

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659287

研究課題名(和文) 髄液中N結合型糖鎖構造の網羅的解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of a technology to analyze total N-glycans contained in cerebrospinal fluid

研究代表者

池中 一裕 (IKENAKA, Kazuhiro)

生理学研究所・分子生理研究系・教授

研究者番号：00144527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：正常圧水頭症疑い患者からタップテストによって得られた脳脊髄液中に含まれるN結合型糖鎖の網羅的な解析を行った。髄液中糖鎖は採取後の時間経過や温度変化に安定で糖鎖パターンが変化しないことを確認した後、主要な糖鎖構造を同定した。血清や抗体、脳に多く含まれる糖鎖が脳脊髄液中にも含まれていることが明らかとなった。

次いで脳神経疾患マーカーの探索を行った。各糖鎖組成割合によって患者を大きく分けて7つのグループに分類することができ、患者の確定診断の結果と脳脊髄液中に含まれるN結合型糖鎖組成から、突発性正常圧水頭症の診断マーカーとしての有用な候補が見つかった。

研究成果の概要(英文)：N-glycans contained in cerebrospinal fluid (CSF) obtained during tap test of patients with a suspected case of normalcy pressure hydrocephalus (NPH) were identified. First N-glycans in CSF were shown to be quite stable for 24 hours. Second it has been shown that N-glycans derived from serum and brain are present in the CSF.

Next we searched for a N-glycan that can serve as a marker for a certain brain disease. N-glycan profiles were classified into 7 patterns and a N-glycan that can predict the occurrence of cataplectic normalcy pressure hydrocephalus was found.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：脳脊髄液 N結合型糖鎖 マーカー

1. 研究開始当初の背景

各種脳疾患において早期診断方法として髄液検査が注目されている。特にアルツハイマー病(AD)に関しては、アミロイドペプチド(0-42)の低下、タウ蛋白の増加が認められている。さらに早期マーカーとして可溶性アミロイド前駆蛋白質(Perneczky et al, Neurology, 2011)や脳脊髄液中WGAレクチン陽性トランスフェリン(Taniguchi et al, Dement Geriatr Cogn Disord, 2008)などが報告された。これらの中でもWGAレクチン陽性トランスフェリンは糖蛋白質糖鎖を対象としている点について我々は着目した。糖蛋白質糖鎖にはO結合型糖鎖とN結合型糖鎖がある。血清中のN結合型糖鎖は各種疾患のマーカーとなり得ることが示されており、我々も報告しているが(Otake et al, J Biochem, 2001)、脳脊髄液に関してはその糖蛋白質含量が極めて低いため、レクチンや抗体を用いたプロットング法以外、直接的なN結合型糖鎖解析は行えなかった。我々はN結合型糖鎖の微量でしかも定量的な解析方法を確立したので、予備的に脳脊髄液中N結合型糖鎖解析に適用したところ、良好な結果を得ることができた。特発性正常圧水頭症(iNPH)は髄液貯留により歩行障害、認知障害、排尿障害をきたす疾患である。最近の報告では65歳以上高齢者における有病率は従来認識させていたよりも遥かに高いとされ(約1%)、高齢化が進む本邦での重要性が再認識されている(Tanaka et al, Neuroepidemiology, 2009, Hiraoka et al, Neurol Med Chir, 2008)。そして高い有病率とともに、iNPH疑い症例におけるADやレビー小体病(DLB)の合併にも注目されている(Cabral et al, Alzheimers Dement, 2011, Meier et al, Acta Neurochir Suppl, 2010, Golomb et al, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000)。iNPH疑い症例では、通常診療において30mlほどの試験的髄液排除(髄液タップテスト)が行われる。このようにして脳脊髄液が得られる症例群にはiNPH単独、AD単独、AD+iNPH合併、あるいはDLBなどの疾患が混在していると予測される。したがって、iNPH疑い症例で得られた脳脊髄液のバイオマーカー調査は、iNPHのみならず、合併する神経変性疾患の病態解明に結びつく可能性が期待される。

2. 研究の目的

今回の申請においては本方法を脳脊髄液中のN結合型糖鎖解析に適するよう改良した後、N結合型糖鎖構造を網羅的に解析し、データベースを構築する。また、iNPH疑い症例タップテストにより得られた脳脊髄液を検査し、一定時間経過後の症状の予測(iNPH単独、AD単独、AD+iNPH合併、あるいはDLB)がどの程度可能か明らかにする。さらに、これらの結果からADやDLBなどの認知症の早期マーカー候補を探索する。

3. 研究の方法

脳脊髄液中のN結合型糖鎖構造の決定

脳脊髄液試料としては、タップテストの際iNPH疑い症例から排除された脳脊髄液を用いる。患者のインフォームドコンセントを得た後、腰髄穿刺を行う。

脳脊髄液蛋白質をアセトン沈殿により濃縮した後、ヒドラジン分解によるN結合型糖鎖の遊離、ピリジルアミノ化による蛍光標識を行う。不純物の除去はグラファイトカーボンカラム、セルロースカラムの2種類を用いることにより効率よくおこなう。蛍光標識された糖鎖はDEAE陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、順相HPLC、逆相HPLCの3種類のカラムを用いて分離する。この際、標準品と一致する糖鎖は、これをもって構造が決定されたとする。未知の新規糖鎖に関しては、精製標品を質量分析計により分子量を求めた後、酵素分解法により未知標品を標準品と一致するまで分解消化することにより構造を同定する。主要な糖鎖構造を全て決定し、データベースを作成する。

