

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19790605

研究課題名(和文) アルツハイマー病における糖タンパクの早期診断マーカーとしての臨床応用の検討

研究課題名(英文) A study of clinical utilization of glycoproteins as a early diagnostic marker of Alzheimer's disease.

研究代表者

谷口 美也子 (TANIGUCHI MIYAKO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50335527

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の血液中で糖鎖の変化している可能性の高い3種のタンパクについて、タンパクの同定とそれぞれの糖鎖の測定法を作製して糖鎖量を測定し、3種の糖タンパクのうちトランスフェリンともう1種の免疫系関連タンパクについてADの血液中で糖鎖量が増加していることを見出した。さらに、トランスフェリンのシアル酸は、ADの病初期にすでに増加していることを見出し、血液早期診断マーカーとしての可能性が高いことが分かった。免疫系関連タンパクについてはADとAD以外の認知症の鑑別診断ができる可能性が示唆され、また髄液中Aβと相関していることから脳内のAβの変化を血液でモニターできる指標でもあることが示唆され、優秀な血液診断マーカーとなりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously discovered that the glycosylation of three glycoproteins were altered in Alzheimer's disease (AD). In this study, we identified all glycoproteins, established the methods to quantify the sugars of each glycoproteins and measured glycosylation of them. Identified serum transferrin and immune system associated protein had altered quantities of several kinds of sugar in AD patients compared with non-demented control (NDC) groups. Sialic acid in Alzheimer's serum transferrin also changed in early stage of AD, which suggests the sialic acid of transferrin is an available serum diagnostic marker of AD. Immune system associated protein had altered sugars compared with not only NDC groups but also non-AD dementia groups, and correlated with cerebrospinal fluid amyloid β (Aβ). This glycoprotein is expected to be an efficient serum marker which can monitor the changes of Aβ in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	970,646	0	970,646
2008年度	429,354	128,806	558,160
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,200,000	668,806	3,868,806

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病、診断マーカー、トランスフェリン、糖タンパク、糖鎖、レクチン

1. 研究開始当初の背景

現在、65歳以上の認知症は10%、その1/2をアルツハイマー病(AD)が占めるとされて

いる。薬物による治療も発展しつつあり、また将来的な根本治療のためにも、ADを早期に、確実に、他の認知症と区別して診断し、発見

することが重要課題である。早期発見のためには周囲の気付きが重要であるが、初期症状の“もの忘れ”と加齢によるもの忘れ（生理的健忘）とを正確に見分けることが困難であり、本人も周りもその発症を見落としがちであることが大きな問題点である。さらに認知症の診断は、専門医に拠る特殊な検査、特殊で高額な検査機器を要し、そのような専門病院で患者が診察を受けようとする頃にはすでに認知症が進行していることが多い。そのため、専門医でなくても検査可能な、病態を反映した診断マーカーの普及が早期発見に貢献できると考えられる。

現在用いられているADの診断マーカーは、髄液中のアミロイドβタンパク（Aβ）と、総タウタンパクあるいはリン酸化タウタンパクである。しかし、Aβは必ずしも全てのADで減少しているわけではなく、また総タウタンパクとリン酸化タウタンパクでは、AD同様に神経変性疾患が引き起こされる疾患、特にタウオパチーと総称される疾患においても増加するという点が問題点である。

2. 研究の目的

我々は、現診断マーカーの問題を解決しうる新たな診断マーカー、特に早期に血液で診断できる診断マーカーを確立したいと考えて研究を行ってきた。その経緯の中で、実際に我々はADの髄液中でレクチン(WGA)に対する結合性が減少している糖タンパクを3種検出した。このことはADで糖タンパクの糖鎖に変化が起こっている可能性があることを示すため、その異常部位を特定することと診断マーカーとして確立するために測定方法を開発しさらに臨床的に早期診断マーカーとしての有効性を検証することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

