

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460394

研究課題名(和文) 中枢神経疾患における“脳型”糖タンパク質の代謝および診断的意義

研究課題名(英文) "Brain-type" glycosylation: A tag for diagnostic markers of central nervous system diseases

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳に特徴的な糖鎖修飾を受けているタンパク質の一つとして、 α 2マクログロブリン(α 2M)を見出した。 α 2Mは強力な内因性のプロテアーゼ阻害物質であり、炎症巣の限局化に関与している。そこで急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、および全身性エリテマトーデス(SLE)における中枢神経障害(NPSLE)における α 2Mの髄液中の濃度を測定した。ADEMでは髄液中 α 2Mが上昇し、良性の熱性けいれんとの鑑別診断マーカーとなった。NPSLEでは髄液中の α 2Mは増加していたが、中枢神経症状のないSLEでは増加は認められなかった。したがって、 α 2MはNPSLEの診断マーカーになることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の発熱は頻度の高い症状である。この中には単なる熱発や熱性けいれんとともに、命にかかわる脳炎や脳症などが含まれることがある。例えば、脳症であれば発病の1日目に適切な治療を行えば80%が救命されるが、2日目の診断では40%、3日目の診断では10%にまで救命率が低下する。従って、脳症の病初期における診断は極めて重要であるが、従来は良い診断マーカーが知られていなかった。本研究で、脳内で生合成される α 2Mが脳炎・脳症のマーカーになることが示された。今後、免疫クロマト法でのベッドサイド診断による迅速診断が期待される。

研究成果の概要(英文)：Alpha2-macroglobulin (α 2M) is a glycoprotein in the blood and increases at early stages of inflammation. α 2MG is a potent endogenous inhibitor for proteases and prevents harmful expansion of inflammation. In the present study, we quantified levels of α 2MG in cerebrospinal fluid (CSF) of central nervous system diseases; i.e., acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) and neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE). The levels of α 2MG in CSF of NPSLE were significantly higher than those of non-NPSLE, indicating that α 2MG is a diagnostic marker for NPSLE. At early stage of ADEM, the levels of α 2MG in CSF were significantly higher than those of benign febrile seizure (FS), suggesting that α 2MG is a marker at early stage of ADEM. Thus, we concluded that α 2MG could be a marker for inflammation in central nervous system.

研究分野：生化学

キーワード：脳炎 脳症 けいれん性疾患 α 2マクログロブリン 髄液 全身性エリテマトーデス 中枢神経障害 急性散在性脳脊髄炎

1. 研究開始当初の背景

髄液は脳周囲を循環する体液であり、神経系マーカーの宝庫と考えられている。我々は、髄液中のトランスフェリン(Tf)がユニークな糖鎖修飾を受けていることを見出した。また、この脳型 Tf が認知症(特発性正常圧水頭症)で半減することを見出した(Neurobiol Aging, 33: 1807-15, 2012、特開 2010-121980)。一方、同じ患者の血清 Tf レベルは変化していなかった。即ち、脳型 Tf は血清 Tf と独立した代謝系を持ち、神経疾患マーカーとなりうることを示した。我々は、髄液中には Tf 以外にも脳型糖鎖を持つ糖タンパク質が存在すると考え、その網羅的解析を試みた。

具体的には、脳型糖鎖を結合するレクチン・アフィニティーカラムを使った糖タンパク質群の精製及び得られた糖タンパク質画分のプロテオミクス解析を行った。その結果、脳型 Tf を含めて 17 種類の脳型糖タンパク質が同定された(特開 2012-081701: 脳型糖タンパク質の分離方法)。即ち、これらの糖タンパク質の中枢神経系内での生合成が示唆された。

同定された脳型糖タンパク質分子の一つに $\alpha 2$ マクログロブリン($\alpha 2M$)がある。 $\alpha 2M$ は生理的なプロテアーゼ・インヒビターであり、炎症巣から放出されるプロテアーゼの作用を局限化する機能を持つ。本研究では、脳型 $\alpha 2M$ の炎症性神経疾患における変化とその制御機構を解析する。

