

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfers: Development Advanced Measurement and Analysis Systems (AMED-SENTAN)

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

研究開発担当者 (日本語) 福島県立医科大学医学部生化学講座 教授 橋本 康弘  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Biochemistry, Fukushima Medical University, Professor, Yasuhiro Hashimoto

実施期間：平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 脳型 Tf 測定系の最適化および臨床検体を用いた測定  
開発課題名：(英語) Optimization of measuring “brain-type” transferrin and its application to clinical specimen

研究開発分担者 (日本語) グライコバイオマーカー・リーディング・イノベーション株式会社  
主席研究員 久野 敦  
所属 役職 氏名：(英語) GlycoBiomarker Leading Innovation Co. Ltd., Chief Technology Officer, Atsushi Kuno

分担研究 (日本語) 脳型 Tf の精製および構造解析  
開発課題名：(英語) Purification and structural analysis of “brain-type” transferrin

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所 糖鎖構造生物学研究チーム チームリーダー 山口 芳樹  
所属 役職 氏名：(英語) Structural Glycobiology Team, Global Research Cluster, RIKEN Institute, Team Leader, Yoshiki Yamaguchi

分担研究 (日本語) 臨床検体および検査データの収集  
開発課題名: (英語) Collection of clinical records and specimen

研究開発分担者 (日本語) 福島県立医科大学医学部脳神経外科学講座 教授 齋藤 清  
所属 役職 氏名: (英語) Department of Neurosurgery, Fukushima Medical University,  
Professor, Kiyoshi Saito

分担研究 (日本語) 臨床検体および検査データの収集  
開発課題名: (英語) Collection of clinical records and specimen

研究開発分担者 (日本語) 国際医療福祉大学臨床医学研究センター 非常勤講師 高橋 浩一  
所属 役職 氏名: (英語) Medical Research Center, International University of Health and Welfare,  
Part-time Lecturer, Koichi Takahashi

分担研究 (日本語) 臨床検体および検査データの収集  
開発課題名: (英語) Collection of clinical records and specimen

研究開発分担者 (日本語) 順天堂大学医学部脳神経外科学講座 前任准教授 宮嶋 雅一  
所属 役職 氏名: (英語) Department of Neurosurgery, Juntendo University,  
Associate Professor, Masakazu Miyajima

## II. 成果の概要（総括研究報告）

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)糖鎖異性体を迅速に測定する機器の開発である。本マーカーの特徴は、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スクリーニングし、その結合条件の最適化を行った。このため、以下の研究開発項目(1)から(6)を実施した。

### (1) レクチンの選択

脳脊髄液中には2種類のTf糖鎖異性体が存在する。血清由来の血清型Tfおよび髄液産生組織である脈絡叢由来の脳型Tfである。血清型Tfは糖鎖末端にシアル酸 $\alpha$ 2,6ガラクトースを持ち、脳型Tfはこの2糖を欠き、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を持つことが特徴である。両糖鎖末端を特異的に認識するレクチンをスクリーニングし、それぞれに結合するレクチン3種類を同定した。また、一部のレクチンについてはBiacore解析を行った。Tf糖鎖異性体への結合性を定量的に評価するために、レクチン/抗体・ELISA法を開発する必要がある。上記レクチンを使ったELISA法の開発を開始した。

### (2) 脳型Tf標品の精製と構造解析

ヒト脳脊髄液1リットルを収集し、脳型Tfの精製を開始した。

### (3) Tf糖鎖異性体の調製

血清Tfをシアリダーゼ処理し、アシアロTf(ガラクトース末端Tf)を作製した。さらに、アシアロTfをガラクトシダーゼで消化し、アシアロ,アガラクトTf(GlcNAc末端Tf)標品を調製した。

### (4) 臨床検体及び検査データの収集

臨床検体及び検査データを80症例収集した。

### (5) 臨床検体を用いた測定

開発中のレクチン/抗体・ELISA法を用いて脳脊髄液中のマーカーが測定可能か否かを検討した。

### (6) 脳型Tfの脳内における発現解析

ヒト脳におけるマーカーTfの発現解析の第一段階として剖検脳切片を使った免疫組織化学を行った。

This study aims to develop a machine for measuring a marker for cerebrospinal fluid (CSF) production, leading to rapid diagnosis of spontaneous CSF leakage (SCL) or spontaneous intracranial hypotension (SIH). The marker is a transferrin (Tf) isoform, which has a unique *N*-glycan. We searched for lectins as probes for the glycan isoform and characterized their glycan-binding kinetics.

(1) Screening of lectins

CSF contains two glycan-isoforms of Tf; one has alpha2,6sialic acid-terminated glycans (serum-type Tf) and the other has *N*-acetylglucosamine-terminated glycans (brain-type Tf). We identified lectins, which specifically recognized these glycan structures. Some of lectins were subjected to Biacore analysis to characterize their binding kinetics. We started to establish ELISA, in which lectins and an anti-Tf antibody were used for sandwich-probes.

(2) Purification of brain-type Tf

We collected 1 liter of CSF and started purification of brain-type Tf.

(3) Preparation of glycan-isoforms of Tf

Serum Tf was treated with sialidase to prepare asialo-Tf (galactose-terminated Tf). Asialo-Tf is further treated with galactosidase to prepare asialo-, agalacto-Tf (GlcNAc-terminated Tf).