臨床検査用の試料調整方法の確立

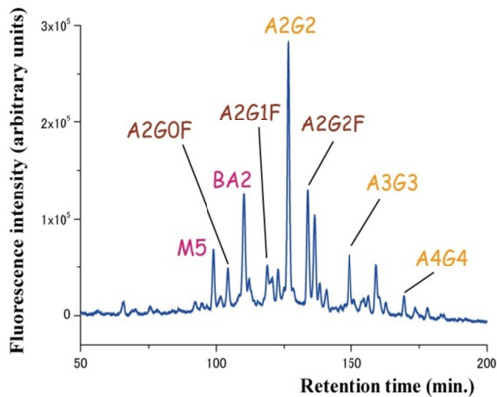
脳脊髄液保存法：採取した脳脊髄液はアセトン沈殿までの放置期間、室温でどれだけ安定か、また凍結融解に対して安定かどうか検討する。脳脊髄液を採取後、種々の条件で放置、または凍結する。これら試料を上述通り処理し、HPLCのパターン変化がないかどうか検討する。この結果により、脳脊髄液調整方法を確立する。

正常圧水頭症患者脳脊髄液中のN結合型糖鎖解析とその分類

- (1) 上記により確立した調整方法により、採取した患者脳脊髄液の解析を行う。作製したデータベースと照合しながら、N結合型糖鎖の同定、定量を行う。構造未知の糖鎖が現れた場合は定法通り構造を決定する。糖鎖発現パターンにより脳脊髄液試料を分類する。この情報は患者の診断がつくまで長寿研には送らない。
- (2) タップテストにより脳脊髄液採取した患者の診断を行う。診断結果と脳脊髄液分類パターンを併せて、正常圧水頭症患者の予知診断と脳疾患(特に認知症)の早期マーカーとなり得る糖鎖を抽出する。また、他の認知症関連マーカーとの相関を明らかにする。

4. 研究成果

3次元HPLCシステムを用いて、脳脊髄液中に含まれるN結合型糖鎖の網羅的な解析を行った。脳脊髄液試料は正常圧水頭症疑い患者からタップテストによって得られたものを用いた。その結果、主要な糖鎖構造を同定し、血清や抗体、脳に多く含まれる糖鎖が脳脊髄液中にも含まれていることが明らかとなった。(図1)



(図1: 脳脊髄液に含まれる主要な糖鎖構造)

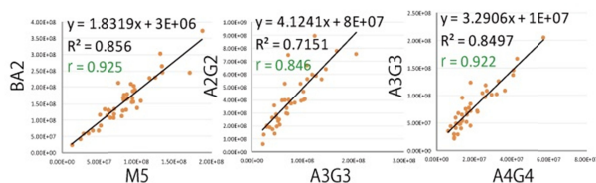
次に臨床検査用の試料調整方法を確立するため、1患者の脳脊髄液を採取後、時間経過や凍結融解を繰り返すなど種々の条件下で糖鎖パターンの比較をした。その結果、採取後の時間経過や温度変化に安定しており、糖鎖パターンに変化はなかった。

次いで患者髄液を用いてマーカーの探索を行った。患者の確定診断の結果と脳脊髄液中に含まれるN結合型糖鎖組成がどのように各種神経疾患と連鎖しているのか検討した。その結果、各糖鎖組成割合によって患者を大きく分けて7つのグループに分類することができた。(図2)また、特定の糖鎖同士の組成割合に相関関係があること



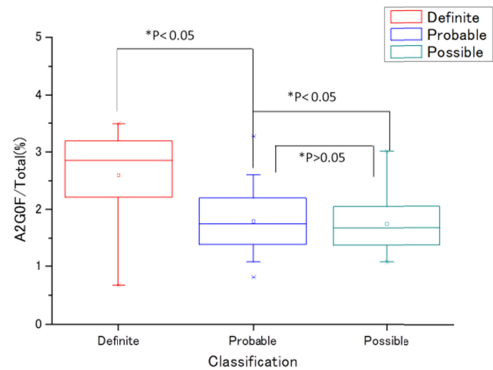
統計的手法のクラスタリング解析をしたところ、7つに分類された。が明らかになった。(図3)

(図2: クラスタリング解析)



(図3: 各糖鎖の相関関係)

そこで、脳由来のBA2、血清由来のA3G3、抗体(IgE)由来のA2G0Fの変動が疾患に影響を及ぼしているのではないかと考えた。各患者の確定診断(definite>probable>possibleの順に高い)とBA2、A3G3、A2G0Fの組成割合の関連を調べたところ、definiteの分類においてA2G0Fの割合が比較的高くなっていることが明らかとなった。(図4)



(図4: A2G0Fの割合と確定診断の相関)

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

小池崇子、吉村武、文堂昌彦、丸山和佳子、池田一裕、脳髄液に含まれるN結合型糖鎖解析 第85回日本生化学会、2012.12.15 福岡県、福岡国際会議場

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 一裕 (IKENAKA, Kazuhiro)

生理学研究所・分子生理研究系・教授

研究者番号: 00144527

(2)研究分担者

文堂 昌彦 (BUNDO, Masahiko)
独立行政法人国立長寿医療研究センター・その他部局等・室長
研究者番号：10426497

(3)連携研究者

吉村 武 (YOSHIMURA, Takeshi)
生理学研究所・分子生理研究系・助教
研究者番号：60402567

丸山 和佳子 (MARUYAMA, Wakako)
独立行政法人国立長寿医療研究センター・その他部局等・部長
研究者番号：20333396