

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790990

研究課題名(和文)アルツハイマー型認知症早期血液診断マーカーの臨床応用へ向けての測定システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of the measuring system for early diagnosis of Alzheimer's disease using blood biological markers.

研究代表者

谷口 美也子 (TANIGUCHI, Miyako)

鳥取大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50335527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)で糖鎖の変化している2種の糖タンパクを精製し、その糖鎖解析をして異常部位を同定して糖鎖量の変化を検出できる測定システムの確立を目的としていたが、精製方法に別のタンパクの糖鎖が混じるなどの問題が発生したため、今回の研究期間内に糖鎖解析まで至ることができなかった。しかし、最終的に適した精製方法を決定でき、現在精製を進行中である。今後、当初の計画であった糖鎖解析を進行していく予定である。また、2種の糖タンパクのうちトランスフェリンのシアル酸変化については、糖鎖を付加する酵素の量と活性が共に変化していることが明らかになり、シアル酸の変化は酵素が一因であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to purify two glycoproteins, which is altered in Alzheimer's disease (AD) serum, analyze the region changed in AD, and then establish the measuring system. However, we had the problems during the steps of purify them, for example another sugar chains contaminated in the target glycoproteins. Although we cannot progress analysis, we finally decided the most suitable way to purify the proteins and are now advancing as the first planning. And we found the both content and the activity of serum sialyltransferase (STase) which attach the sialic acid to the transferrin are lower in Alzheimer's serum. This indicates one of the causes about altered sialic acid in AD.

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：神経分子病態学 アルツハイマー型認知症 糖鎖 診断マーカー 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

認知症患者は世界規模で年々増加しており、高齢化社会に伴う社会問題である。アルツハイマー型認知症(AD)は認知症の約半数を占める認知症であり、ADを早期に、確実に、他の認知症と区別して診断して発見することが早期治療にとって重要である。ADの診断には、PETやSPECTなどによるイメージングによる方法が有用であるが、スクリーニングとしての利用には適していない。またこれらの機器は、高額であること、特殊な設備が必要であることから専門医・専門病院のみでしか行うことができない状況にある。認知症の早期発見には、病状が進行して専門病院にかかる前に、かかりつけ医でのスクリーニングによって発見されることが最善の手段の1つであり、そのためのツールの確立が重要であるといえる。診断マーカーは血液などの生体試料を用いて簡便に測定することが可能であり、ADのスクリーニングに貢献できる診断ツールである。

現在用いられているADの診断マーカーは、ADの脳内における異常病理所見を反映した髄液中のアミロイドβタンパク(Aβ)の低下と、リン酸化タウタンパクの上昇を髄液で検出すること有用である。しかし、これらの診断マーカーに明確な基準値が設定されていないなど、未だ臨床現場で浸透しきれていない。また、血中の有効な診断マーカーは確立されていないのも診断マーカーの普及が遅れている原因の1つである。

2. 研究の目的

我々は、より感度・特異度が高く、さらに早期診断も可能である新規診断マーカーを検索してきた。そしてADの髄液中・血液中で、2種の糖タンパクの糖鎖が変化している可能性を見出した。

しかしながらこれらの糖鎖異常を検出するためには、現在用いているような実験研究に用いられる糖鎖解析手法では実際の臨床現場では普及しないことは明らかである。今後これらの糖タンパクの糖鎖異常をADの早期血液診断マーカーとして普及させるために、簡易測定方法を確立することが必要であり、そのための詳細な糖鎖解析と、実際の測定方法の確立することが目的である。

3. 研究の方法

本研究は、以下の3点を段階的に進めることを予定していた。

(1) 糖鎖異常が確認できている糖タンパクの糖鎖構造を解析する。

髄液・血液中の糖タンパクを分離・精製し、精製した糖タンパクの糖鎖を、MALDI-TOFもしくはLC-MSによって解析

する。

(2) ADにおける糖鎖異常を特異的に認識する抗体を作製する。

1. 解析したADに特異的な糖鎖異常を認識する抗体を作製する。

(3) 異常を検出するELISA測定系を作製する。

ADに特異的な変化を検出するELISA測定系を作製する

(4) 作製した測定系を用いて実際の臨床応用の有効性を検討する

当初、以上の(1)~(4)まで進行する予定にしていたが、(1)の精製で研究がうまくいかず、糖鎖の異常部位の詳細な解析にまでは至らなかった。

そのため、同時進行で、ADのトランスフェリンのシアル酸量の変化の機序の検証を行った。方法は、トランスフェリンにシアル酸を付加する酵素である-2,6シアリルトランスフェラーゼ(STase)活性を、市販のキット(R&D社)を用いて測定した。