(4) Collection of clinical specimens and records

We collected 80 specimens of CSF and clinical records.

(5) Assay for clinical specimens

We started to establish an assay system for measuring brain-type Tf in CSF by lectin/anti-Tf antibody ELISA.

(6) Analysis on brain-type Tf expression in the brain

We started immunohistochemistry to analyze Tf expression in the brain.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌3件、国際誌3件）

1. Akasaka-Manyu K, Kawamura M, Tsumoto H, Saitoh Y, Kitazume S, Hatsuda H, Miura Y, Hisanaga S, Murayama S, Hashimoto Y, Manyu H, Endo T. Excess APP O-glycosylation by GalNAc-T6 decreases A $\beta$  production. *Journal of Biochemistry*. 2017, 161, 99-111.
2. Ito H, Hoshi K, Osuka F, Gotoh M, Saito T, Hojo H, Suzuki R, Ohira H, Honda T, Hashimoto Y. Lectin inhibits antigen-antibody reaction in a glycoform-specific manner: Application for detecting  $\alpha$ 2,6sialylated-carcinoembryonic antigen. *PROTEOMICS*. 2016, 16, 3081-4.
3. Yoshihara A, Fukatsu M, Hoshi, K Ito H, Nollet K, Yamaguchi Y, Ishii R, Tokuda T, Miyajima M, Arai H, Kato T, Furukawa K, Arai H, Kikuchi A, Takeda A, Ugawa Y, Hashimoto Y. Subgroup differences in “brain-type” transferrin and alpha-synuclein in Parkinson’s disease and multiple system atrophy. *Journal of Biochemistry*. 2016, 160, 87-91.
4. 星 京香, 吉原章王, 深津真彦, 金子知香子, 伊藤浩美, 橋本康弘. 糖鎖バイオマーカーによる特発性正常圧水頭症と神経変性疾患の鑑別. *生体の科学*. 2016, 67, 498-499.
5. 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*. 2016, 25, 7-13.
6. 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*. 2016, 21, 17-19.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 髄液バイオマーカーによる特発性低髄液圧症候群（脳脊髄液漏出症）の診断. 口頭発表. 村上友太, 高橋浩一, 星 京香, 伊藤浩美, 菅野真由美, 齋藤 清, 橋本康弘, 美馬達夫. 第18回日本正常圧水頭症学会, 北九州, 2017/2/4~5, 国内
2. 糖鎖プローブとしてのレクチン: 認知症の糖鎖マーカーの検出. 口頭発表. 橋本康弘. 第2回レクチン技術研究会, 東京, 2016/12/5, 国内
3. 特発性低髄液圧症候群（脳脊髄液漏出症）の診断における新たな髄液バイオマーカーの模索. 口頭発表. 村上友太, 高橋浩一, 星 京香, 伊藤浩美, 菅野真由美, 齋藤 清, 橋本康弘, 美馬達夫. 第9回日本水頭症脳脊髄液学会, 名古屋, 2016/11/13, 国内
4. 特発性低髄液圧症候群（脳脊髄液漏出症）の診断における髄液中バイオマーカー. 口頭発表. 村上友太, 星 京香, 菅野真由美, 伊藤浩美, 齋藤 清, 橋本康弘, 宮嶋雅一, 新井 一, 高橋浩一, 美馬達夫. 日本脳神経外科学会 第75回学術総会, 福岡, 2016/9/29~10/1, 国内
5. ホルマリン固定大腸癌由来の $\alpha$ 2,6 シアリル化癌胎児性抗原の検出, ポスター発表. 伊藤浩美, 星 京香, 大須賀文彦, 後藤満一, 齋藤拓朗, 北條 洋, 鈴木 玲, 大平弘正, 本多たかし, 橋本康弘. 第89回日本生化学会大会, 仙台, 2016/9/25~27, 国内
6. 髄液中トランスフェリン糖鎖アイソフォームと疾患. ポスター発表. 星 京香, 伊藤浩美, 安部英理子, 不破尚志, 菅野真由美, 飯島順子, 村上友太, 齋藤 清, 高橋浩一, 美馬達夫, 橋本康弘. 第89回日本生化学会大会, 仙台, 2016/9/25~27, 国内
7. 部位特異的 O-結合型糖鎖修飾がオステオポンチンの細胞接着活性に与える影響, ポスター発表. 今野 翠, 荻谷慶喜, 荻谷由貴子, 菅野真由美, 橋本康弘. 第89回日本生化学会大会, 仙台,

2016/9/25～27, 国内

8. 髄液中トランスフェリン糖鎖アイソフォームと疾患. 口頭発表. 星 京香, 村上友太, 伊藤浩美, 安部英理子, 不破尚志, 菅野真由美, 飯島順子, 齋藤 清, 高橋浩一, 美馬達夫, 橋本康弘. 第10回東北糖鎖研究会, 福島, 2016/8/6～7, 国内
9. ホルマリン固定大腸癌由来の $\alpha$ 2,6シアルル化癌胎児性抗原の検出. 口頭発表. 伊藤浩美, 星 京香, 大須賀文彦, 後藤満一, 齋藤拓朗, 北條 洋, 鈴木 玲, 大平弘正, 本多たかし, 橋本康弘. 第10回東北糖鎖研究会, 福島, 2016/8/6～7, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし