

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590367

研究課題名(和文)形態学的診断が困難な中枢神経疾患の生化学マーカーの探索

研究課題名(英文) Search for biomarkers of central nervous system diseases that show subtle morphological changes on MRI and CT.

研究代表者

橋本 康弘 (Hashimoto, Yasuhiro)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80164797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は認知症と脳萎縮を示すが、脳萎縮を示す病期には神経細胞の多くが死滅しており、この病気からの回復は困難である。従って、脳萎縮が起こる以前の早期診断法が求められている。我々は、髄液に特徴的な糖鎖を持つ糖タンパク質を17種類見出した。イムノブロット法にてADマーカーとしてのスクリーニングを行ったが、良い結果は得られなかった。糖タンパク質は、同じタンパク質が複数の糖鎖を持つ(糖鎖アイソフォーム)ことが多いが、イムノブロット法では糖鎖アイソフォームは区別されない。最近、我々は糖鎖アイソフォームを簡便に区別する方法を開発した。この方法を用いてスクリーニングを続ける予定である。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer disease (AD) is diagnosed by dementia and brain atrophy. For effective treatment of AD, we need novel diagnostic markers for early stage of AD, which shows subtle morphological changes. In cerebrospinal fluid, we found 17 kinds of glycoproteins that carried glycans unique to the brain (brain-type glycan). By immunoblotting, some of the glycoproteins were examined whether they were diagnostic markers for AD or not, but none of them was the marker. It is noted that glycoproteins often include several isoforms, which have different glycans on the same core-protein (glycan-isoforms). These glycan-isoforms are not discriminated by immunoblotting, because conventional antibodies recognize core-protein portion but not glycan one. We have recently established a method for discriminating glycan-isoforms, which would be applicable to the glycoproteins in cerebrospinal fluid of AD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アルツハイマー病 軽度認知障害 診断マーカー 髄液

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) の病的な(生化学的)変化は、発症の 20 年以上も前に起こっている。一方、MRI などで脳萎縮が観察されるのは発症に近い病期であるが、この時期には神経細胞の多くが死滅しており、治療を開始しても効果は望めない。従って、AD の早期診断法 AD が求められていた。早期診断法としてアミロイド PET が開発され、その有効性が示されたが、アミロイド PET はコストが高額であり、簡便なスクリーニング法とはなり得ない。我々は、簡便に測定できる AD の早期診断マーカーの探索を行った。

### 2. 研究の目的

我々は、髄液中糖タンパク質の糖鎖アイソフォームを系統的に研究する課程で、2 種類のトランスフェリン (Tf) 糖鎖アイソフォームを見出した (*Neurobiology of Aging*, 33(8):1807-1815, 2012)。ひとつは髄液に特徴的な糖鎖を持つもの (脳型-Tf) もう一つは血清 Tf と同様の糖鎖を持つもの (血清型-Tf) である (図 1)。両者は SDS-PAGE で分離可能であった。また、血清型-Tf は血液から移行すること、一方、脳型-Tf は髄液産生組織である脈絡叢からの分泌が示唆された。脳型糖鎖は、血液を含めた他の体液には存在しないことを考え合わせると、中枢神経系内の産生が推測された。そこで、脳型糖鎖を持つ糖タンパク質を網羅的に解析し、その AD マーカーとしての検討を研究目的とした。

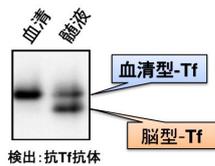


図1 髄液中の2種類のトランスフェリン(Tf) (脳型-Tfおよび血清型-Tf)

### 3. 研究の方法

#### (1) 髄液タンパク質の定量

ウェスタンブロット上のシグナルの定量化により行った。

#### (2) トランスフェリン糖鎖の解析

糖タンパク質から糖鎖を遊離させ、ピリジルアミノ化誘導体として酵素消化法、高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析法 (MOLDI/TOF/MS) を組み合わせて行った。必要な場合はタンデム質量分析解析 (MS/MS) を行った。