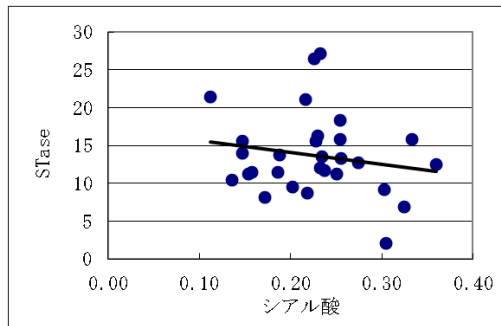
4. 研究成果

まず、2種の糖タンパクの糖鎖解析を行うために、各タンパクの精製を試みた。しかし、クロマトグラフィーを用いる手法単独では生成できず、抗体を用いたアフィニティ精製を行うと、精製した糖タンパクの中に、精製に用いた抗体の糖鎖が混ざってしまうことが分かり、いずれの方法でも糖鎖解析のためのタンパク精製法として適さないことが分かった。しかしその結果、最終的に各糖タンパクの精製には電気泳動(SDS-PAGE)してタンパクを分離し、目的のタンパクのゲルを切り出して抽出する方法が最も適していることが分かり現在髄液・血液から糖タンパクを抽出したサンプルを準備中である。今後、糖鎖解析を実施し、ADで変化している糖鎖構造を定性していく予定である。

同時進行で実施したトランスフェリンのシアル酸量が変化している機序の検証では、STase量と活性を測定し、検証した。STase量はADで有意に(p<0.001)低下していた(下表)。

	対象数	シアル酸量 (nmol/mg Tf)
コントロール群	31	0.45 ± 0.08
AD群	61	0.33 ± 0.11

しかし、血液中のSTase量とトランスフェリンの糖鎖量とは若干の相関があったものの、明らかな相関関係は得られなかった(次頁図)。



そこで血液中のSTase活性を測定したところ、ADではSTase活性も有意に( $p < 0.01$ )低下しており(下表)、STase量だけでなく活性も低下していることが分かった。

	対象数	シアル酸量 (mmol/mg Tf)
コントロール群	15	13.9 ± 3.8
AD群	30	12.5 ± 2.5

STase量を測定した検体とSTase活性を測定した検体が完全に一致してはいなかったため、STase量と活性に相関があるのか、シアル酸の変化と相関があるのかは今回の研究期間では判らなかったが、STaseの量と活性両方の変化がトランスフェリンのシアル酸量に影響を与えていると考えられる。

今回の研究では、糖鎖解析のための糖タンパクの精製が達成できなかったが、様々な手法を試してそれぞれの問題点も明らかになり、より確実に目的の糖タンパクの糖鎖のみを精製するための手法が決まり、現在髄液・血液からの精製を進行中である。今後はさらに糖鎖の異常部位を明らかにし、本研究の当初の手順に沿って研究を進めていく予定である。

##### 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 6件)

1. Kouzuki M, Asaina F, Taniguchi M, Musha T, Urakami K. The relationship between the diagnosis method of neuronal dysfunction (DIMENSION) and brain pathology in the early stages of Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 13(2): 63-70, 2013, doi:

10.1111/j.1479-8301.2012.00431.x. 査読有

2. Hata S, Taniguchi M, Piao Y, Ikeuchi T, Fagan AM, Holtzman DM, Bateman R, Sohrabi HR, Martins RN, Gandy S, Urakami K, Suzuki T, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Multiple  $\gamma$ -secretase product peptides are coordinately increased in concentration in the cerebrospinal fluid of a subpopulation of sporadic Alzheimer's disease subjects. *Mol Neurodegener.* 16, 2012, doi: 10.1186/1750-1326-7-16 査読有
3. Kushida S, Akisaki T, Yasuda H, Moriyama H, Hara K, Nagata M, Taniguchi M, Urakami K, Yokono K, Sakurai T. Usefulness of  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose positron emission tomography for diagnosis of asymptomatic giant cell arteritis in a patient with Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int* 11(1):114-118, 2011 査読有
4. Jimbo D, Inoue M, Taniguchi M, Urakami K. Specific feature of olfactory dysfunction with Alzheimer's disease inspected by the Odor Stick Identification Test. *Psychogeriatrics* 11(4): 196-204, 2011, doi: 10.1111/j.1479-8301.2011.00387.x. 査読有
5. Inoue M, Jimbo D, Taniguchi M, Urakami K. Touch Panel-type Dementia Assessment Scale: a new computer-based rating scale for Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 11(1): 28-33, 2011, doi: 10.1111/j.1479-8301.2010.00345.x. 査読有
6. Hata S, Fuishige S, Araki Y, Taniguchi

