

課題番号：16

髄液成分の血中移行に関する研究

[1] 組織

代表者：橋本 康弘
(福島県立医科大学医学部生化学講座)
対応者：荒井 啓行
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：星 京香
(福島県立医科大学医学部生化学講座)

研究費：物件費30万円

[2] 研究経過

【研究目的・概要】

髄液バイオマーカーの測定のためには腰椎穿刺による髄液採取が必要である。しかし、腰椎穿刺の侵襲性のために、一般診療の現場ではハードルが高い検査である。もし、髄液成分が血液中に移行し、髄液中濃度を反映していれば、血液を用いての髄液バイオマーカーの測定が可能となる。我々は、脳内で作られるバイオマーカーの血清中での検出を試みた。測定対象は、プロスタグランジン D2 合成酵素 (PGD2S) および脳型トランスフェリン (Tf) である。PGD2S は、主にクモ膜で生合成され、髄液中で高い濃度を示す。一方、脳型トランスフェリンは主に脈絡叢で生合成される。これらの髄液に特徴的なタンパク質の血中への移行を調べる事により、血液による髄液バイオマーカー測定の可能性を検証することが本研究の目的である。

【研究打ち合わせ】

加齢医学研究所の担当教官である荒井啓行教授とは以前より共同研究を行っており、年間5回の研究打ち合わせを行った。また、荒井教授より臨床検体の供与を受けた。今後も緊密な連絡をとる予定である。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は以下に示す研究成果を得た。

【PGD2S の測定】

PGD2S は、主にクモ膜で産生され、髄液中で高い濃度を示す。PGD2S 濃度を、髄液、板間静脈(髄

液に直接接している静脈)、および末梢静脈血で測定したところ、それぞれ $3\sim 6\ \mu\text{g/mL}$ 、 $200\sim 220\ \text{ng/mL}$ 、および $70\sim 170\ \text{ng/mL}$ であった。すなわち、髄液から板間静脈を経て末梢血に至る PGD2S の移行が示唆された。なお、Tsutsumi らは PGD2S を対象として同様の分析を行ない、髄液、板間静脈、および末梢静脈血の濃度を、それぞれ $8.3\ \mu\text{g/mL}$ 、 $259\ \text{ng/mL}$ 、および $108\ \text{ng/mL}$ と報告しており、この結果は、我々の測定と近い値を示している。以上の結果は、PGD2S の髄液から板間静脈を経て末梢静脈に至る移行経路の存在を示唆している。また、PGD2S の髄液から末梢静脈の移行率は少なくとも2%以上である事が示された。

【脳型 Tf の測定】

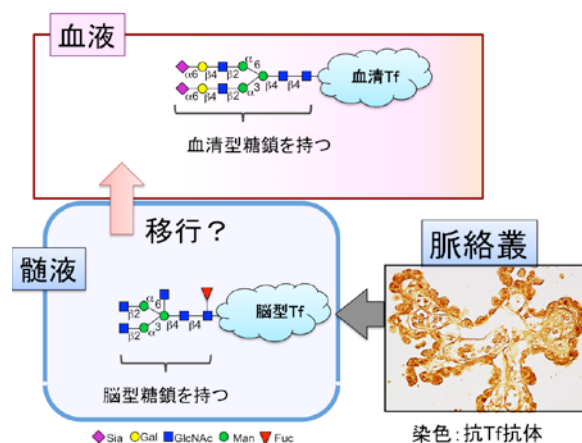


図1 脳型および血清 Tf アイソフォーム

脳型 Tf は脈絡叢で生合成され、髄液に特徴的な成分として存在する。一方、血清 Tf は血中に高濃度で存在する。両者のアミノ酸配列は同一であるが、糖鎖修飾が異なっている。

脳型 Tf は脈絡叢で生合成される髄液に特徴的な成分である(図1)。その髄液中濃度は $10\ \mu\text{g/mL}$ であることから、PGD2S と同様の移行率を示せば、血中では $200\ \text{ng/mL}$ の濃度であることが期待される。一方、血液中には肝臓に由来する血清 Tf が $2\sim 3\ \text{mg/mL}$ の高濃度で存在する。血清 Tf と脳型 Tf はアミノ酸配列が同一であるため、両者を抗体で区別するのは難しい。一方、両者は糖鎖修飾が異なっている。すなわち、脳型 Tf に特徴的な糖鎖修飾を検出する事ができれば、血清 Tf との分別定量が可能となる。我々は、レクチンと称される糖鎖結合分子を

用いて分別定量の系を開発した(図2)。この方法では、Tfを抗体によってマイクロタイタープレートに捕捉し、PVL レクチンによって脳型 Tf の糖鎖を、SSA レクチンによって血清 Tf を検出する。いずれの検量線も 3 ng~70 ng/mL の範囲で直線性を示した。また、糖鎖特異的なアッセイが可能であった。