#### (3) 脳型糖鎖を持つ糖タンパク質の解析

脳型糖鎖に結合性を示す PVL レクチン固定化カラムに髄液をアプライし髄液型糖鎖を結合させ、特異的に溶出を行った。溶出されたタンパク質を SDS-PAGE で分離し、主要なバンド 17 種をゲルから切り出し、トリプシン消化した。消化物をペプチド・マス・フィンガープリンティング法にて同定した。ほとんどのタンパク質に体する抗体は購入が

可能であった。この抗体を用いてイムノブロットングを行った。

#### (4) 糖鎖アイソフォームの迅速測定

レクチンは糖鎖構造に特異的に結合するタンパク質である。我々は、抗原がレクチンエピトープを持つと抗原-抗体反応が抑制されることを見いだした。この方法をラテックス凝集反応へ応用した。抗体がコーティングされたラテックスと抗原を反応させると抗原-抗体反応によりラテックスビーズが抗原により架橋され、凝集反応を起こす。この凝集を分光器にて検出する。この反応系にレクチンを加え、抗原が持つ糖鎖に結合すると凝集反応が抑制される。レクチン存在下および非存在下のシグナルを比較することにより特定のグリコフォーム (特定の糖鎖を持つ糖タンパク質) を特異的に検出することが可能となる。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳型糖鎖の構造決定

糖鎖アイソフォームをマーカーとする研究では、糖鎖の詳細構造を明らかにすることが重要である。脳型-Tf (および血清型-Tf) から糖鎖を遊離させ、ピリジルアミノ化誘導体として構造解析を行った。質量分析法においては、図 2 に示されるように、血清型-Tf 由来の糖鎖主要ピークの  $m/z$  値は 1741.96 であり、血清 Tf 由来の主要ピークの値 (1741.94) と一致していた。また、その他のマイナーシグナルも極めて類似していた。以上のデータおよび高速液体クロマトグラフィー分析等の結果から、その糖鎖構造は末端がシアル酸化された 2 分岐の N-グリカンであることが示された。一方、脳型-Tf の糖鎖は血清型のものとは著しく異なるシグナルを与えた。主要ピーク ( $m/z=1766.6$ ) のタンデム MS (MS/MS) 解析により、脳型糖鎖は血清型の末端シアル酸およびガラクトースが欠損した構造を持ち、さらに“バイセクト GlcNAc”および“コア Fuc”による修飾を受けていることが示された (*Neurobiology of Aging*, 33(8):1807-1815, 2012)。その他の構造解析結果からも、図 2 に示されるようなユニークな糖鎖構造であることが明らかとなった。

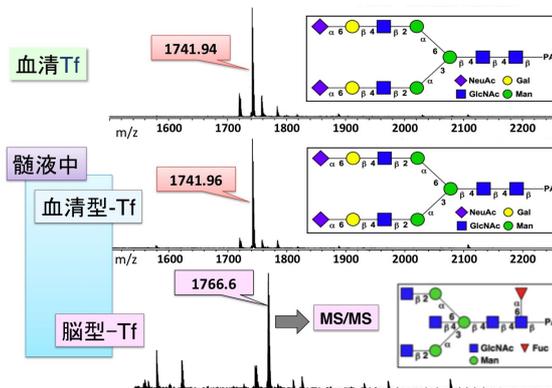


図2 Tf糖鎖アイソフォームから得られた糖鎖の質量分析

(2) 脳型糖鎖を持つ糖タンパク質のエンリッチメント

脳型糖鎖は、糖鎖末端に GlcNAc を持つことが特徴である。そこで、末端 GlcNAc を認識する PVL レクチンを固相化したカラムを用いて、脳型糖タンパク質の網羅的な精製を試みた。PVL レクチンカラムに結合した画分を SDS-PAGE で分離した後、得られたタンパク質バンドを切り出してトリプシン消化し、ペプチド・マス・フィンガープリント法にてタンパク質を同定した(図3)。この結果、Tf を含めて 17 種類のタンパク質が同定された(GP-1~GP-17)。

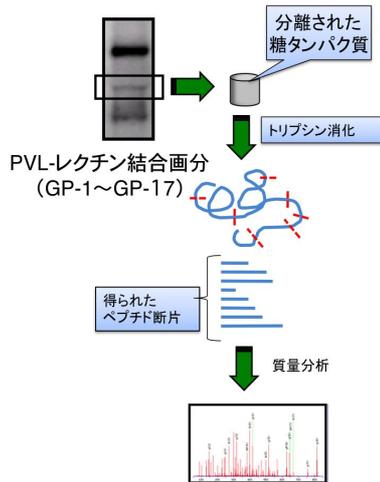


図3 ペプチド・マス・フィンガープリンティング法による脳型糖鎖を持つタンパク質の同定

(3) AD マーカーの探索

同定された 17 種類の糖タンパク質のうち、2 種類は中枢神経系のみで発現することが知られていた。スクリーニングの第 1 段階として、AD 髄液におけるこの 2 種類の変化をイムノプロット法にて調べた。しかし、一方の糖タンパク質は AD 髄液中で増加傾向が見られたが(図4)、多数症例の分析では有意差が見られなかった。もう一方の糖タンパク質についても有意差は見られなかった。一般に、糖タンパク質は、同じコアタンパク質上に複数の糖鎖を持つことが知られている(糖鎖アイソフォーム)。今回のスクリーニングはイムノプロット法で行ったため、糖鎖アイソフォームは区別されていなかった。ターゲット糖タンパク質のうち脳型糖鎖を持つアイソフォームのみを測定する必要がある。今後は、糖鎖アイソフォームを区別して AD マーカーとしての可能性を検討する。



図4 脳型糖タンパク質の髄液中での発現レベル

(4) 糖鎖アイソフォームの迅速測定法

AD と鑑別しなければならない認知症として、特発性正常圧水頭症 (iNPH) が知られている。脳型-Tf の変化が両疾患の鑑別マーカーになることを明らかにした(*Neurobiol. of Aging*, 33(8):1807-1815, 2012)。ちなみに、脳型-Tf は Tf 総量の 30% 程度なので、Tf 総量は鑑別マーカーにならない。すなわち、糖鎖アイソフォームを区別することが重要である。AD と iNPH の鑑別のためのアッセイは、図1と同様のイムノプロット法で行ったが、この方法での多検体の分析は時間と手間を要する。サンドイッチ ELISA 法は迅速だが、用いられる抗 Tf 抗体は、タンパク質部分のみを認識し、糖鎖の違いを区別しないため、糖鎖アイソフォームの測定は行えない。

我々は、抗原-抗体反応の系に糖鎖認識分子であるレクチンを添加して抗原糖鎖に結合させると、抗原-抗体反応が抑制されることを見出した(*J Biochem.*, 2013;154:229-32.)。レクチンは特定の糖鎖にのみ結合するため、阻害効果は特定の糖鎖アイソフォームにしか見られない。この測定原理をラテックス免疫凝集法に応用し、自動分析装置での測定を可能とした。この結果 1 assay/min で Tf アイソフォームの測定が可能となった(図4)。

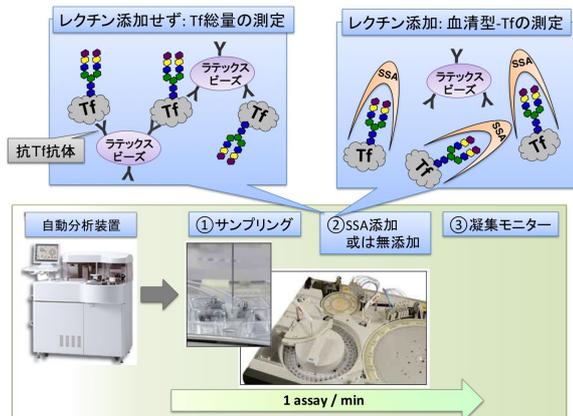


図5 自動分析装置による糖鎖アイソフォームの測定

この自動分析装置による測定法を髄液中のトランスフェリン糖鎖アイソフォームの測定に応用し、AD と iNPH の鑑別診断が可能であることを示した(図6)。今後は他の髄液型糖タンパク質の迅速測定法を開発し、AD マーカーの探索に応用する予定である。