3つの糖タンパクのうち、1つはトランスフェリンであることがすでに分かっている。そこで、その糖鎖測定方法の候補として、等電点電気泳動、クロマトフォーカシング、ELISA法、レクチンによるレクチンブロッティング、レクチンとトランスフェリン抗体を用いた酵素免疫法、レクチン親和電気泳動を候補として検討し、ADのトランスフェリンの糖鎖の異常を検出する方法を確立する。レクチンは、N-アセチルグルコサミン、シアル酸を認識するWGA、N-アセチルグルコサミンを認識するS-WGA、マンノースを認識するLCA、Con A、シアル酸を認識するSSAを用いる。測定方法が確立できた後、髄液、血液を用いて糖鎖量を測定し、髄液中のAβやリン酸化タウタンパクとの関連性、認知症の重症度との関連性を解

析し、マーカーとしての有効性について検討する。

残り2つの糖タンパクに関しては、まず質量分析によりタンパクを同定し、確立したトランスフェリンの糖鎖測定法を応用して同様に変化している糖鎖の測定と、実際に患者試料を用いてマーカーとしての有効性を検討する。

4. 研究成果

トランスフェリンの糖鎖測定法として、SSAレクチンによるレクチン酵素免疫法を確立した。この方法によってトランスフェリンのシアル酸量を定量することができる。この手法を用いて、実際に患者髄液・血液を用いて糖鎖量の測定を行い、診断マーカーとしての有効性を検討した。

ADの髄液中トランスフェリンのシアル酸量はコントロール群と比較して有意に増加していることが分かった（下表）。さらにAD

	対象数	シアル酸量 (nmol/mg Tf)
AD	26	20.82 ± 2.63
コントロール群	11	17.78 ± 2.20

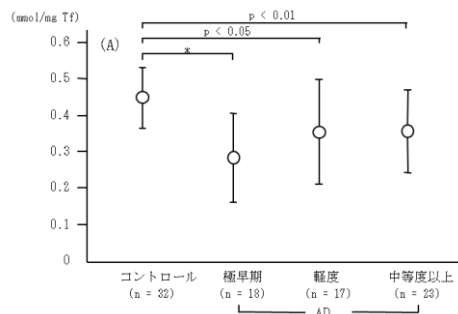
} p<0.01

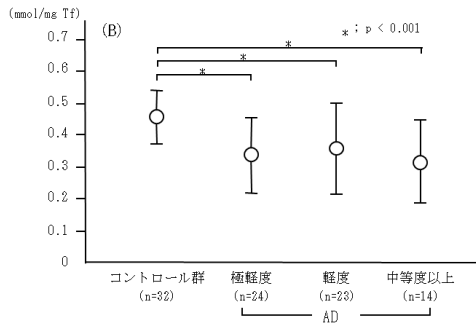
血液中でもシアル酸量は対照群と比較して変化していることも分かった（下図）。

	対象数	シアル酸量 (mmol/mg Tf)
AD	61	0.34 ± 0.13
コントロール群	30	0.45 ± 0.08

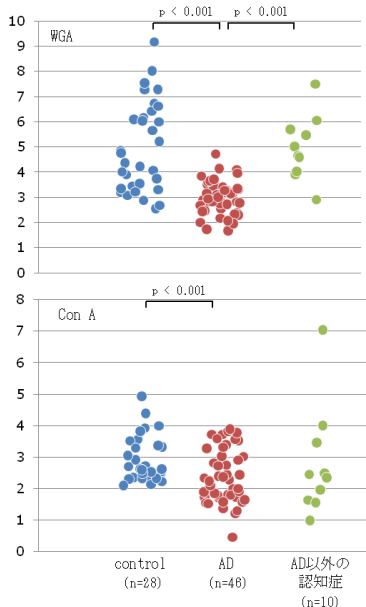
} p<0.001

さらに、血液中トランスフェリンのシアル酸量の変化は、ADを臨床症状（下図A）あるいは髄液マーカー測定により脳内の異常タンパク蓄積度合い（次頁図B）により分類したそれぞれ極早期～中等度以上すべての群において、一様にコントロール群と比較して低下しており、このことはADにおける血液中トランスフェリンのシアル酸量の変化が、病初期から起こっていることを示唆している。