以上のアッセイ法にて、血中 Tf の測定を行なったところ、血清 Tf は測定可能であったが脳型 Tf のシグナルは検出できなかった。

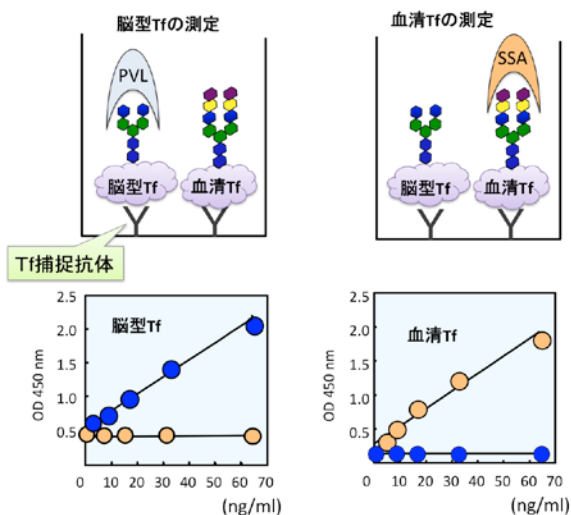


図2 脳型および血清 Tf アイソフォームの測定法

両アイソフォームを抗 Tf 抗体で捕捉する。脳型糖鎖を認識する PVL レクチンにて脳型 Tf を検出する(左のパネル)。一方、血清型糖鎖を認識する SSA レクチンにて血清 Tf を検出する(右のパネル)。

【考察】

髄液に特徴的な成分である PDG2S および脳型 Tf の血中への移行を検討した。PDG2S は、少なくとも2%が血中に移行する事が示された。一方、脳型 Tf の移行は検出されなかった。後者については、2つの可能性が考えられる。一つは、マーカーの分子サイズである。PDG2S は、19 kDa と比較的小さな分子であるのに対し、脳型 Tf は 70 kDa の分子サイズを示す。この分子サイズの違いが血中移行の効率に影響している可能性が考えられる。他の理由としては、アッセイ系の問題が考えられる。レクチンは抗体に比べるとターゲットに対する結合親和性が弱い。従って、血清サンプルのような高濃度の夾雑タンパク質の存在下では、結合が阻害される可能性がある。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、低分子の髄液マーカーであれば血中へ移行する可能性が示された。荒井啓行教授より供与されている各種認知症の髄液および血清におい

て、マーカーを測定し両者の相関を調べる予定である。これによって、血液を用いた髄液マーカー測定が可能となれば、侵襲性の高い腰椎穿刺を行なう事なく、脳疾患の診断が可能となる。

[4] 成果資料

- ① Akio Yoshihara, Masahiko Fukatsu, Kyoka Hoshi, Hiromi 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.*, 2016 in press
- ② Yoshinobu Kariya, Yukiko Kariya, Toshie Saito, Shuhei Nishiyama, Takashi Honda, Keiko Tanaka, Mari Yoshida, Kazuo Fujihara and Yasuhiro Hashimoto, "Increased cerebrospinal fluid osteopontin levels and its involvement in macrophage infiltration in neuromyelitis optica", *BBA Clinical*, 3, 126-134, 2015 doi: 10.1016/j.bbacli.2015.01.003
- ③ Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Reiko Fujinawa, Takashi Saito, Nobuhisa Iwata, Takaomi C. Saïdo, Miyako Nakano, Yoshiki Yamaguchi, Yasuhiro Hashimoto, Matthias Stanfenbeil, Hiroyuki Hatsuta, Shigeo Murayama, Hiroshi Many, Tamao Endo and Naoyuki Taniguchi, "An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease", *EMBO Mol. Med.*, 7(2), 175-89, 2015 doi: 10.15252/emmm.201404438
- ④ 橋本康弘、星 京香：“アルツハイマー病の発症メカニズム：髄液糖鎖マーカーの探索”、日本臨床検査医学会東北支部会誌、in press
- ⑤ 星 京香、吉原章王、伊藤浩美、宮嶋雅一、新井 一、宇川義一、古川勝敏、荒井啓行、橋本康弘：“認知症における糖鎖バイオマーカー”、老年期認知症研究会誌、in press
- ⑥ 橋本康弘、星 京香、本多たかし、新井 一、宮嶋雅一、荒井啓行、古川勝敏：“脳型トランスフェリンの基礎と臨床：疾患マーカーとしての糖鎖修飾”、「Annual Review 神経 2015」、(株)中外医学社、東京 2015 年 1 月