

神経細胞により生合成されるトランスフェリン糖鎖異性体はアルツハイマー病の診断マーカーとなる： 糖鎖マーカーの中樞神経疾患への応用として

橋本 康弘¹⁾, 齋藤 貴志²⁾, 山口 芳樹³⁾, 本多たかし⁴⁾

1. はじめに

タンパク質の糖鎖修飾は翻訳後修飾の一つであり、細胞種に特異的である。すなわち、同一のタンパク質であっても、由来する細胞が異なると糖鎖が異なることがある。このようにタンパク質部分は共通で糖鎖部分のみが異なる分子を糖鎖異性体 (gly-

Transferrin biosynthesized by neurons is a diagnostic marker for Alzheimer's disease

Yasuhiro Hashimoto¹⁾, Takashi Saito²⁾, Yoshiki Yamaguchi³⁾, Takashi Honda⁴⁾

¹⁾ 福島県立医科大学医学部脳神経外科学講座 [〒960-1295 福島市光が丘1番地]

Department of Neurosurgery, Fukushima Medical University School of Medicine (1 Hikarigaoka, Fukushima-City, Fukushima 960-1295, Japan)

²⁾ 名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所認知症科学分野 [〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1番地]

Department of Neurocognitive Science, Institute of Brain Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Science (1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-City, Aichi 467-8601, Japan)

³⁾ 東北医科薬科大学薬学部糖鎖構造生物学教室 [〒981-0905 仙台市青葉区小松島4-4-1]

Division of Structural Glycobiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Medical and Pharmaceutical University (4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai-City, Miyagi 981-0905, Japan)

⁴⁾ 福島県立医科大学看護部生命科学部門 [〒960-1295 福島市光が丘1番地]

Department of Human Life Science, Fukushima Medical University School of Nursing (1 Hikarigaoka, Fukushima-City, Fukushima 960-1295, Japan)

can-isoform) と称する (図1)。我々は、脳脊髄液中に神経細胞由来のトランスフェリン糖鎖異性体を見出し、この分子がアルツハイマー病マーカーとなることを示した (Hoshi et al., 2021)。本総説では、この研究を含めて疾患マーカーとしての糖鎖異性体の今後を展望する。

2. 中枢神経系における鉄・トランスフェリン代謝

トランスフェリン (Tf) は、血液や脳脊髄液などの体液中に存在する鉄輸送タンパク質である (De Jong et al., 1990)。全ての細胞は、電子伝達系や各種酵素の補酵素として鉄を必要とする。脳はミエリン形成やドーパミンの生合成などに鉄を必要とし、鉄代謝が盛んな臓器である (Ward et al., 2014)。一方、遊離の鉄は活性酸素を生成して強い細胞毒性を示すことから、タンパク質と結合して無毒化される必要がある (Andrews, 2000)。このタンパク質として細胞質のフェリチンあるいは細胞外液の Tf が代表例としてあげられる。

血中において Tf は主要タンパク質であり、アルブミン、イムノグロブリンに次いで高い濃度を示す。血中 Tf は細胞表面の Tf レセプター (TfR) に結合し、

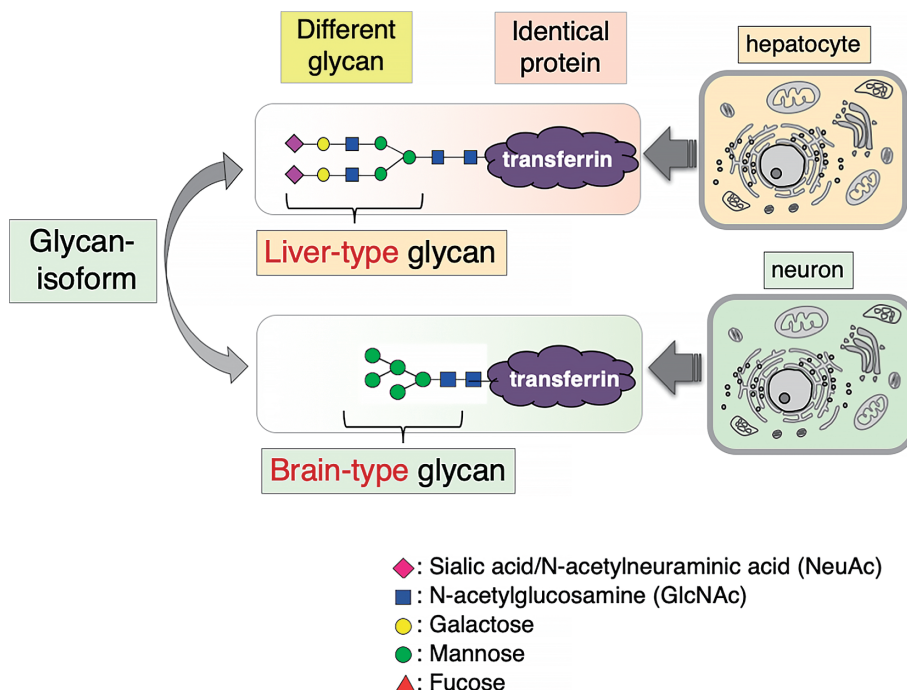


図1. 糖鎖マーカーのコンセプト

タンパク質の糖鎖修飾は細胞種に特異的である。例えば、肝臓から血液中に分泌されるトランスフェリンは“肝型”の糖鎖を持つ。一方、神経細胞から分泌されるトランスフェリンは“脳型”の糖鎖を持つ。このようにタンパク質部分が共通で糖鎖部分のみが異なる分子を糖鎖異性体 (glycan-isoform) と称する。糖鎖異性体の特異的な検出により、それを分泌する細胞の生理的・病的状態のモニターが可能となる。