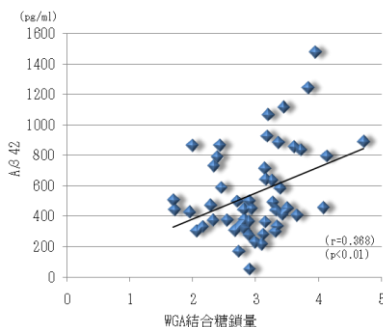




残り 2 つの候補糖タンパクについては同定を行い、トランスフェリン同様にレクチン酵素免疫測定法によって糖鎖量を測定した。このうち 1 つの糖タンパクでは、マンノースに結合する Con A、N-アセチルグルコサミンとシアル酸に結合する WGA を用いて、それぞれへの結合量を測定した。この糖タンパクでは、WGA、Con A いずれのレクチンへ対しても AD では結合量が低下しており（下図）、さらに AD 以外の認知症に比較しても有意に低下していた。



さらに WGA 結合量に関しては髄液中 Aβ の値と有意に相関していることが分かり（下図）、この指標は脳内の Aβ の変化を反映し血液でもモニターできる指標である可能性が考えられた。



残り 1 つについては、同定を行い WGA、SSA、Con A について結合量を測定したが、コントロール群との有意な変化は見られなかった。

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 11 件）

1. Hata S, Fuishige S, Araki Y, Taniguchi M, Urakami K ほか(全 24 人中 4 番目): Alternative γ -secretase processing in common forms of MCI and Alzheimer disease. *Ann Neurol.* in press, 2010. 査読有
2. Jimbo D, Kimura Y, Taniguchi M, Inoue M, Urakami K: Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 9(4): 173-179, 2009. 査読有
3. Hata S, Fujishige S, Araki Y, Kato N, Araseki M, Nishimura M, Hartmann D, Saftig P, Fahrenholz F, Taniguchi M, Urakami K ほか(全 19 人中 10 番目): Alcadein cleavages by amyloid beta-precursor protein (APP) alpha- and gamma-secretases generate small peptides, p3-Alcs, indicating Alzheimer disease-related gamma-secretase dysfunction. *J Biol Chem* 284(52): 36024-36033, 2009. 査読有
4. Inoue M, Jinbo D, Nakamura Y, Taniguchi M, Urakami K: Development and Evaluation of a Computerized Test Battery for Alzheimer's Disease Screening in Community-based Settings. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 24(2): 129-35, 2009. 査読有
5. Taniguchi M, Okayama Y, Hashimoto Y, Kitaura M, Jimbo D, Wakutani Y, Wada-Isoe K, Nakashima K, Akatsu H, Furukawa K, Arai H, Urakami K: Sugar chains of cerebrospinal fluid transferrin as a new biological marker of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 26(2): 117-122, 2008. 査読有
6. Hashimoto Y, Taniguchi M, Kitaura M, Nakamura Y, Jimbo D, Urakami K: Alteration of concanavalin A binding glycoproteins in cerebrospinal fluid and serum of Alzheimer's disease patients. *Yonago Acta medica* 51: 1-9, 2008
7. 浦上克哉、谷口美也子、中村由佳：認知

- 症診断のためのツール：髄液、血液ほか
Medical Rehabilitation 91:65-68, 2008.
査読なし
8. 浦上克哉、谷口美也子：アルツハイマー病の診断と治療 Medico 38(8):5-11, 2007. 査読なし
 9. 浦上克哉、谷口美也子：認知症の早期発見とバイオマーカー 日本老年医学会雑誌 44(3):312-314, 2007. 査読なし
 10. 浦上克哉、谷口美也子：アルツハイマー病の臨床診断—バイオマーカー 認知症のプライマリケア 44(6):1078-1081, 2007. 査読なし
 11. 浦上克哉、谷口美也子：アルツハイマー病の臨床診断—バイオマーカー medicina 44(6):1078-1081, 2007. 査読なし

