

認知症における糖鎖バイオマーカー

Glycan biomarker for differentiating dementia

福島県立医科大学・医学部・生化学講座

星京香¹⁾ 伊藤浩美¹⁾ 橋本康弘*¹⁾

福島県立医科大学・医学部・神経内科学講座

吉原章王²⁾ 宇川義一²⁾

順天堂大学・脳神経外科学講座

宮嶋雅一³⁾ 新井一³⁾

東北大学・加齢医学研究所

古川勝敏⁴⁾ 荒井啓行⁴⁾

はじめに

ほとんどのタンパク質は糖鎖修飾を受けている。特に分泌タンパク質の90%以上が糖鎖修飾を受ける。この糖鎖修飾は細胞種特異的である。すなわち、細胞Aからタンパク質Xが分泌される際には糖鎖Aが付加される。一方、同じタンパク質Xが細胞Bから分泌される場合には、糖鎖Bが付加される。両タンパク質は糖鎖修飾のみが異なり、タンパク質部分は同一であることから、“糖鎖アイソフォーム”と称される(図1)。細胞Aの病的状態を知りたい場合には、糖鎖アイソフォームAのみをモニターすることが大切である。以下に、糖鎖アイソフォームを認知症のマーカーに利用した例を示す。

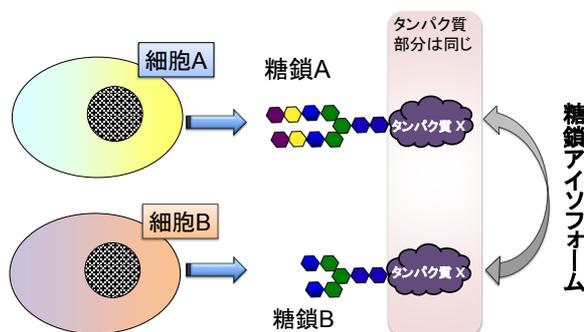


図1 糖鎖修飾の細胞種特異性

細胞種が異なると同じタンパク質でも異なる糖鎖修飾を受ける。A細胞はタンパク質Xに糖鎖Aを付加するが、B細胞は同じタンパク質に糖鎖Bを付加する。

I. 特発性正常圧水頭症の糖鎖マーカー

特発性正常圧水頭症 (iNPH) は、髄液代謝異常に基づく老人性の水頭症である。脳室拡大と認知症を示すことから、アルツハイマー病との鑑別が重要である。

iNPHはタップテスト(30mLの髄液除去による症状の改善をモニターする)により診断される¹⁾。しかし、タップテストは擬陰性が多く、見逃される患者が少な

* Corresponding Author: Yasuhiro Hashimoto

1) Kyoka Hoshi, Hiromi Ito, Yasuhiro Hashimoto: Departments of Biochemistry, Fukushima Medical University

2) Akioh Yoshihara, Yoshikazu Ugawa: Departments of Neurology, Fukushima Medical University

3) Masakazu Miyajima, Hajime Arai: Department of Neurosurgery, Juntendo University

4) Katsutoshi Furukawa, Hiroyuki Arai: Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

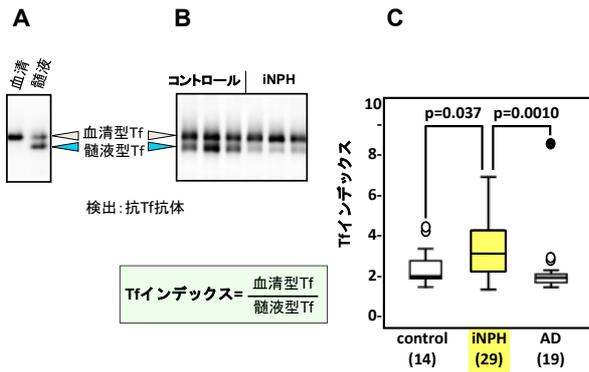


図2 髄液型トランスフェリンは特発性正常圧水頭症のマーカーとなる

髄液中には血清由来の血清型トランスフェリン (Tf) と髄液に特徴的な髄液型 Tf の 2 種類の Tf が存在する (A)。髄液型 Tf は特発性正常圧水頭症 (iNPH) とコントロールおよびアルツハイマー病 (AD) の鑑別診断マーカーとなる (B, C)。