細胞内へ鉄を供給する。脳組織では、血液脳関門の存在により血中 Tf の脳内への直接的な移行は制限されると考えられている。すなわち、血中 Tf は血管内皮細胞上の TfR に結合して細胞内に取り込まれる (図2) (Ward et al., 2014)。Tf/TfR 複合体はエンドソーム内の酸性化に伴い鉄を遊離する。鉄を遊離した Tf/TfR 複合体は細胞表面に戻り、Tf は血中に放出されて再利用される。一方、エンドソーム内の遊離鉄は三価鉄から二価鉄に還元された後、二価金属輸送体 (Divalent Metal Transporter-1: DMT1) によって、血管内皮細胞の細胞質へ移行する (Zecca et al., 2004)。細胞質の鉄はフェロポルチンという輸送体により細胞外 (細胞間組織液) に放出される。この二価鉄はアストロサイトの突起表面に存在する GPI アンカー型セルロプラスミンによって酸化されて三価鉄となる。三価鉄は強い細胞毒性を示すので、直ちに Tf と結合する必要がある。鉄を結合した Tf は神経細胞上の TfR に結合して細胞内に取り込まれる。また、一部の二価鉄はクエン酸

等と結合して non-transferrin bound iron (NTBI) として取り込まれる。

以上が中枢神経系の鉄取り込みの概要である。「細胞外の三価鉄は強い細胞毒性を示すので直ちに Tf と結合する必要がある」との想定を裏付けるように、Tf は鉄に対して他に類を見ない高親和性 (1×10^{20}) で結合する。一方で、細胞間質の Tf の由来については上記の総説中では言及されていない。図2に示された Tf 代謝では、血管内皮細胞に取り込まれた血中 Tf は、リサイクリングによって再び血中に遊離され再利用される。すなわち、この代謝系においては、Tf は細胞間質中へ移行しないことになる。我々は、神経細胞が血中 Tf とは異なる Tf 糖鎖異性体を生合成し、これが脳脊髄液中に分泌されてアルツハイマー病マーカーとなることを見出した。

3. 脳脊髄液中のトランスフェリン糖鎖異性体

(水頭症性) 無脳症という先天性異常症では、胎

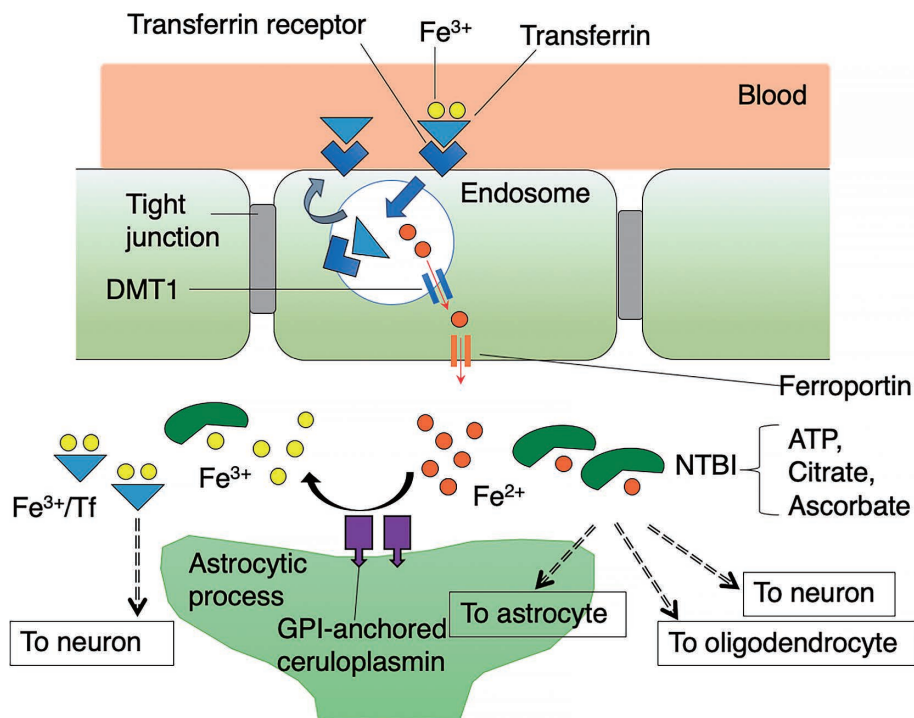


図2. 中枢神経系における鉄の取り込み
鉄はトランスフェリン (Tf) により運ばれ、トランスフェリン受容体 (TfR) を介して血管内皮細胞に取り込まれる。エンドソーム内の酸性化に伴い、遊離した二価鉄はトランスポーターである DMT1 およびフェロポルチンを介して間質液中に運ばれる。アストロサイト突起末端の GPI アンカー型セルロプラスミンによって二価鉄は三価鉄となる。三価鉄は細胞毒性が強いので直ちに Tf に結合する必要がある (Murakami et al., 2019 を一部改変して引用)。

生期に両側の内頸動脈が閉塞して脳の大部分が欠損する (図 3A)。一方、椎骨動脈は正常であるため、脳幹や小脳の一部は保たれており、生後 10 歳くらいまで生存する (Pavone et al., 2014)。この患者の“脳脊髄液”で欠損する分子は、本来ならば脳で生合成されるはずである。そのような一例として、脳型 Tf が検出された。コントロール脳脊髄液中には、電気泳動上で血清 Tf と同じ移動度を示す Tf (血清型 Tf) とそれより移動度が大きい Tf (脳型 Tf) の 2 本のバンドが検出される。無脳症では血清型 Tf がコントロールと同様に検出されるが、脳型 Tf のバンドは欠損していた (図 3B)。すなわち、脳型 Tf は脳由来であることが示唆された (Murakami et al., 2018a ; Hoshi et al., 2021)。また、両者は移動度が異なることから、異なる糖鎖を持つ可能性が示された。

