

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590933

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糖鎖異常の解析

研究課題名（英文） The analysis of altered glycosylation in Alzheimer's disease.

## 研究代表者

浦上 克哉 (URAKAMI KATSUYA)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：30213507

## 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トランスフェリンと免疫系関連タンパク（タンパク X とする）について糖鎖量を測定し、いずれも AD の血液中で病初期から糖鎖量が増加していることを見出した。さらにタンパク X については、AD と AD 以外の認知症の鑑別診断が可能であることも示唆された。また AD の髄液・血液中のタンパク X の糖鎖量の変化は髄液中 A $\beta$  と相関していることから、脳内の A $\beta$  の変化を血液でモニターできる指標でもあり、優秀な血液診断マーカーとなりうるということが考えられた。トランスフェリンのシアル酸の変化についても、その原因がシアル酸を付加する酵素である  $\alpha$ -2, 6 シアリルトランスフェラーゼが血液中で減少していることであることが示唆され、AD と糖鎖異常とは深く関連していると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

We measured the contents of the sugar chain in two glycoproteins which has altered glycosylation in Alzheimer's disease (AD), one is transferrin and another is the protein associated with immune system, temporarily named protein X. We indicated both of them had decreased glycosylation in very early stage of AD. The decreased levels of glycosylation of protein X was correlated with the altered levels of cerebrospinal fluid (CSF) amyloid  $\beta$  protein. The altered sugar chain of protein X in Alzheimer's serum must be a 優秀な biological marker for diagnosis of AD, that monitors the change in the brain or CSF derived from the brain. On the other way, we also found the decreased levels of  $\alpha$ -2, 6-sialyltransferase (STase) in Alzheimer's serum. STase is the enzyme which adds the sialic acid to the transferrin. This indicates the decreased sialylation of Alzheimer's serum transferrin is 原因である by the altered STase. These two changes in glycoproteins suggest the 異常な glycosylation 密接に associates the pathophysiology of AD.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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，脳神経疾患，糖鎖，診断マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

年々増加している認知症は高齢化社会に伴う重大な社会問題である。特にその中でもアルツハイマー病 (AD) は約半数を占める代表的な認知症であり、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重要である。AD の診断は、問診と認知機能検査などによる認知機能の低下を検出する方法、また、CT や MRI などの脳の構造変化 (萎縮) を検出する方法、PET や SPECT などの脳の機能異常を検出する方法イメージングによる方法が用いられている。さらに、以前より認知症の生体指標を用いた検査の研究が数多く行われており、髄液中のタウタンパクもしくはリン酸化タウタンパク、アミロイドβタンパク (Aβ) 測定の有効性が認められている。しかし、さらに簡便に検査できる血液指標が AD のスクリーニングには欠かせないものであり、早期発見や確定診断、さらには今後発展が期待される薬物治療の際の治療評価のための指標として役立つ指標の開発が待ち望まれている。

### 2. 研究の目的

我々は、新規に発見した AD における糖タンパクの糖鎖異常を診断マーカーとして確立することを目的として研究を行っている。本研究では、我々が見出している糖鎖異常が示唆されている個々の糖タンパクの糖鎖異常を解析してその異常部位を明らかにし、またその機序を解明してアルツハイマー病の病態との関連性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

糖鎖異常が確認できている糖タンパク数種 (トランスフェリンと免疫系関連タンパク: X とする) それぞれにおいて、以下の解析を行った。

(1) 多数例での髄液中・血液中の糖鎖量を測定した。

トランスフェリンのシアル酸量は、トランスフェリン測定用のサンドイッチ ELISA キットの検出を SSA レクチン (*Sambucus sieboldiana* agglutinin) に替えて検出した。タンパク X の糖鎖は、市販のサンドイッチ ELISA キットの検出を WGA (Wheat Germ Agglutinin) と Con A (Concanavalin A) レクチンに替えて測定した。糖鎖量は、吸光度を単位タンパク X 量あたり (1mg タンパク X) で補正し、WGA 結合量、Con A 結合量として表した。