くない。我々は、髄液を使って新たなバイオマーカーの探索を行った。

トランスフェリンは鉄輸送タンパク質であり、肝細胞から血液中に活発に分泌されている。血清トランスフェリンはウェスタンブロット上で単一バンドを示す。我々は、髄液中のトランスフェリンは 2 本バンドを示すことを明らかにした (図 2A)^{2,3)}。一方は、血清トランスフェリンと同じ移動度を示した (血清型 Tf)。もう一方は移動度が大きく、髄液に特徴的なバンドであった (髄液型 Tf)。iNPH とコントロールにおける両アイソフォームの定量を行ったところ、血清型 Tf は変化しないのに対し、髄液型 Tf は減少していることが明らかとなった (図 2B)。ウェスタンブロットによる定量は、プロット間の誤差が大きいため、血清型 Tf / 髄液型 Tf の比率を Tf インデックスと定義して、複数症例での分析を行った。この結果、Tf インデックスは iNPH とコントロールおよびアルツハイマー病との鑑別に有効であることが示された (図 2C)²⁾。

因に、通常の Tf 測定用のサンドイッチ ELISA では、Tf 糖鎖アイソフォームは区別されず、総トランスフェリンが測定される。上記疾患では総トランスフェリン量の有意差は検出されなかった。

II. Tf アイソフォームの糖鎖分析および抗 Tf 抗体を用いた免疫組織化学

糖鎖解析の結果、髄液型 Tf は、血清型 Tf とは異なるユニークな糖鎖構造を持つことが示された (図 3A)⁴⁾。

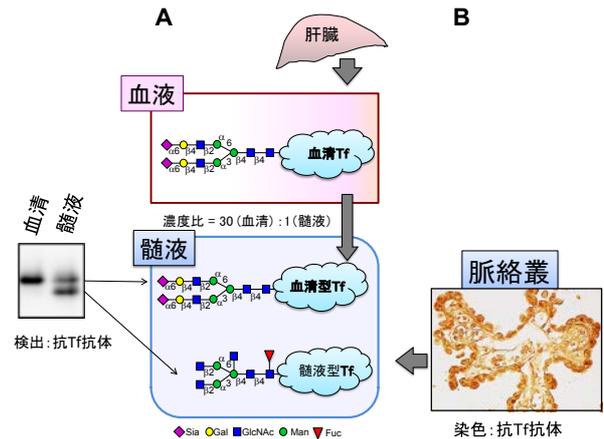


図3 トランスフェリンの糖鎖構造と免疫組織化学

血清型 Tf は、血清の Tf と同様にシアル酸 α 2,6 ガラクトース構造を糖鎖末端に持つ。一方、髄液型 Tf は上記糖鎖末端を欠き、分枝型 N-アセチルグルコサミンおよびフコースによる修飾を受けている (A)。抗 Tf 抗体により脈絡叢上皮細胞が強く染色される (B)。

この糖鎖は血清中ではほとんど見られないことから、髄液型 Tf は中枢神経系内で生合成されると考えられた。そこで、脳の各組織を系統的に免疫組織化学染色した。その結果、髄液産生組織である脈絡叢上皮細胞が抗 Tf 抗体により強く染色された (図 3B)。従って、髄液型 Tf は脈絡叢上皮細胞で生合成され、髄液の産生に伴って分泌されると考えられる²⁾。iNPH では、髄液過剰の 2 次的現象と考えられるが、髄液産生が正常者の半分程度に減少している。髄液型 Tf の減少は、この髄液産生の減少に対応する現象と考えられる。

III. 髄液型糖鎖を持つタンパク質群の検索

血清糖タンパク質は 500 種類以上存在するが、そのほとんどは血清トランスフェリンと同様の糖鎖を持っている。我々は、このアナロジーとして、髄液型糖鎖を持つ“糖タンパク質群”の探索を行った (図 4A)。この探索には糖鎖構造を認識するレクチンというタンパク質をプローブとして利用した。具体的には、髄液型糖鎖に結合性を示す PVL レクチンをプローブとした。髄液を SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写し、PVL レクチンで検出を行った。この結果、髄液型 Tf に加えて多数のバンド (髄液型糖タンパク質) が検出された (図 4B)。この髄液型タンパク質は、糖鎖構造は共通であるがコア・タンパク質が異なると考えられた。また、髄液型タンパク質は、中枢神経系内で生合成されていることが推測された。コア・タンパク質を同定する為に、髄液を PVL レクチン固定化カラムに