一方、血清 Tf (Sia-Tf) はアルブミン、イムノグロブリンなどの血清タンパク質と同様に、無脳症お

よびコントロール脳脊髄液の両方で検出され、その組成は類似していた。アルブミンは肝臓でのみ生合成されるタンパク質である。従って、脳脊髄液中のアルブミンは血液を介して脳脊髄液内に移行すると考えられる。ただし、血液と脳脊髄液の濃度比は 100 倍である。他の血液タンパク質についても同様の濃度差がある。一方で、それぞれのタンパク質濃度は血液と脳脊髄液で極めて強い相関を示す。従って、これらの血液タンパク質濃度は受動拡散で移行したと考えられる。すなわち、血液脳関門は十分に機能しているものの leaky なバリアと考えられる。Sia-Tf は他の血液タンパク質と同様に leak の程度を示すマーカーと考えられる (Hoshi et al., 2023)。

4. 脳脊髄液中トランスフェリンの糖鎖分析

トランスフェリン糖鎖異性体の糖鎖分析のために、脳脊髄液 1 リットルを出発材料として脳型お

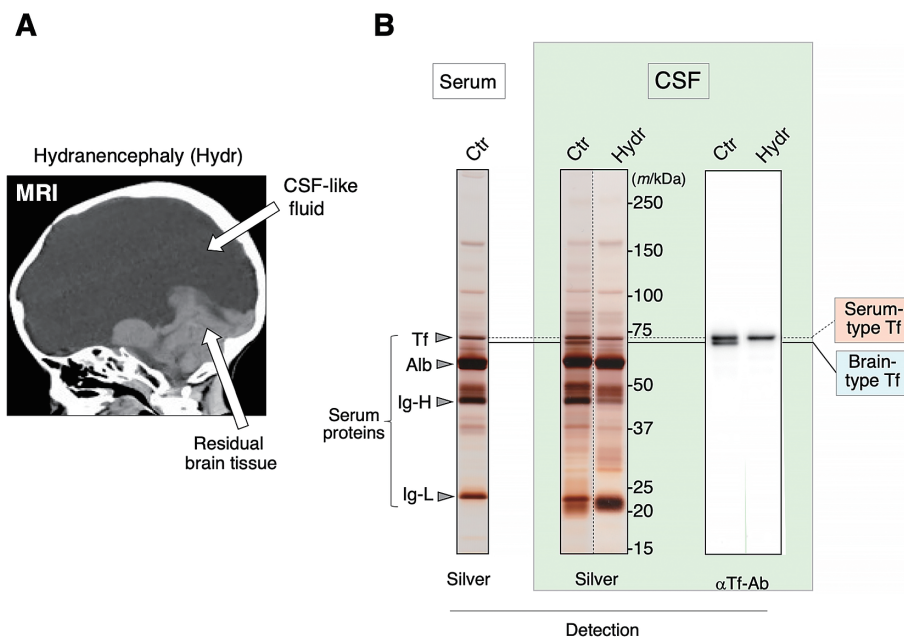


図 3. 大脳由来の Tf 異性体
 水頭症性無脳症では、先天性の両側頸動脈の閉塞により大脳のほとんどが欠損している (A)。コントロールの脳脊髄液では銀染色 (Silver) およびイムノブロット (α Tf-Ab) 検出において Tf のダブルットが観察されるが、無脳症では移動度の大きな (下の) バンドが検出されない (B, CSF)。従って、これは大脳に由来する Tf 異性体と考えられた。なお、コントロール脳脊髄液と血清の電気泳動パターンを比べると両者はよく似ており、主要成分はいずれもアルブミン (Alb)、イムノグロブリン (Ig-H, Ig-L)、トランスフェリン (Tf) であった (B, Serum)。ただし、脳脊髄液のタンパク質濃度は血清の 100 分の 1 であった (Murakami et al., 2019; Hoshi et al., 2021 を一部改変して引用)。

よび血清型 Tf を精製し、それぞれの糖鎖構造を決定した (図 4) (Hoshi et al., 2021)。血清型 Tf は血清中の Tf と同じ糖鎖を持っていた (Glycan No. 1)。一方、脳型 Tf は多様な糖鎖 (Glycan No. 2 ~ 7) を持っていた。便宜的に末端糖により分類すると、Glycan No. 2 ~ 6 は少なくとも 1 分子の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を持ち、この糖鎖を持つ異性体を GlcNAc-Tf と称する。脳脊髄液中 GlcNAc-Tf の存在は既に報告されており (Hoffmann et al., 1995; Nagae et al., 2014)、脈絡叢由来である事が示唆されている (Futakawa et al., 2012)。また、Glycan No. 7 は末端糖としてマンノースを持っており、他の糖鎖とは糖鎖骨格が異なっていた。Glycan No. 7 を持つ異性体を Man-Tf と称したが、その脳脊髄液中での存在は過去には報告されていなかった。

5. 大脳における Tf-mRNA の発現

無脳症の脳脊髄液分析結果から、Man-Tf および GlcNAc-Tf の大脳における発現が示唆された。そこで、*in situ* hybridization によりマウス脳における Tf-mRNA の発現を解析した (Abe et al., 2022)。脈絡叢で強いシグナルが検出された。ついで、大脳皮質、海馬、大脳基底核、などの神経細胞で Tf-mRNA シグナルが認められた (図 5, 中央パネル)。強拡大図では、脈絡叢上皮細胞の細胞体が強く染色された (図 5, 右パネル)。また大脳皮質の神経細胞は Tf-mRNA を発現していた (図 5, 左パネル)。因みに、脈絡叢上皮細胞以外の Tf-mRNA 陽性細胞のほとんどは抗 NeuN 抗体にて染色された。ヒト大脳においても同様の Tf-mRNA 発現が認められた。

	Terminal sugar	Glycan No.	Tentative structures *1	Chemical formula	Composition (%) *2
Serum-type Tf	Sialic acid	No. 1	*3	Hex3HexNAc4NeuAc2	70%
	Brain-type Tf	GlcNAc	No. 2		Hex3HexNAc5
No. 3				Hex3HexNAc5dHex1	11.4
No. 4 *4				Hex3HexNAc6	2.1
No. 5 *4				Hex3HexNAc6dHex1	1.5
No. 6 *4			Hex4HexNAc5dHex2	1.8	
Mannose	No. 7		Hex5HexNAc2	8%	

*1: Monosaccharide symbols are according to Consortium for Functional Glycomics (www.functionalglycomics.org/)

*2: Other minor components (< 0.6%) are not listed.