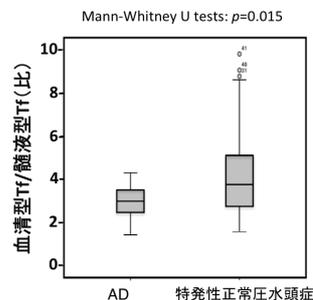


図6 特発性正常圧水頭症の診断への応用

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 10 件)

1. Kyoka Hoshi, Yoshinobu Kariya, Kiyomitsu Nara, Hiromi Ito, Keiro Shirotnani, Yasuhiro Hashimoto, et al. "Lectin-dependent inhibition of antigen-antibody reaction: application for measuring 2,6-sialylated glycoforms of transferrin", *J. Biochem.*, 154(3):229-232, 2013 doi: 10.1093/jb/mvt065
2. 橋本康弘 他: "iNPH マーカーとしての髄液トランスフェリン", 「iNPH Now」, ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)デピュレーション・ジャパン コッドマン&CMF 事業部 Vol.10 p.2 2013
3. 橋本康弘 他: "髄液中トランスフェリンと特発性正常圧水頭症", 「Clinical Neuroscience」, (株)中外医学社 Vol.31 No.5 p.618-619, 2013
4. 橋本康弘 他: "第10章 脳脊髄液バイオマーカー", 「臨床認知症」特集: アルツハイマー病の早期診断, 富本秀和監修, (株)医学出版 Vol.2 No.2 p.35-40, 2013
5. 橋本康弘, 城谷圭朗 他: "認知症の髄液糖鎖マーカー", 「Cognition and Dementia」, メディカルレビュー社 Vol.11 No.2 p.35-40, 2012
6. 橋本康弘, 奈良清光, 城谷圭朗, 伊藤浩美 他: "糖タンパク質糖鎖をマーカーとする認知症の診断: 特発性正常圧水頭症の新規マーカー", 「老年期認知症研究会誌」, Vol.18, 115-116, 2011
7. 奈良清光, 城谷圭朗, 橋本康弘 他: "認知症の髄液学-診断マーカーとしての糖鎖修飾-", 認知症関連分子生物学各論「日本臨床」, (株)日本臨床, 69巻, 増刊号 8, 69-73, 2011
8. 橋本康弘 他: "認知症の糖鎖マーカー: 特発性正常圧水頭症を例として", 「脳21」, 金芳堂 Vol.14 No.1 p.32-36, 2011
9. Satoshi Futakawa, Kiyomitsu Nara, Hiromi Ito, Keiro Shirotnani, Yasuhiro Hashimoto, et al. "A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH", *Neurobiology of Aging*, 33(8):1807-1815, 2012
10. Keiro Shirotnani, Kiyomitsu Nara, Yasuhiro Hashimoto, et al. "High Throughput ELISAs to Measure an Unique Glycan on Transferrin in Cerebrospinal fluid: A Possible Extension Toward Alzheimer's Disease Biomarker Development", *International*