〔学会発表〕（計 15 件）

1. 岡崎亮太「アルツハイマー型認知症の新規診断マーカーの確立」第 43 回中国四国検査医学学会 2010 年 11 月 7 日 島根県民会館, 松江
2. 谷口美也子「トランスフェリン糖鎖はアルツハイマー型認知症の血液早期診断マーカーとして有効である」第 29 回日本認知症学会 2010 年 11 月 5 日 ウィンクあいち, 名古屋
3. Taniguchi M: Glycosylation of serum protein as a new diagnostic marker for Alzheimer's disease. ICAD 2010, July 13, 2010, ハワイコンベンションセンター, ハワイ
4. 岡崎舞「アルツハイマー病における新規血液診断マーカーの有効性の検討」第 52 回日本老年医学会 2010 年 6 月 25 日 神戸国際会議場, 神戸
5. 谷口美也子「アルツハイマー病早期診断マーカーとしての糖タンパク」第 52 回日本老年医学会 2010 年 6 月 25 日 神戸国際会議場, 神戸
6. 谷口美也子「アルツハイマー病診断マーカーとしての糖タンパクの解析」第 51 回日本神経学会 2010 年 5 月 21 日 東京国際フォーラム, 東京
7. 谷口美也子「アルツハイマー病におけるタンパクの糖鎖変化 ～新規診断マーカー候補としての有用性」第 51 回日本老年医学会 2009 年 6 月 19 日, パシフィコ横浜, 横浜
8. 谷口美也子「アルツハイマー病診断マーカーとしての糖タンパクの解析」第 50 回日本神経学会 2009 年 5 月 20 日, 仙台国際センター, 仙台
9. 谷口美也子「アルツハイマー病新規診断マーカーの開発と測定方法の確立」産官

- 学連携フェスティバル 2008 2008 年 10 月 17 日, とりぎん文化会館, 鳥取
10. 岡山由佳「アルツハイマー病の新規診断マーカー候補としての血清中 WGA 結合トランスフェリンの解析」第 27 回日本認知症学会 2008 年 10 月 10 日, 前橋テルサ, 前橋
 11. Nakamura Y: Serum glycoprotein as a new diagnostic marker for Alzheimer's disease. IPA 2007 Osaka Silver Congress & 第 26 回日本認知症学会 2007 年 10 月 17, 18 日, 大阪国際会議場, 大阪
 12. Hashimoto Y: Alteration of concanavalin A binding glycoproteins in cerebrospinal fluid and serum of Alzheimer's disease patients. IPA 2007 Osaka Silver Congress & 第 26 回日本認知症学会 2007 年 10 月 17, 18 日, 大阪国際会議場, 大阪
 13. 谷口美也子「アルツハイマー病新規診断マーカーとしての糖タンパク質」第 49 回日本老年医学会 2007 年 6 月 21 日, ロイトン札幌, 札幌
 14. 中村由佳「アルツハイマー病の新規診断マーカー候補としての血清中糖タンパク質の解析」第 48 回日本神経学会 2007 年 5 月 17 日, 名古屋国際会議場, 名古屋
 15. 谷口美也子「アルツハイマー病新規診断マーカーとしての糖タンパク質」第 48 回日本神経学会 2007 年 5 月 17 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：アルツハイマーの診断キット、診断マーカー及び病態指標の検出方法
発明者：浦上克哉、谷口美也子
権利者：国立大学法人 鳥取大学
種類：特許
番号：特願 PCT/JP2007/067428
出願年月日：2007 年 9 月 6 日
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 美也子 (TANIGUCHI MIYAKO)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：50335527

(2) 研究協力者

浦上 克哉 (KATSUYA URAKAMI)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：30213507