*3: Glycan structure is the same as that of serum transferrin.

*4: Position(s) of additional sugar(s) out of left curly bracket is not identified.

◆: Sialic acid/N-acetylneuraminic acid (NeuAc)
 ■: N-acetylglucosamine (GlcNAc)
 ●: Galactose
 ●: Mannose
 ▲: Fucose

図 4. ヒト脳脊髄液中の Tf 異性体の N-型糖鎖構造
 脳脊髄液中の 2 本の Tf バンドそれぞれを精製した。Tf タンパク質から糖鎖を遊離し、液体クロマトグラフィー分析のために化学修飾を行い、クロマトグラムと質量分析の結果から糖鎖構造を決定した。構造は Consortium for Functional Glycomics (www.functionalglycomics.org/) に従って表記した。末端に少なくとも 1 分子の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を持つ糖鎖をブルーで、末端にマンノースを持つ糖鎖をグリーンでハイライトした。両者は脳由来 Tf に付加されると考えられる。一方、赤でハイライトした糖鎖は血清 Tf のものと同一であった (Hoshi et al., 2021 より引用)。

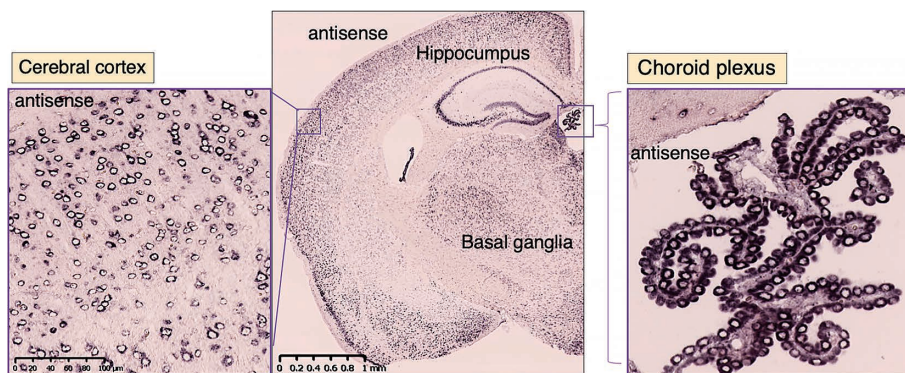


図 5. 大脳における Tf-mRNA の発現
 マウス脳における Tf-mRNA の発現を *in situ* hybridization により分析した。中央パネルに示されるように、Tf-mRNA の発現が海馬、大脳基底核、大脳皮質の神経細胞および脈絡叢上皮細胞で観察された (両細胞の拡大図を左および右のパネルに示す) (Abe et al., 2022 より引用)。

6. 脈絡叢における Tf 異性体の発現

脈絡叢において Tf-mRNA が最も強く発現していたことから、Tf タンパク質と糖鎖発現を解析した (Futakawa et al., 2012, Murakami et al., 2018a)。脈絡叢上皮細胞が HE 染色にて染色され、抗 Tf 抗体および鉄染色でも陽性シグナルを与えた (図 6A, B,

C)。従って鉄を結合した Tf の上皮細胞からの分泌が示唆された。蛍光二重染色に用いた切片の模式図を示した (図 6D)。抗 Tf 抗体と GlcNAc 末端糖鎖に結合する PVL レクチンをプローブに用いて染色した。Tf 抗体では毛細血管および間質が染色された (図 6E)。一方、PVL レクチンでは脈絡叢上皮細胞の特に basolateral 部分が染色された (図 6F)。両シグナルは上皮細胞の一部でマージしており (図

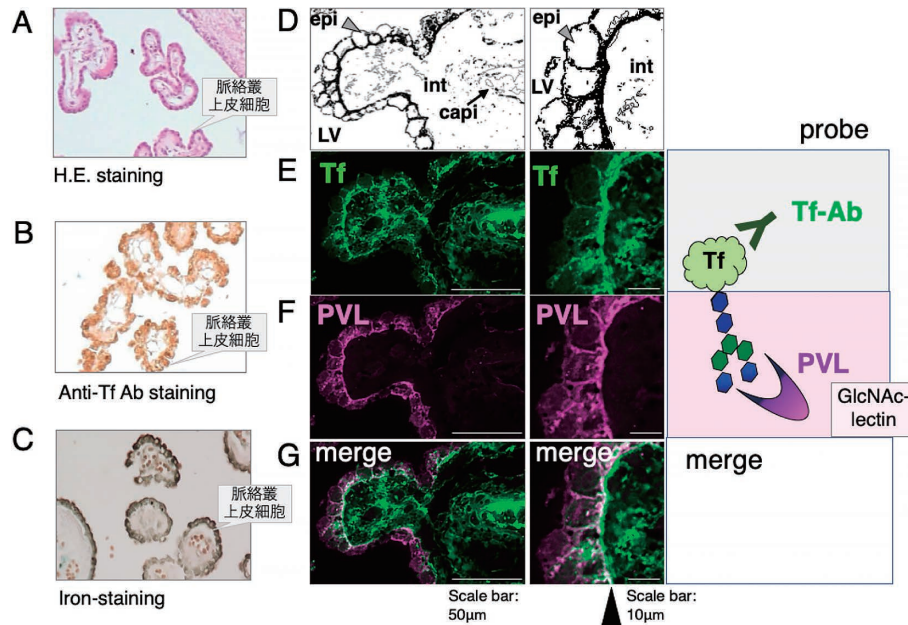


図 6. 脈絡叢の免疫組織化学
脈絡叢上皮細胞が HE 染色 (A), 抗 Tf 抗体 (B), 鉄染色 (C) にて染色された。蛍光二重免疫染色に用いた切片の模式図を示した (D)；脈絡叢上皮細胞 (epi), 間質 (int), 毛細血管 (capi) および側脳室 (LV)。抗 Tf 抗体にて毛細血管内および間質が染色された (E)。GlcNAc 末端糖鎖に結合する PVL レクチンでは脈絡叢上皮細胞の特に basolateral 部分が染色された (F)。このシグナルの一部は上皮細胞で抗 Tf 抗体シグナルとマージした (G) (Murakami et al., 2018a; Murakami et al., 2019 を一部改変して引用)。