2. 研究の目的

髄液は脳周囲を循環する体液であり、神経系マーカーの宝庫と考えられている。我々は、髄液中にユニークな糖鎖(脳型)糖鎖を持つ一群の糖タンパク質を見出した。その一つに $\alpha 2M$ がある。 $\alpha 2M$ は生理的なプロテアーゼ・インヒビターであり、炎症性疾患での変化が予想された。小児熱性けいれんを示す疾患には、けいれん重積症(軽傷疾患で鎮静剤投与により完治)、及び脳症(重篤で高い死亡率を示す)が含まれるが、両者の鑑別診断マーカーは存在しない。我々は、予備的な実験により、髄液中 $\alpha 2M$ が脳症マーカーとなりうる可能性を示した。本研究では、分析症例数を増やしてマーカーとしての検証を行う。また、免疫組織化学にて $\alpha 2M$ 産生細胞の同定を目指す。

3. 研究の方法

$\alpha 2M$ の検出はウェスタンブロッティング及び ELISA 法により行った。抗体は anti- $\alpha 2M$ antibody (Cappel; ICN, Aurora, OH, USA) を用いた。サンドイッチ ELISA 法では、捕捉抗体として Cappel 社抗体を、検出抗体として HRP-conjugated anti-human $\alpha 2M$ antibody (GeneTex, San Antonio, TX, USA)

を用いた。統計計算は IBM SPSS Statistics 21 (IBM Japan, Ltd. Tokyo, Japan)を用いた。

4. 研究成果

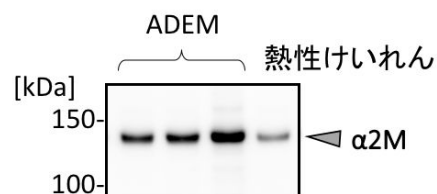
我々は、脳内で産生されるトランスフェリン(Tf)は、血清Tfとは異なるユニークな糖鎖修飾を受けていることを見出した(脳型糖鎖)。脳型糖鎖は脳内で産生されるタンパク質のタグと考えられたので、スクリーニングを行い17種類の脳型糖タンパク質を見出した。この中に $\alpha 2$ マクログロブリン($\alpha 2M$)がある。 $\alpha 2M$ は強力な内因性のプロテアーゼ阻害物質であり、炎症巣の局限化に関与している。そこで、中枢神経系の炎症である急性散在性脳脊髄炎(ADEM)及び全身性エリテマトーデス(SLE)における中枢神経障害(NPSLE)における $\alpha 2M$ の検出を行った。

(1) 小児疾患における髄液中 $\alpha 2M$ の変化

ウェスタンブロット法及びELISA法による定量

ADEM及び良性疾患である熱性けいれんの髄液をウェスタンブロット法で分析した(図1)。熱性けいれんに比べてADEMでは $\alpha 2M$ のシグナルが増加していた。サンドイッチELISA法にて定量を行うと、ADEMでは、髄液中の $\alpha 2M$ は $4.7\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、良性の熱性けいれんでは $1\mu\text{g}/\text{mL}$ と低値であった。即ち、髄液中 $\alpha 2M$ は重篤な疾患であるADEMと良性の熱性けいれんの鑑別診断マーカーになることが示された(投稿準備中)。

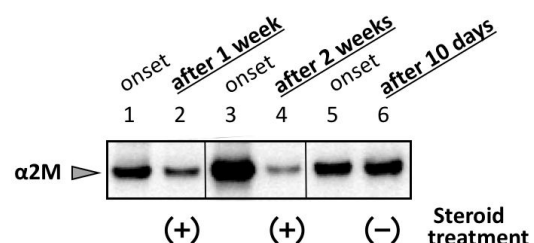
図 1



治療による $\alpha 2M$ の変化

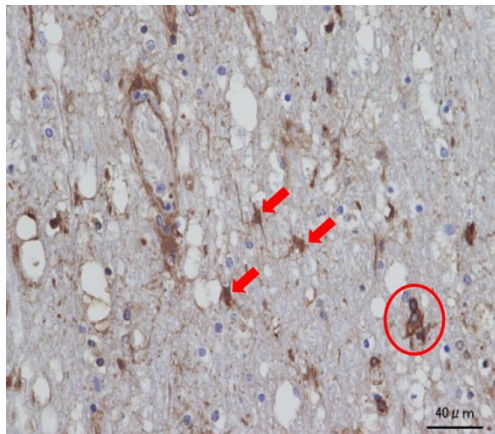
$\alpha 2M$ が炎症反応を反映するマーカーであるとするれば、治療後にそのレベルの低下が予想された。事実、ステロイド・パルス療法により、1週間及び2週間後には $\alpha 2M$ レベルは著しく低下していた(図2)。一方、診断がつかずステロイド・パルス療法を行わなかった症例では、10日後になっても $\alpha 2M$ は高値のままであった。すなわち、 $\alpha 2M$ は治療効果判定にも有効であることが示された。