M, (ほか20名) Alternative  
-secretase processing in common forms  
of MCI and Alzheimer's disease. Ann  
Neurol 69(6):1026-1031, 2011 査読有

[学会発表](計21件)

1. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症における血液中糖タンパクの糖鎖異常」第3回日本認知症予防学会 2013年9月28日 朱鷺メッセ(新潟)
2. 谷口美也子「認知症における血液中糖タンパクの糖鎖異常の解析」第4回日本血管性認知障害研究会 2013年8月10日 東京コンファレンスセンター品川(東京)
3. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症における血液新規糖鎖マーカーの有効性の検討」第55回日本老年医学会 2013年6月5日 大阪国際会議場(大阪)
4. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症における糖鎖変化に注目した新規血液マーカーの有効性の検討」第54回日本神経学会 2013年6月1日 東京国際フォーラム、(東京)
5. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症診断における髄液マーカー測定の有用性」第24回日本老年医学会中国地方会 2012年11月24日 広島国際会議場(広島)
6. 阪田幸範「アルツハイマー型認知症における血液中トランスフェリンの糖鎖解析」第45回中四国医学検査学会 2012年11月4日 岡山コンベンションセンター(岡山)
7. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症における血液中新規糖タンパクの糖鎖変化」第31回日本認知症学会 2012年10月27日 つくば国際会議場(茨城)
8. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症における髄液診断マーカーの変化」第2回日本認知症予防学会 2012年9月7日 北九州国際会議場(福岡)
9. 阪田幸範「アルツハイマー型認知症における血液中トランスフェリンの糖鎖解析」第2回日本認知症予防学会 2012年9月7日 北九州国際会議場(福岡)
10. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症における髄液診断マーカーの変化の検討」第7回日本臨床検査学教育学会 2012年8月23日 名古屋国際会議場(名古屋)
11. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症の血液中トランスフェリンの糖鎖変化の解析」第54回日本老年医学会 2012年6月28日 東京国際フォーラム(東京)
12. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症早期発見のための新規血液診断マーカー」第27回日本老年精神医学会 2012年6月21日 大宮ソニックシティ(埼玉)
13. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症の血液中糖タンパクの糖鎖変化の解析」第53回日本神経学会 2012年5月24日 東京国際フォーラム(東京)
14. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症における血液トランスフェリン糖鎖の変化と糖鎖付加との関連の検討」第30回日本認知症学会 2011年11月12日 タワーホール船橋(東京)
15. 岡崎舞「アルツハイマー型認知症における糖鎖変化の解析」第1回日本認知症予防学会 2011年9月10日 米子コンベンションセンター(鳥取)
16. 岡崎亮太「アルツハイマー型認知症における糖タンパク質の糖鎖異常の解析」第1回日本認知症予防学会 2011年9月10日 米子コンベンションセンター(鳥取)
17. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症におけるトランスフェリンシアル酸量の経時的変化の解析」第1回日本認知症予防学会 2011年9月9日 米子コンベンションセンター(米子)
18. 樋口雄哉「アルツハイマー型認知症における血清トランスフェリンの診断マーカーとしての有効性」第44回中国四国医学検査学会 2011年11月5日 アスティ徳

島(徳島)

19. 岡崎舞「アルツハイマー型認知症における糖転移酵素の変化」第 44 回中国四国医学検査学会 2011 年 11 月 5 日 アステイ徳島(徳島)
20. 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 27 回日本老年学会 2011 年 6 月 15 日 京王プラザホテル(東京)
21. 谷口美也子「アルツハイマー型認知症の血液診断マーカーとしての糖鎖異常の解析」第 52 回日本神経学会 2011 年 5 月 20 日 名古屋国際会議場(名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：補体 C3 タンパク質の糖鎖測定によるアルツハイマー型認知症の診断キット、診断マーカー及び検出方法

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 2011-173946

出願年月日：2011 年 8 月 9 日

国内外の別：国内

取得状況(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：US8,105,839 B2

取得年月日：2012 年 1 月 31 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・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50335527