(2) 糖鎖量の変化と病態との関連性を検討した。

同一患者の髄液中リン酸化タウ (p-tau181) と Aβ1-42 をサンドイッチ ELISA

法で測定し、それぞれの糖鎖量との関連を解析した。また、臨床症状の指標として、MMSE, ADAS, CDR との関連も解析した。

(3) 他の認知症群との鑑別の有用性について検討した。

タンパク X について、他の認知症群でも WGA 結合量と Con A 結合量を測定し、比較検討した。

(4) 個々の糖タンパクの糖鎖異常部位を解析した。

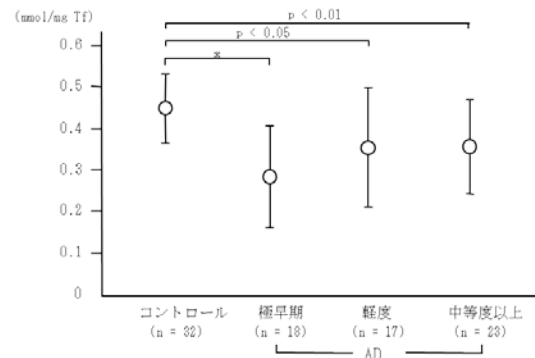
それぞれの糖タンパクの抗体を用いて protein G によって精製し、グリカナーゼで糖鎖を切り出して LC-MS により糖鎖構造を解析した。

(5) 糖鎖付加機能との関連を解析した。

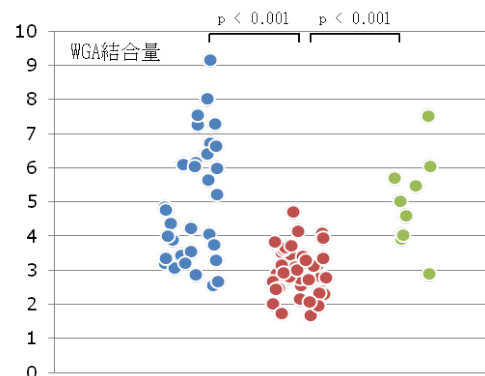
トランスフェリンのシアル酸変化については、シアル酸を付加する酵素である α-2,6 シアリルトランスフェラーゼ量を髄液中・血液中においてサンドイッチ ELISA キットを用いて測定した。

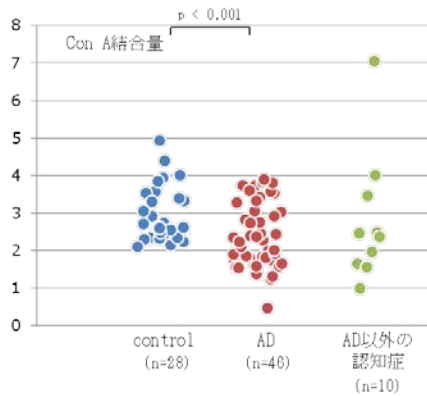
### 4. 研究成果

糖鎖測定法はレクチン酵素免疫法により、トランスフェリンのシアル酸は SSA レクチン、タンパク X の糖鎖は WGA と Con A を用いた。血液中のトランスフェリンのシアル酸量は、AD のごく早期ですでに減少していた (下図)。

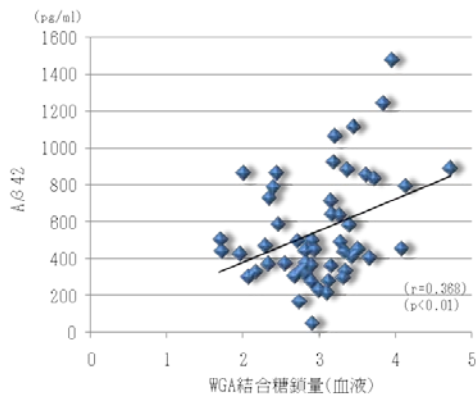


血液中タンパク X の WGA 結合量、Con A 結合量についても共に AD で減少しており、この変化もごく早期の AD で検出できることが分かった (次図)。

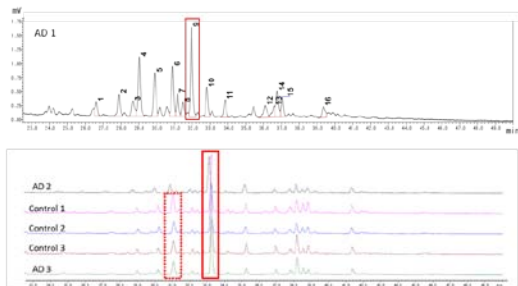




さらに WGA 結合量に関しては、髄液中の Aβ と有意に相関していることから (下図)、この指標は脳内の Aβ の変化を反映し血液でもモニターできる指標である可能性が考えられた。



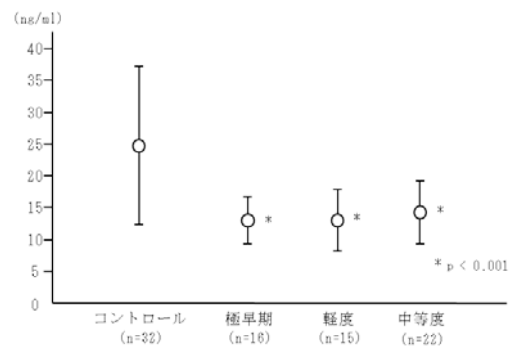
また、タンパクXの糖鎖は、少数例であるがLC-MSによる解析を行った。タンパクXの糖鎖は、6個のマンノースをもつハイマンノース型糖鎖 (Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) が検出されたが、5個のマンノースをもつハイマンノース型糖鎖 (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) は、ADのサンプルであるAD1とAD2で検出されなかった (下図)。この結果より全てのサンプルではないがADでは糖鎖のパターンが変化している可能性が高いことが示唆された。



また、血液中の分泌型 STase を測定したところ、AD の血液中では有意に低下していた (下表)。STase は、トランスフェリンをはじめとした糖鎖の末端にシアル酸を付加する酵素であり、この酵素が減少していることが AD のトランスフェリンのシアル酸量が減少している原因であると考えられた。さらにこの変化は、AD のトランスフェリンのシアル酸量減少と同様にごく早期の AD で見られ (下図)、病初期の段階から起こっている変化であることが示唆された。

	対象数	年齢	STase (ng/ml)
コントロール	32	74.7 ± 3.0	24.30 ± 12.45
AD	53	76.4 ± 4.3	18.54 ± 4.54

} p < 0.001



以上の結果から AD における糖鎖異常は、複数の糖タンパクで複数種の糖鎖において怒っており、AD の病態と深く関連していると考えられる。

## 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 9 件)

1. Hata S, Taniguchi M, . . . , Urakami K, Suzuki T (全 12 人中 2 番目, 11 番目) : 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. (査読有)
2. Ito Y, Urakami K: Evaluation of dementia-prevention classes for community-dwelling older adults with mild cognitive impairment. *Psychogeriatrics* 12, 3-10, 2012, doi: 10.1111/j.1479-8301.2011.00397.x. (査読有)
3. 谷口美也子, 浦上克哉: 血液中トランスフェリンの糖鎖異常 老年精神医学雑誌 23, 25-28, 2012. (査読無)

4. 谷口美也子, 浦上克哉: 髄液生化学的マーカーとpreclinical stageの診断 老年精神医学雑誌 23, 680-685, 2012. (査読無)
  5. 浦上克哉: アルツハイマー型認知症の検査臨床精神医学 41, 1675-1679, 2012. (査読無)
  6. Inoue M, Jimbo D, Taniguchi M, Urakami K: Touch Panel-type Demetia Assessment Scale: A new computer-based rating scale for Alzheimer's disease. Psychogeriatrics 11, 28-33, 2011, doi: 10.1111/j.1479-8301.2010.00345.x. (査読有)
  7. 浦上克哉: 認知症の認知機能評価 臨床と研究 88, 39-42, 2011 (査読無)
  8. 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, 196-204, 2011, doi: 10.1111/j.1479-8301.2011.00387.x. (査読有)
  9. Urakami K: Diagnostic biomarker for early stage of Alzheimer's disease: Current state and view in the future. Psychogeriatrics 10(2), 49-52, 2010, doi: 10.1111/j.1479-8301.2010.00331.x. (査読有)
- [学会発表] (計30件)
1. Taniguchi Mほか: Altered glycosylation of serum protein as a new diagnostic marker for Alzheimer's disease. The 8<sup>th</sup> annual meeting of Taiwanese Society of Geriatric Psychiatry (招待講演) 2013年3月10日 中山醫學大学 (台湾)
  2. Urakami K: Recent advances of diagnostic biomarkers for early stage of Alzheimer's disease. SPIE2013 (招待講演) 2013年2月22日 International Convention Center Jeju (韓国)
  3. 谷口美也子ほか「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効性」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 (広島県)
  4. 阪田幸範ほか「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 (岡山県)
  5. 木村和幸ほか「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と有効性の検討」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 (岡山県)
  6. 谷口美也子ほか「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回日本認知症学会学術集会 2012年10月27日 つくば国際会議場 (茨城県)
  7. 谷口美也子ほか「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学術集会 2012年8月23日 名古屋国際会議場 (愛知県)
  8. Taniguchi Mほか: Altered glycosylation in serum proteins of Alzheimer's disease. AAIC2012 2012年7月15日 バンクーバーコンベンションセンター (カナダ)
  9. 谷口美也子ほか「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回日本老年医学会学術集会 2012年6月28日 東京国際フォーラム (東京都)
  10. 谷口美也子ほか「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学術集会 2012年6月21日 大宮ソニックシティ (埼玉県)
  11. 谷口美也子ほか「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回日本神経学会学術集会 2012年5月22日 東京国際フォーラム (東京都)
  12. 浦上克哉「内科診療への認知症診療アドバイス」第109回日本内科学会 (招待講演) 2012年4月15日 みやこめっせ (京都府)
  13. 浦上克哉「認知症の診断: 生物学的マーカーを中心として」Parkinson's Disease Symposium 2012 (招待講演) 2012年1月14日 Sarasota (アメリカ)
  14. 谷口美也子ほか「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回日本認知症学会学術集会 2011年11月12日 タワーホール船橋 (東京都)
  15. 谷口美也子「血液中トランスフェリンの糖鎖異常の話題」アルツハイマー病研究会第12回学術シンポジウム 2011年10月2日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)
  16. Taniguchi MほかK: Serum Glycoproteins are New Diagnostic Markers of Alzheimer's Disease. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2011 2011年7月20日 ポルテ・ド・ベルサイユコンベンションセンター (フランス)