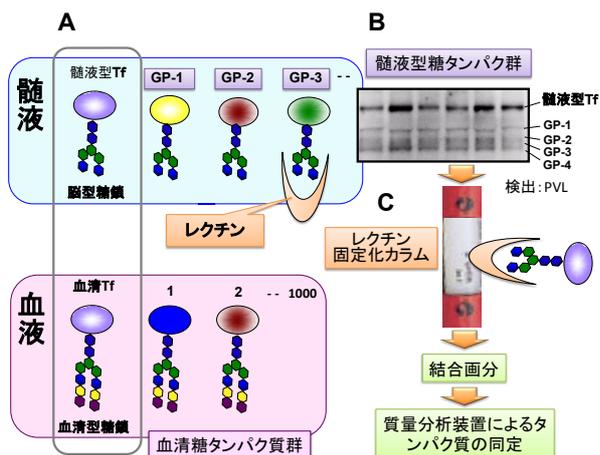


図4 髄液型糖タンパク質群のスクリーニング

血清糖タンパク質は血清(型)Tfと同様の糖鎖を持っている(A)。同様に、髄液中にTf以外の髄液型糖鎖を持つタンパク質を想定し、この糖鎖に結合性を示すPVLによる髄液のレクチンプロット分析を行った(B)。髄液型糖タンパク質を精製するためにPVLレクチンカラムに髄液をアプライし、結合画分を溶出し、質量分析装置によりタンパク質の同定を行った(C)。

アプライし、結合画分を溶出した(図4C)。溶出されたタンパク質をSDS-PAGEで分離し、それぞれのバンドを切り出した後トリプシン消化し、質量分析を行った。遺伝子の配列情報から予想される tryptic peptide のパターンとの比較によりコア・タンパク質の同定を行った(ペプチド・マス・フィンガープリント法)。現在までに15種類の髄液型タンパク質を同定している。また、これらのいくつかは中枢神経系疾患の診断マーカーになることが示されている。

おわりに

神経系組織は、体細胞に比べユニークな糖鎖修飾を行うことが知られている。しかし、これは脳組織全体をホモジネートし、糖鎖を切り出して分析しているために、どの細胞のどの分子にユニークな糖鎖が結合し

ているかはほとんど解析されていなかった。この基本的な情報が明らかにされることにより、神経系内の細胞種特異的マーカーが利用できるようになることが期待される。さらに、その疾患マーカーへの応用が可能となる。このコンセプトは、複雑な組織・細胞構築を持つ中枢神経系の疾患マーカー探索に新しい道筋を与えるものと考えている。

謝辞

本研究は以下の研究費によって行われた。NEDO MG プロジェクト、厚生労働省科学研究費No.2011-難治-一般-018、JST A-step No. AS221Z00232F、AS231Z0153、241FT0255、149、文部科学省科学研究費No. 23590367、新学術領域研究No. 23110002(神経糖鎖生物学)、橋渡し研究加速ネットワークプログラム・シーズB(B-39)

参考文献

- 1) Mori, E., et al., Guidelines for management of idiopathic normal pressure hydrocephalus: second edition. Neurol Med Chir (Tokyo), 2012. **52** (11) : p. 775-809.
- 2) Futakawa, S., et al., A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH. Neurobiol Aging, 2012. **33** (8) : p. 1807-15.
- 3) Hoffmann, A., et al., 'Brain-type' N-glycosylation of asialo-transferrin from human cerebrospinal fluid. FEBS Lett, 1995. **359** (2-3) : p. 164-8.
- 4) Nagae, M., et al., Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin. Glycobiology, 2014. **24** (8) : p. 693-702.

この論文は、平成27年11月21日(土)第21回東北老年期認知症研究会で発表された内容です。