

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
(先端計測分析技術・機器開発プログラム)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 脳脊髄液産生マーカーによる脳脊髄液漏出症の診断法の開発
(英語) Development of diagnostic means for spontaneous intracranial hypotension by utilizing markers for cerebrospinal fluid production

研究開発実施期間: 2016年9月1日～2019年3月31日(予定)

研究開発代表者 氏名: (日本語) 橋本 康弘
(英語) Yasuhiro Hashimoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 福島県立医科大学・医学部生化学講座・教授
(英語) Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

【研究目的】

本研究の最終的な目的は、脳脊髄液産生マーカーであるトランスフェリン(Tf)糖鎖異性体を測定する機器の開発である。この機器により、脳脊髄液漏出症の迅速診断を目指す。

【研究の背景】

脳脊髄液は、脳の周囲に存在する体液である。脳脊髄液は血液と“血液脳関門”により隔てられており、脳由来の固有成分に富むと考えられている。我々は、脳脊髄液には糖鎖修飾が異なる2種類のトランスフェリンが存在することを見出した。その内の1つは、脳に特徴的な糖鎖を持ち、髄液産生組織である脈絡叢からの分泌が示唆された(脳型トランスフェリン)。他の1つは、血中のトランスフェリンと同様の糖鎖を持ち、血液から移行した成分と考えられた(血清型トランスフェリン)。

交通事故(むち打ち症)やスポーツ外傷により、脳脊髄液が漏出することがある。一方、明確な原因がないにもかかわらず、脳脊髄液の漏出を示す症例がある(特発性脳脊髄液漏出症)。原因のいかに関わらず、脳脊髄液が漏出により減少すると、脳が偏位して、頭痛、めまい、耳鳴りなど多

彩な症状を示す。診断はMRI・CTなどの画像診断で行うが、典型的な所見を示さない例もあり、診断に難渋することがある。従って、新たなバイオマーカーとその測定方法の開発が求められていた。我々は、脳脊髄液漏出症では脳型トランスフェリンが増加することを見出した。しかし、測定方法はウェスタンブロット法であり、熟練した研究者が2日間にわたり煩雑な実験操作を行う必要があった。従って、迅速かつ簡便な測定方法の開発が求められていた。

【研究開発項目および成果】

本マーカーの構造的な特徴は、糖鎖部分にあることから、糖鎖認識分子であるレクチンをプローブとして用いた。レクチンをプローブとして固定し、サンプル中の糖鎖を特異的に捉え、複数のマーカーを同時に検出することのできるツールを使用した。目標は、(i) サンプルの前処理、(ii) レクチンによる脳型トランスフェリンの捕捉、(iii) 捕捉状況の検出の3つの工程を行うことのできる一体化装置である。当初の計画では、研究期間内に、上記の装置の仕様書の作成を行うこととしていたが、幸い、中間評価時点で仕様書作成の目処が立ったことから、(ii) 捕捉と(iii) 検出の工程を一体化した装置(α バージョン)を前倒して作製した。

以下に研究開発項目およびその成果を記す。

(1) レクチンプローブ(糖鎖認識分子)の決定

脳型 Tf は *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を糖鎖末端に持つことが特徴である。GlcNAc を認識するレクチンをスクリーニングし、プローブに最適なレクチンを決定した。

(2) レクチン/抗体・ELISA 法の開発と臨床検体の測定

一体化装置に先立って、レクチン/抗体サンドイッチ ELISA 法(マニュアル法)により脳型トランスフェリンの測定を行なった。脳脊髄液漏出症患者 137 症例および非漏出症のコントロール 56 例の脳型トランスフェリンの測定により感度 85%、特異度 86%で両者が鑑別された。

(3) 一体化装置(α バージョン)の作製と臨床検体の測定

一体化装置(α バージョン)を作製し、臨床検体の測定を行なったところ、感度 72%、特異度 75%で鑑別された。使用した脳脊髄液量は $20 \mu\text{L}/\text{test}$ であり、3 時間で測定が可能であった。CV 値は 10% であり、妥当な範囲であった。

【研究成果の意義】

本研究では、当初計画を前倒しして一体化装置(α バージョン)の作製を行なった。(i) の前処理装置は単体で実用化の実績があるため、 α バージョンと連結させた最終的な一体化装置(β バージョン)の作製は比較的容易であると考えられる。 β バージョンでは使用サンプル量を $500 \mu\text{L}$ とし、1 時間以内の測定を目指す。これによって、外来初診時に測定結果が得られれば、その後の検査予定および治療方針の決定に役立てることができる。