6G), GlcNAc-Tf の脈絡叢からの分泌が示唆された。

7. 脳脊髄液の産生変化を示すバイオマーカーとしての GlcNAc-Tf

脳脊髄液の産生と吸収は Aβ のような“老廃物”の排出に関わっており、近年そのメカニズムに対する理解が進んできている。古典的な“bulk flow theory”では、脈絡叢で産生された脳脊髄液が脳室内を下降した後、ルシュカ・マジヤンディー孔を経て脳表面に現れ、上行してクモ膜顆粒から吸収されるとしている (Cushing, 1925)。しかし、最近になって Reeves らにより Glymphatic system の提唱がなされた。これは、動脈周囲 (perivascular space) に間質液が移行し、アクアポリン 4 を介してアストロサイト経由で脳脊髄液が産生されるとの仮説である (Reeves et al., 2020)。また、老廃物は静脈周囲腔を経てリンパ系へ排出されると想定されている。今後も、脳脊髄液の産生や排出に関しては新しい事実が

見出されていくと予想される。一方で我々は、脈絡叢のみが脳脊髄液産生の場合ではないとしても、一定の役割を担っている可能性を考え、脳脊髄液代謝が変化する疾患で脈絡叢が産生する GlcNAc-Tf の脳脊髄液中濃度の測定を行った。

具体的な対象疾患は、特発性正常圧水頭症 (idiopathic normal pressure hydrocephalus: iNPH) および特発性低髄液圧症候群 (spontaneous intracranial hypotension: SIH) である。iNPH はアルツハイマー病と鑑別すべき認知症である。脳脊髄液の吸収低下が原因と考えられ、脳脊髄液の過剰により水頭症となり、認知症、歩行障害、尿失禁などを呈する。iNPH では二次的な脳脊髄液産生の低下が想定されている。本疾患で脳脊髄液中 GlcNAc-Tf を測定したところ、その濃度が有意に低下していた (図 7A) (Hoshi et al., 2023)。これは、脳脊髄液産生低下に対応する変化と推測された。なお、Man-Tf や Sia-Tf 濃度は変化しなかった。

脈絡叢から分泌される主要タンパク質としてリポ

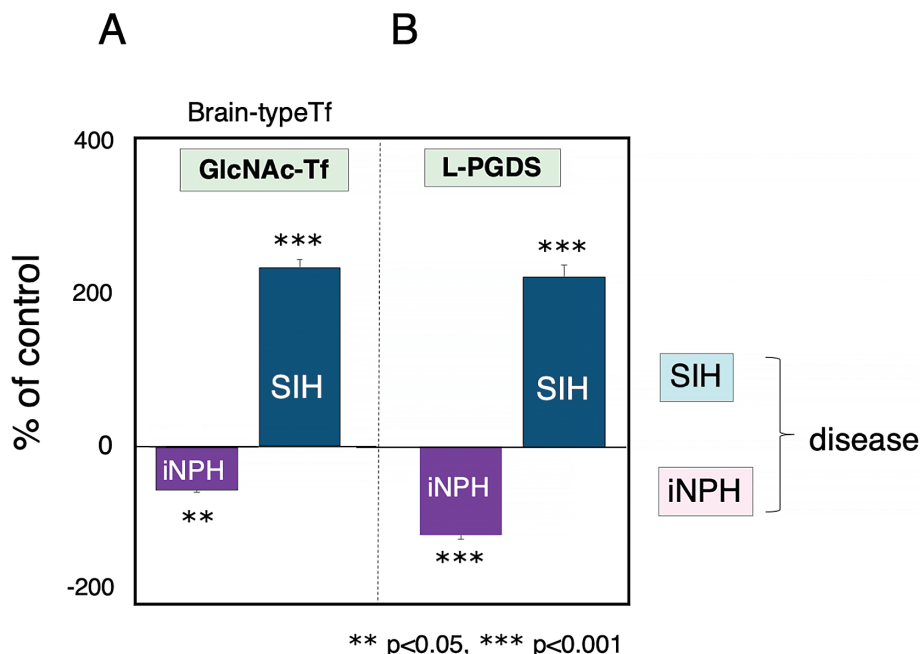


図7. 脳脊髄液産生とマーカー変化
Idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH) および Spontaneous intracranial hypotension (SIH) の脳脊髄液中 GlcNAc-Tf および L-PGDS 濃度を測定した。当該疾患が疑われたが診断クライテリアを満たさない症例を non-iNPH および non-SIH としてコントロールに用いた。コントロールの値を基準として疾患群でのマーカー濃度変化を%表示した (Murakami et al., 2019; Hoshi et al., 2023 を一部改変して引用)。

カリン型プロスタグランジン D2 合成酵素 (L-PGDS) がある。間瀬らは、iNPH における脳脊髄液中 L-PGDS 濃度の低下を示し、診断への応用を報告している (Mase et al., 2003)。すなわち、L-PGDS も脳脊髄液産生低下に対応して変化すると考えられる (図 7B)。iNPH は脳脊髄液シャント手術により治療する。すなわち、過剰の脳脊髄液を脳室から腹腔へバイパスする手術である。我々は手術の前後での両マーカー濃度を比較し、術後 3 ヶ月で GlcNAc-Tf と L-PGDS は 2 倍近くに増加することを見出した (Murakami et al., 2018a)。これは手術に伴う脳脊髄液の産生増加を示すと考えられる。両マーカーの増加は比較的早期に起こりうるが、認知機能の回復には年余の時間がかかることがある。術後 3 ヶ月の脳型 Tf および GlcNAc-Tf の増加が術後 12 ヶ月の MMSE の回復と相関する結果を得ている (Murakami et al., 2019; Hoshi et al., 2023)。マーカーの増加は早期に起こるため、認知症の予後予測に利用できると思われる。

一方、iNPH とは異なり、脳脊髄液産生の増加が想定されている疾患がある。すなわち、特発性低髄液圧症候群 (SIH) である (Schievink et al., 2006)。SIH は脳脊髄液の硬膜外への漏出により髄液圧の低下と脳脊髄液量の減少が起こる。主症状は起立性頭痛であるが、目眩・聴覚障害など多彩な不定愁訴を示す。脳脊髄液漏出の二次的な反応として脳脊髄液産生の増加が想定されている。本疾患では、脳脊髄液中の GlcNAc-Tf および L-PGDS はコントロールに比べて顕著に増加する (図 7)。これは脳脊髄液産生の増加に対応する変化と考えられる (Hoshi et al., 2023; Murakami et al., 2018b; Murakami et al., 2019)。SIH は低髄液圧に伴う硬膜肥厚などの MRI 像により診断されることが多い。しかし、典型的な画像変化を示さない例もあるので、両マーカーの補助診断法としての利用が期待される。

8. 大脳皮質における Tf 糖鎖異性体の発現

マウス大脳皮質の神経細胞にて Tf-mRNA の発現が見られた (図 5). そこで抗 Tf 抗体を用いた免疫組織化学を行なった. 神経細胞のマーカーである NeuN 抗体陽性細胞の多くは抗 Tf 抗体シグナルで染色された (図 8A). しかし, Tf 抗体のシグナル強度は細胞によって異なっていた. なお, ヒト大脳皮質においても神経細胞は抗 Tf 抗体陽性であった (Abe et al., 2022).

脳脊髄液中には多様な Tf 異性体が検出されることから, 大脳皮質中での Tf 異性体の解析を試みた (Hoshi et al., 2021). ヒト大脳皮質 (1 グラム) から免疫沈降法にて Tf を精製した (図 8B). 精製標品を電気泳動後に, ゲル内の Tf を酵素処理して糖

鎖を切り出した (図 8B). 遊離された糖鎖を化学修飾した後に質量分析法 (MOLDI-TOF-MS) にて分析した (図 8C). 最も強度が強い糖鎖シグナル (1595.8) は図 4 の Glycan No.7 (理論値は m/z 1595.7) に相当し, 糖鎖シグナルの 90% をしめた. このシグナルピークの MS/MS 解析により Glycan No.7 の構造が確認された (図 8D). Glycan No.2 および No.3 に相当するシグナルも得られたが, 両者のシグナル強度は糖鎖シグナル全体の 10% に過ぎなかった. すなわち, 脳脊髄液中では Man-Tf は 8% のマイナー成分であるのに対して, 大脳皮質中では 90% をしめる主要成分であった. 大脳皮質において Tf-mRNA および Tf タンパク質を発現するのは主に神経細胞であることから, Man-Tf は神経細胞由来と考えられた.

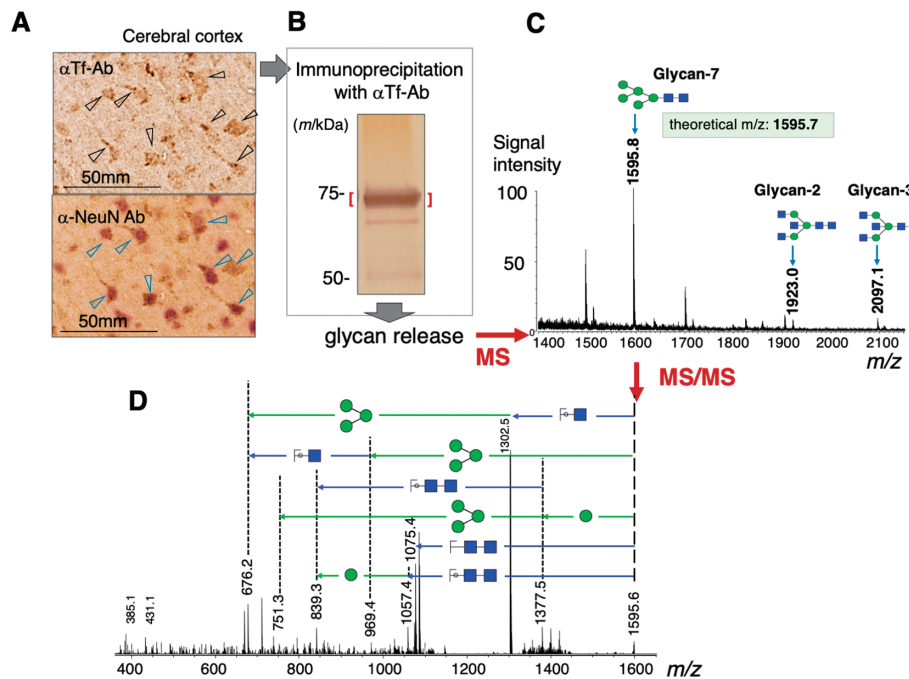


図 8. 大脳皮質 Tf の糖鎖構造解析
 神経細胞のマーカーである NeuN 抗体陽性細胞の多くは抗 Tf 抗体シグナルで染色された (A). ヒト大脳皮質 (1 グラム) から免疫沈降法にて Tf を精製した (B). 精製標品を電気泳動後に, ゲル中の Tf を酵素処理して糖鎖を切り出した (B). 遊離された糖鎖を化学修飾した後に質量分析法 (MOLDI-TOF-MS) にて分析し, m/z 1595.8 に主要ピークが観察された (C). このピークの MS/MS 解析により Glycan No.7 の構造が確認された (D). 最も強度が強い糖鎖シグナルは図 4 の Glycan No.7 (理論値は m/z 1595.7) に相当し, 糖鎖シグナルの 90% をしめた (Hoshi et al., 2021 を一部改変して引用).

9. 各種神経変性疾患の脳脊髄液中の Man-Tf 濃度測定

Man-Tf が神経細胞のバイオマーカーと推測されたので、その脳脊髄液中の濃度を各種神経変性疾患で測定した。Man-Tf の測定方法として、糖鎖認識分子であるレクチンと抗体をサンドイッチ・プローブとして用いる ELISA 法を開発した (Shirotani et al., 2011)。はじめに、抗 Tf 抗体をマイクロタイター・プレート上に固相化し、髄液中の全ての Tf 糖鎖異性体を捕捉する (図 9A)。洗浄後にマンノースを認識するレクチン (recombinant BC2L-A) にて検出反応を行なった。この方法では、シアル酸や GlcNAc 末端を持つ Tf はシグナルを与えず、マンノース末端を持つ Tf のみが特異的なシグナルを与えた (図 9B) (Man-Tf・ELISA)。なお、Tf 抗体を検出プロー

ブとする通常のサンドイッチ ELISA では Tf の総量のみが測定され、Tf 異性体は区別されない。通常の Tf 抗体はタンパク質部分のみを認識するためである。Man-Tf・ELISA で各種神経変性疾患の脳脊髄液を測定した結果を示す (図 9C)。アルツハイマー病 (AD) および軽度認知障害 (MCI) で Man-Tf が有意に増加していた (Hoshi et al., 2021)。他のタウオパチーである前頭側頭型認知症 (FTD)、進行性核上性麻痺 (PSP) やシヌクレイノパチーであるレビー小体型認知症 (DLB)、パーキンソン病 (PD) では有意の増加は認められなかった。なお、この分析のコントロールには、iNPH を用いた。因みに、iNPH は AD 病理を合併することがあるので、脳脊髄液中リン酸化タウ (p-tau) が 50 pg/mL 以下の症例のみを分析対象とした。

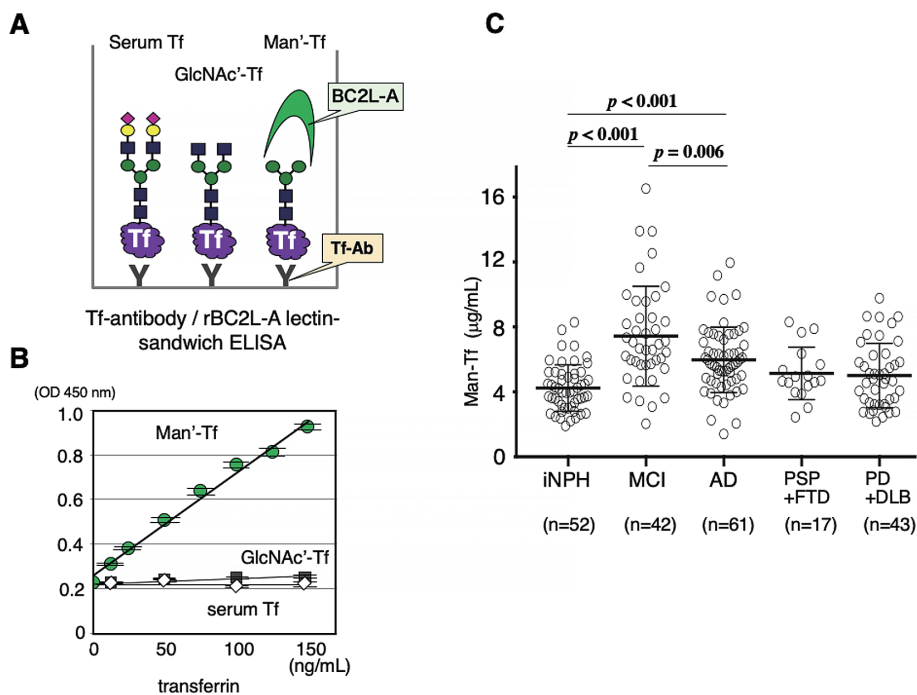


図 9. Man-Tf 検出用の ELISA の開発および Man-Tf 濃度の測定
 脳脊髄液中の Man-Tf を検出するためのレクチン ELISA 法を開発した。糖鎖構造の異なる Tf 異性体を Tf 抗体 (Tf-Ab) を固相化したプレートにアプライする (A)。マンノース結合性レクチンである rBC2L-A を用いて検出したが、Man-Tf のみがシグナルを与えた (B)。この方法を用いて以下の神経疾患における Man-Tf 濃度を測定した：特発性正常圧水頭症 (iNPH)、軽度認知障害 (MCI)、アルツハイマー病 (AD)、進行性核上性麻痺 (PSP)、前頭側頭型認知症 (FTD)、パーキンソン病 (PD)、レビー小体型認知症 (DLB)。多重検定は Kruskal-Wallis 法で行なった (Hoshi et al., 2021 より引用)。