図 2



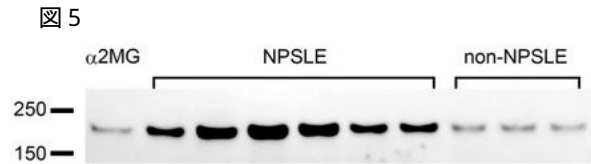
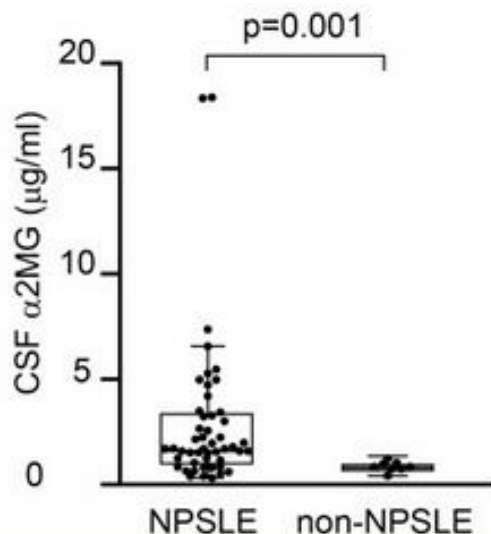
両疾患で髄液中の $\alpha 2M$ の濃度に差が認められたが、血清中の $\alpha 2M$ の濃度に差はなかった。従って、 $\alpha 2M$ の脳内での生合成が推測された。従来脳内で $\alpha 2M$ が生合成されるとの報告はなかった。そこで、 $\alpha 2M$ が増加することが確認されたヘルペス脳炎の患者切片を使って免疫組織化学を行った。脳炎患者の組織切片では、 $\alpha 2M$ 陽性のアストロサイト様細胞(赤矢印)及びミクログリア様細胞(赤丸内)が観察された(図3)。また、血管周囲にも陽性像が認められ、これはアストロサイトの突起である可能性が考えられる。以上の染色により、世界で初めて脳内での $\alpha 2M$ の生合成が示された。

図3



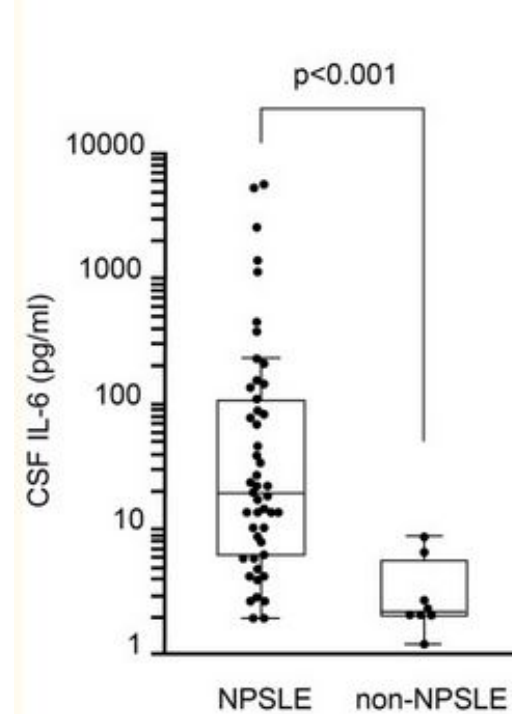
(2) NPSLEにおける髄液中 $\alpha 2M$ の測定
NPSLEはSLEに伴う中枢神経障害であり重篤な病態である。一方、SLEの治療に用いられるステロイド剤の副作用として中枢神経症状を示すことがある(non-NPSLE)。前者はステロイド剤の投与で治療するのにに対し、後者ではステロイド剤の中止が必要であることから、両者の鑑別は重要である。両群の髄液をウェスタンブロット法で解析するとNPSLEでは強いシグナルが観察されるが、non-NPSLEではコントロールと比べて変化が見られなかった(図4)。新たに開発した $\alpha 2M$ を測定するためのサンドイッチELISA法にて定量解析を行った。NPSLEでの髄液中 $\alpha 2M$ は、 $3.0\mu\text{g/mL}$ であるのに対し、non-NPSLEでは、 $1.0\mu\text{g/mL}$ であった(図5)。