*Journal of Alzheimer's Disease*, 2011;2011:352787. doi: 10.4061/2011/352787. Epub 2011 Aug 17.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 星京香, 苅谷慶喜, 伊藤浩美, 城谷圭朗, 橋本康弘 他: 「髄液中 2,6-シアル酸化トランスフェリンの迅速測定」, 第15回日本正常圧水頭症学会, 大阪 (2014年2月1日)
2. 星京香, 苅谷慶喜, 伊藤浩美, 橋本康弘 他: 「髄液型糖鎖と中枢神経疾患」, 第11回 JCGG シンポジウム, 仙台 (2013年10月25日, 26日)
3. 星京香, 苅谷慶喜, 奈良清光, 伊藤浩美, 城谷圭朗, 橋本康弘 他: 「SSA レクチンによる抗原-抗体反応の阻害: 髄液中  $\alpha$ 2,6-シアル酸化トランスフェリン測定への応用」, 第7回東北糖鎖研究会, 新潟 (2013年9月27日, 28日)
4. 星京香, 苅谷慶喜, 奈良清光, 伊藤浩美, 城谷圭朗, 橋本康弘 他: 「認知症マーカーとしての  $\alpha$ 2,6 シアル酸化トランスフェリンの新規測定法」, 第86回日本生化学会大会, 横浜 (2013年9月11日~13日)
5. 城谷圭朗, 奈良清光, 橋本康弘 他: 「認知症の糖鎖バイオマーカーのハイスループット測定法」, 日本薬学会第133年会, 横浜 (2013年3月27日~30日)
6. 橋本康弘: 「iNPH マーカーとしての髄液トランスフェリン」, 第14回日本正常圧水頭症学会プレナリーセミナー, 東京 (2013年2月8日)
7. 橋本康弘: 「疾患の解明と治療・創薬のための糖鎖科学(疾患と糖鎖)」, 財団法人神奈川科学技術アカデミー (KAST)平成24年度教育講座「糖鎖科学・糖鎖工学の基礎から応用」, 川崎 (2013年1月22日)
8. Satoshi Futakawa, Kiyomitsu Nara, Hiromi Ito, Keiro Shirotnani, Yasuhiro Hashimoto, et al. "A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH", *Hydrocephalus* 2012, Kyoto, Japan (October 19-22, 2012)
9. 奈良清光, 苅谷慶喜, 伊藤浩美, 橋本康弘 他: 「脳型糖タンパク質の中中枢神経疾患マーカーとしての意義」, 第6回東北糖鎖研究会, 弘前 (2012年10月12日, 13日)
10. 橋本康弘, 城谷圭朗, 奈良清光, 伊藤浩美, 苅谷慶喜 他: 「髄液に特徴的な脳型トランスフェリンの認知症マーカーとしての意義」, 第31回日本糖質学会年会, 鹿児島 (2012年9月17日~20日)

11. 橋本康弘：特別講演「認知症の髄液診断マーカー」、第14回脳教カンファレンス、裏磐梯猫魔ホテル(福島県北塩原村)(2012年7月21日)
12. 奈良清光、城谷圭朗、伊藤浩美、橋本康弘 他：招待講演「次世代ポストゲノムの時代、糖鎖研究はおもしろい」、第75回日本皮膚科学会東京支部学会、東京(2012年2月18日、19日)
13. 橋本康弘：「疾患の解明と治療・創薬のための糖鎖科学(疾患と糖鎖)」、財団法人神奈川科学技術アカデミー(KAST)平成23年度教育講座「糖鎖科学・糖鎖工学の基礎から応用」、川崎(2012年1月24日)
14. 城谷圭朗、奈良清光、伊藤浩美、苅谷慶喜、橋本康弘 他：「認知症糖鎖マーカーのハイスループット測定法」、第5回東北糖鎖研究会、仙台(2011年12月9日、10日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1.

名称：糖鎖アイソフォーム検出方法及び糖鎖アイソフォーム検出装置

発明者：橋本康弘、城谷圭朗、奈良清光、苅谷慶喜、伊藤浩美(他4名)

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所、公立大学法人福島県立医科大学

種類：特願

番号：2012-178722

出願年月日：2012年8月10日

国内外の別：国内

2.

名称：METHOD FOR SEARCHING FOR MARKER FOR CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASE

発明者：伊藤浩美、橋本康弘、城谷圭朗、(他9名)

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所、公立大学法人福島県立医科大学

種類：PCT 国際出願

番号：JP2011-079218

出願年月日：2011年12月16日

国内外の別：外国

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 康弘 (HASHIMOTO, Yasuhiro)

福島県立医科大学・生化学講座・教授

研究者番号：80164797

(2)研究分担者

城谷 圭朗 (SHIROTANI, Keiro)

長崎大学大学院医歯薬総合研究科・准教授

研究者番号：20322696

苅谷 慶喜 (KARIYA, Yoshinobu)

福島県立医科大学・生化学講座・准教授

研究者番号：00458217

奈良 清光 (NARA, Kiyomitsu)

福島県立医科大学・生化学講座・講師

研究者番号：20322696

伊藤 浩美 (ITO, Hiromi)

福島県立医科大学・生化学講座・助教

研究者番号：00450669

(3)連携研究者 なし