脳脊髄液漏出症では、髄液の漏出に伴って代償性に髄液産生が増加すると考えられる。従って、脳型トランスフェリンは髄液の産生に伴って増加するバイオマーカーと考えられる。従来、本疾患の診断は形態学的方法が主であった。本マーカーは、髄液分泌機能を反映する定量的かつ客観的なバイオマーカーであり、従来の方法とは質的に異なる新たな補助診断法を提供できる。今回は原因不明(特発性)の髄液漏出の診断を行ったが、成長過程にある小・中学生のスポーツ外傷や交通事故後の後遺症に伴う脳脊髄液漏出は稀ではないと考えられている。事実、AMED 障害者対策総合研

究開発事業(令和1年～3年度)「児童・思春期例における脳脊髄液漏出症の病態と低髄液圧を示す周辺病態の解明及び客観的診断法に関する研究」(研究開発代表者 荒木信夫)が開始され、本疾患の重要性が注目されている。この研究に、今回の研究開発代表者である橋本康弘が参加しており、上記の成果の応用・貢献が期待される。

Overview of the research

1. Aim of the research

Final goal of the research is developing a machine for measuring transferrin isoforms, which differ in their glycan structures. The machine will provide rapid and high throughput method for quantifying a “brain-type” transferrin isoform, which is a diagnostic marker for leakage of cerebrospinal fluid, spontaneous intracranial hypotension (SIH).

2. Research background

Cerebrospinal fluid (CSF) is body fluid surrounding the brain. CSF is sequestered from blood by blood-brain-barrier, and it contains various biomarkers derived from the brain. We found that CSF contains transferrin isoforms; one has alpha2,6sialic acid-terminated glycans and is derived from the blood (serum-type transferrin) whereas another has N-acetylglucosamine (GlcNAc)-terminated glycans (brain-type transferrin) and is derived from choroid plexus, CSF producing tissue. The latter isoform was found to be a marker for altered CSF production.

Spontaneous intracranial hypotension (SIH) is caused by CSF leakage. Patients with SIH shows orthostatic headache, tinnitus, and dizziness due to deviation of the brain. SIH is diagnosed by MRI and CT, but some of patients do not show typical morphological changes and their diagnosis is difficult. Therefore, biomarkers for SIH has been searched for the accurate diagnosis. We found that brain-type transferrin is increased in CSF of SIH. The marker is quantified by immunoblot analysis, which requires time- and labor-consuming processes by skillful researchers. In the present study, we have developed a simple and rapid method for measuring the marker.

3. Research items and results

Glycan-binding proteins, lectins, were used as probes for glycan isoforms. Lectin is immobilized on a carrier, by which specific glycan isoforms are captured. Final goal of the study is establishing a specification of integrated machine, which is composed of (i) pretreatment devise, (ii) lectin-immobilized devise, and (iii) detection devise. At the mid-term review we completed an initial version of specification and, as an ahead of schedule, we started to prepare an integrated machine (alpha-version), which is composed of (ii) lectin-immobilized and (iii) detection devise. Research items completed are as follows:

(1) Selection of lectin

The marker had GlcNAc at non-reducing termini. High affinity lectin for GlcNAc was identified.

(2) Development of sandwich ELISA using the lectin

We developed a lectin/antibody-ELISA, in which all transferrin isoforms were captured with immobilized anti-transferrin antibody and then detected with the GlcNAc-binding lectin. The ELISA differentiated SIH (137

cases) from non-SIH (56 cases) with sensitivity 85% and specificity 86%.

(3) Preparation of integrated machine (alpha-version) and its application to specimen.

Alpha-version machine was prepared and applied for measuring brain-type transferrin. SIH was differentiated from non-SIH with sensitivity 72% and specificity 75%. Twenty micro liters of CSF was used for the analysis, which is completed within 3 hours. Coefficient of variation was 10%.

4. Significance of the study

In the present study we prepared alpha-version machine as an ahead of schedule. Pretreatment devise has been already released to the market and its combine to alpha-version machine will be feasible to prepare the final form of the machine (beta-version). With the beta-version machine, we plan to utilize 0.5 mL CSF and completing the assay within one hour. The rapid measurement will help to plan future clinical examinations and therapeutic strategy.

As the marker of CSF leakage, we analyzed GlcNAc-terminated transferrin in SIH. CSF leakage is suspected to occur in sequela after car accident and athletic injury. For these disorders, diagnostic markers have not been established yet. GlcNAc-terminated transferrin would be applicable to these disorders.