図4



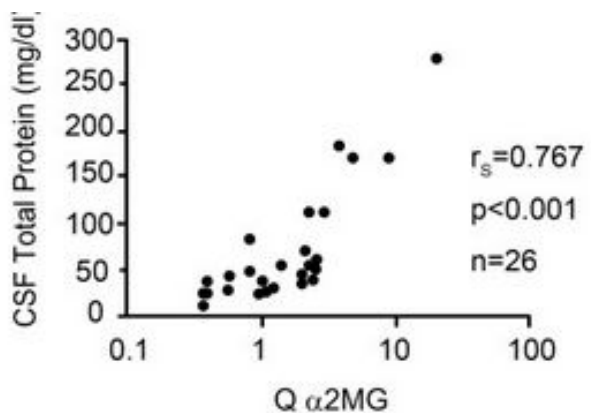
$\alpha 2M$ の上流シグナルと考えられるサイトカインの定量を行なったところ、NPSLEでは髄液中のIL-6が著しく上昇し、 124 pg/mL を示したのに対し、non-NPSLEでは 2.2 pg/mL と有意な差が認められた($p < 0.001$)(図6)。

図6



IL-6の上昇と $\alpha 2M$ の増加の相関を調べたところ、両者は高い相関係数($r = 0.767$)を示した(図7)。従って、IL-6依存性の $\alpha 2M$ の上昇はNPSLEのマーカーになることが示された(PLOS ONE, 12(10), e0186414, 2017)。

図7



【結論】
本研究により脳炎・脳症において髄液中 $\alpha 2M$ の測定が診断に有用であることが示された。

また、前者においてはステロイド・パルス療法の効果判定マーカーになることが示された。ステロイド療法は投与中止時期の判定が難しいが、本マーカーが指標となる可能性が考えられる。

また、SLE は治療のためにステロイド剤を投与するが、この副作用のために精神症状を呈することがある(ステロイドサイコース：non-NPSLE)。この際はステロイド剤の投与の中止が必要である。一方、SLE の症状として精神症状を呈することがある(NPSLE)。この場合はステロイドの大量投与が必要である。従って、NPSLE とステロイドサイコースでは全く逆の治療を行う。このため、2M による両病態の鑑別は重要である。免疫組織化学により α 2M は脳内で生合成され、局所の(炎症)反応の限局化に働くと推測された。脳内における α 2M の生合成を世界に先駆けて示すことができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Yuta Murakami, Koichi Takahashi, Kyoka Hoshi, Hiroimi Ito, Mayumi Kanno, Kiyoshi Saito, Kenneth Nollet, Yoshiki Yamaguchi, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Yasuhiro Hashimoto, and Tatsuo Mima, “Spontaneous intracranial hypotension is diagnosed by a combination of lipocalin-type prostaglandin D synthase and brain-type transferrin in cerebrospinal fluid.” *BBA General Subjects*, *in press* (accepted 180328)

Yuta Murakami, Yuka Matsumoto, Kyoka Hoshi, Hiroimi Ito, Takashi J. Fuwa, Yoshiki Yamaguchi, Madoka Nakajima, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Kenneth Nollet, Naho Kato, Rie Nishikata, Naohito Kuroda, Takashi Honda, Jun Sakuma, Kiyoshi Saito and Yasuhiro Hashimoto, “Rapid increase of “brain-type” transferrin in cerebrospinal fluid after shunt surgery for idiopathic normal pressure hydrocephalus: a prognosis marker for cognitive recovery.” *J. Biochem.*, *in press*

