 10 AD and nine control subjects were then averaged.

The citrullinated proteins, human PAD2 and GFAP, were detected with immunofluorescent labeling and confocal microscopy (LSM-510 laser scanning microscope; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Primary antibodies were visualized with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes).

Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM. The probability of statistical differences between experimental groups was determined by a Student's *t*-test, as indicated.

RESULTS

Identification and Characterization of Citrullinated Proteins in the Hippocampi of AD Patients and Normal Controls

Figure 1A shows total proteins in hippocampal extracts from brains of AD and normal individuals in which amido black staining delineated obviously different profiles. In particular, the protein bands between 30 and

50 kDa were notably smaller in the AD hippocampal extracts. Moreover, the citrullinated protein profile from AD hippocampal samples manifested species not detected in those from normal brains (Fig. 1B) as judged by the procedures described in Materials and Methods. In particular, a band migrating at approximately 20 kDa, which was previously shown to be myelin basic protein (MBP) in cultured oligodendrocytes (Akiyama et al., 1999), was present in relatively large quantities in the AD hippocampus but essentially undetectable in this region from normal brains. We confirmed the identity of this protein by immunoprecipitation using specific MBP antiserum (data not shown). Western blots of PAD2 revealed a single band migrating at approximately 75 kDa in hippocampal extracts from both normal and AD brains (Fig. 1C).

AD hippocampal proteins were further characterized by 2-DE (Fig. 2A). Because citrullinated proteins were detected in abundance migrating over 35 kDa, as shown in Figure 1B, the gel region outlined in Figure 2A was cut out (Fig. 2B), and the citrullinated proteins were subjected to Western blotting for identification. Figure 2C shows several of the AD hippocampal citrullinated proteins detected and identification of these proteins by peptide mass fingerprinting and a subsequent database search. These methods identified vimentin as proteins A1 and A2 and GFAP as proteins B1, B2, B3, and B4 (Table II). Some citrullinated proteins were visible throughout the gel (Fig. 2A), even outside the region cut out (data not shown).

Immunohistochemical Localization of Citrullinated Proteins and PAD2 in Hippocampal Regions and Cell Type

Figure 3A shows the regional localization of citrullinated proteins in the hippocampus of an AD brain. Citrullinated proteins were detected throughout the hippocampus, especially in the conjugation region between molecular layers of hippocampus and dentate gyrus as well as polymorphic layers of dentate gyrus and stratum radiatum of CA1 and CA2 areas. No such proteins were found in the granular layer of the dentate gyrus. Moreover, no citrullinated proteins at all were detected in a normal hippocampus (Fig. 3B). A scoring system adopted to evaluate the degree of citrullinated protein immunoreactivity in the hippocampus then revealed significantly greater immunoreactivity in the AD hippocampus than in its normal counterpart (Fig. 4A). In contrast, PAD2 immunoreactivity was detect-

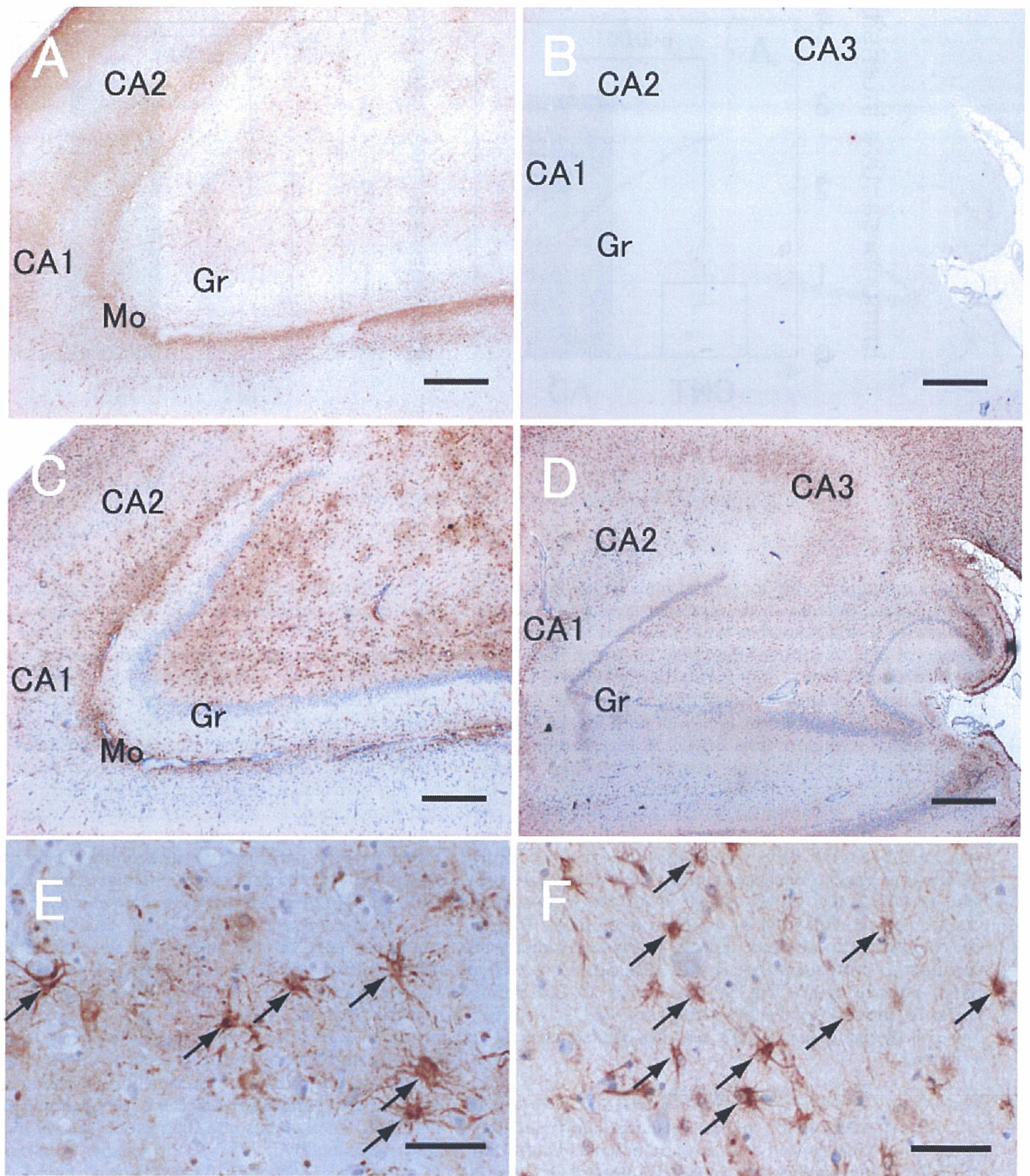


Fig. 3. Immunohistochemical staining of citrullinated proteins and PAD2. Hippocampal sections from AD (A,C) and control (B,D) brains were stained for citrullinated proteins (A,B) and PAD2 (C,D) as described in Materials and Methods. E: Higher magnification of A. Arrows indicate the citrullinated protein-positive cells. F: Higher magnification of C. Arrows indicate the PAD2-positive cells. Gr, granule cell layer; Mo, molecular cell layer. Scale bars = 500 μ m in A–D, 50 μ m in E,F.