17. 谷口美也子ほか「アルツハイマー型認知症における糖鎖の解析と血液診断マーカーとしての有効性の検討」第53回日本老年医学会学術集会 2011年6月17日 京王プラザホテル(東京都)
18. 浦上克哉「認知症診断に役立つ神経徴候と簡易な神経所見」第26回老年精神医学会(招待講演)2011年6月7日 京王プラザホテル(東京都)
19. 浦上克哉「認知症の早期発見とケアに向けて」日本認知症ケア学会2010年度中国地域大会 2010年12月5日 米子コンベンションセンター(鳥取県)
20. 岡崎亮太ほか「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回中四国医学検査学会 2010年11月7日 島根県民会館(島根県)
21. 阪田幸範ほか「アルツハイマー型認知症における血中IgG糖鎖変化について(続報)」第43回中四国医学検査学会 2010年11月7日 島根県民会館(島根県)
22. 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(愛知県)
23. Taniguchi M: Glycosylation of serum protein as a new diagnostic marker for Alzheimer's disease. ICAD 2010 2010年7月15日 ハワイコンベンションセンター(アメリカ)
24. 浦上克哉「認知症診療に必要な基礎知識」第52回日本老年医学会学術集会 2010年6月26日 神戸国際会議場(兵庫県)
25. 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(兵庫県)
26. 岡崎舞ほか「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(兵庫県)
27. 浦上克哉「認知症検診と予防介入～ライフスタイルの観点から～」第52回日本老年医学会 2010年6月25日 神戸国際会議場(兵庫県)
28. 浦上克哉「簡易な神経所見のとり方実践講座」第25回4日本老年精神医学会 2010年6月24日 KKRホテル熊本(熊本県)
29. 浦上克哉「認知症医療～鑑別診断から介護・ケア・地域連携まで～」第106回日本精神神経学会学術総会 2010年5月21日 広島高裁会議場アステールプラザ(広島県)
30. 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(東京都)

〔図書〕(計4件)

1. 浦上克哉, JAF MATE社「認知症は怖くない2」2012, 159ページ
2. 浦上克哉, JAF MATE社「認知症は怖くない18のワケ」2011, 159ページ
3. 浦上克哉, 徳間書店「あなたのもの忘れ、「いわゆるボケ」ですか「認知症」ですか?」2011, 193ページ
4. 浦上克哉, 日本評論社「認知症 よい対応・わるい対応」2010, 207ページ

〔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, 木村(谷口)美也子

権利者: 国立大学法人鳥取大学

種類: 特願

番号: 2011-173946

出願年月日: 2011年8月9日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦上 克哉 (KATSUYA URAKAMI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 30213507

(2) 研究分担者

谷口 美也子 (TANIGUCHI MIYAKO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号: 50335527