Tomoyuki Asano, Hiroimi Ito, Yoshinobu Kariya, Kyoka Hoshi, Akioh Yoshihara, Yoshikazu Ugawa, Hideharu Sekine, Shunsei Hirohata, Yoshiki Yamaguchi, Shuzo Sato, Hiroko Kobayashi, Kiyoshi Migita, Hiromasa Ohira, Yasuhiro Hashimoto, Hiroshi Watanabe, “Evaluation of blood-brain barrier function by quotient α 2 macroglobulin and its relationship with interleukin-6 and complement component 3 levels in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.” *PLOS ONE*, 12(10), e0186414, 2017 doi: 10.1371/journal.pone.0186414. eCollection 2017

Akioh Yoshihara, Masahiko Fukatsu, Kyoka Hoshi, Hiroimi Ito, Kenneth Nollet, Yoshiki Yamaguchi, Ryotaro Ishii, Takahiko Tokuda, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Takeo Kato, Katsutoshi Furukawa, Hiroyuki Arai, Akio Kikuchi, Atsushi Takeda, Yoshikazu Ugawa and Yasuhiro Hashimoto, “Subgroup differences in “brain-type” transferrin and alpha-synuclein in Parkinson’s disease and multiple system atrophy”, *J. Biochem.*, 160(2), 87-91, 2016 Doi: 10.1093/jb/mvw015

〔学会発表〕(計 27 件)

Yuta Murakami, Koichi Takahashi, Kyoka Hoshi, Hiroimi Ito, Mayumi Kanno, Kiyoshi Saito, Kenneth Nollet, Yoshiki Yamaguchi, Tatsuo Mima and Yasuhiro Hashimoto: “A CSF biomarker for diagnosing spontaneous intracranial hypotension”, The 9th Meeting of the International Society for Hydrocephalus and Cerebrospinal Fluid Disorders (Hydrocephalus 2017), Kobe, Hyogo (September 23-25, 2017)

Akioh Yoshihara, Masahiko Fukatsu, Kyoka Hoshi, Hiroimi Ito, Ryotaro Ishii, Takahiko Tokuda, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Takeo Kato, Katsutoshi Furukawa, Hiroyuki Arai, Akio Kikuchi, Atsushi Takeda, Yoshiki Yamaguchi, Yoshikazu Ugawa and Yasuhiro Hashimoto: “Subgroup differences in “brain-type” transferrin and alpha-synuclein in Parkinson’s disease and multiple system atrophy”, 7th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference (ACGG), Matsushima, Miyagi (November 12-15, 2015)

Tomoyuki Asano, Shuzo Sato, Hiroko Kobayashi, Yoshinobu Kariya, Hiroimi Ito, Kyoka Hoshi, Akioh Yoshihara, Yoshikazu Ugawa, Minoru Takahashi, Hideharu Sekine, Shunsei Hirohata, Hiroshi Watanabe, Hiromasa Ohira and Yasuhiro Hashimoto: “Upregulation of C3 and alpha-2-Macroglobulin in cerebrospinal fluid of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. 18th Annual Meeting of American College of Rheumatology, San Francisco (November 6-11, 2015)

〔図書〕(計 2 件)

Kyoka Hoshi, Yuka Matsumoto, Toshie Saito, Hiroimi Ito, Yoshinobu Kariya, Yoshiki Yamaguchi, Katsutoshi Furukawa, Hiroyuki Arai, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Hisashi Narimatsu, Kiyoshi Saito, Takashi Honda and Yasuhiro Hashimoto, “A Glycan Marker for Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus”, in *Glycoscience: Biology and Medicine*, Naoyuki Taniguchi, Tamao

Endo, Gerald Hart, Peter Seeberger,
Chi-Huey Wong (Eds.), Springer Verlag
Tokyo, Tokyo, pp.1-7, 2014 DOI:
10.1007/978-4-431-54836-2_177-1

〔その他〕

ホームページ等

生化学講座ホームページ：

<https://hashimoto-lab.org/>

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・医学部・生化学講座・
教授

研究者番号：80164797

(2)研究分担者

苅谷 慶喜 (KARIYA, Yoshinobu)

福島県立医科大学・医学部・生化学講座・
准教授

研究者番号：00458217

伊藤 浩美 (ITO, Hiromi)

福島県立医科大学・医学部・生化学講座・
講師

研究者番号：00450669