10. 脳脊髄液中の Man-Tf と p-tau の相関

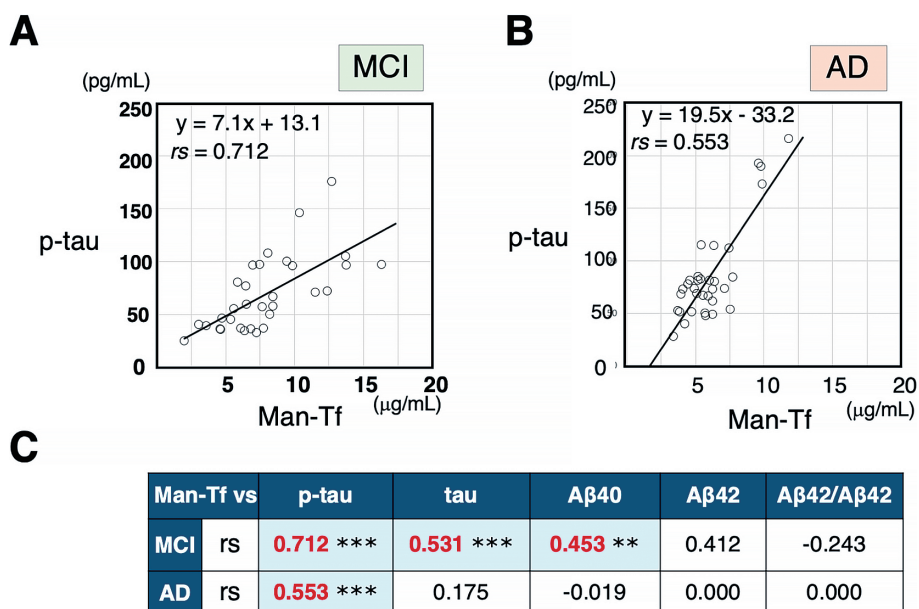
MCI および AD 群で脳脊髄液中 Man-Tf が増加していたことから、神経細胞死のマーカーである p-tau と Man-Tf の相関を調べた (Hoshi et al., 2021; Hoshi et al., 2022). MCI および AD 群において Man-Tf は p-tau と高い相関を示した (図 10A, B). 一方 MCI では、Man-Tf は tau, Aβ40 と中程度の相関を示したが、AD では全く相関がなかった (図 10C). しかし、Aβ (特に Aβ42) の測定値は施設間での標準化が難しいので、Aβ と Man-Tf の相関に関しては慎重な解釈が必要である.

MCI と AD において、Man-Tf と p-tau は高い相関を示すが、両者の回帰直線の傾きは MCI より AD でかなり急峻である (図 10A, B). 傾きは p-tau / Man-Tf で表されるパラメーターである. p-tau は神経細胞死を反映するので、細胞内のフェリチン鉄の遊離をも反映する可能性がある. 一方、神経細胞由

来の Man-Tf は強力な鉄結合力 ($K_d=1 \times 10^{-20}$) により、周囲の神経細胞を鉄毒性から守っている可能性がある. すなわち、p-tau / Man-Tf (商) の分子 (p-tau) は鉄の神経毒性を反映する一方で、分母 (Man-Tf) は神経保護能を反映するパラメーターかもしれない. 事実、control (MMSE >27), MCI, AD の各群での p-tau / Man-Tf の平均値は 1 : 1 : 2 となり AD のみが増加を示す. MCI では control より有意に p-tau が増加するが、これに対応して Man-Tf も増加して細胞死を防いでいるのかもしれない. 一方、AD では p-tau の増加が顕著となり Man-Tf による保護能力を超えるためにさらなる細胞死が惹起される可能性が考えられる. 今後、各 Tf 異性体の鉄飽和度を解析し、神経保護能の解析をおこなう予定である.

11. Man-Tf と p-tau の蛍光二重免疫染色

Man-Tf 増加と p-tau 病理との関連が示唆された



** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

図 10. Man-Tf と AD コアマーカーの相関
MCI および AD 群における髄液中 Man-Tf と p-tau, tau, Aβ40, Aβ42 濃度および Aβ42/Aβ40 比の相関を調べ、スピアマンの順位相関係数を求めた (rs). MCI, AD 群では Man-Tf は p-tau と良い相関を示した (A, B). しかし、MCI 群では、Man-Tf は tau, Aβ40 と中等度の相関を示したが、Aβ42 濃度および Aβ42/Aβ40 比とは有意の相関を示さなかった (C). AD では Man-Tf は p-tau 以外のマーカーと相関を示さなかった (Hoshi et al., 2021; Hoshi et al., 2022 を一部改変して引用).

ことから、AD 脳切片における p-tau および Tf の局在を蛍光二重免疫染色にて調べた (Hoshi et al., 2021). AD 脳ではコントロール脳に比べて神経細胞での抗 Tf 抗体シグナルの増加傾向が見られた (図 11A, C). 強拡大図では、一部の神経細胞が抗 p-tau 抗体で染色されたが、このシグナルは Tf シグナルと共局在していた (図 11B, D). すなわち、両マーカーを同時に発現している神経細胞の存在が示された. 抗 Tf 抗体は糖鎖異性体を区別しないが、神経細胞が持つ Tf はほとんどが Man-Tf であることから、p-tau 陽性細胞が Man-Tf を発現することが示唆された. この現象は脳脊髄液中の Man-Tf と p-tau 濃度の増加が相関することと consistent と考えられる.

12. 診断マーカーとしての Man-Tf

MCI と AD 群に対するマーカーの診断感度・特異

度を検討した. 各疾患群における p-tau 値 (図 12A) および p-tau x Man-Tf の積 (図 12B) をプロットした. コントロールとしては iNPH を用いた. MCI 診断に対して、Man-Tf は単独では感度が低かった. 一方 AD 診断に対して、p-tau は単独では特異度が低かった. p-tau x Man-Tf の積はコントロールと MCI・AD 群を高い精度で鑑別した (図 12C) (Hoshi et al., 2021).

13. Man-Tf と小胞体ストレス反応

分泌タンパク質は小胞体内で翻訳された後、全ての糖鎖付加部位に高マンノース型糖鎖が付加される. 分泌タンパク質が小胞体内で正しい立体構造を持たない場合には、細胞内のマンノース結合レクチン/シャペロン複合体 (calnexin/calreticulin complex) により認識されて再フォールディングを受ける. 従って、細胞がストレスを受け misfolding pro-

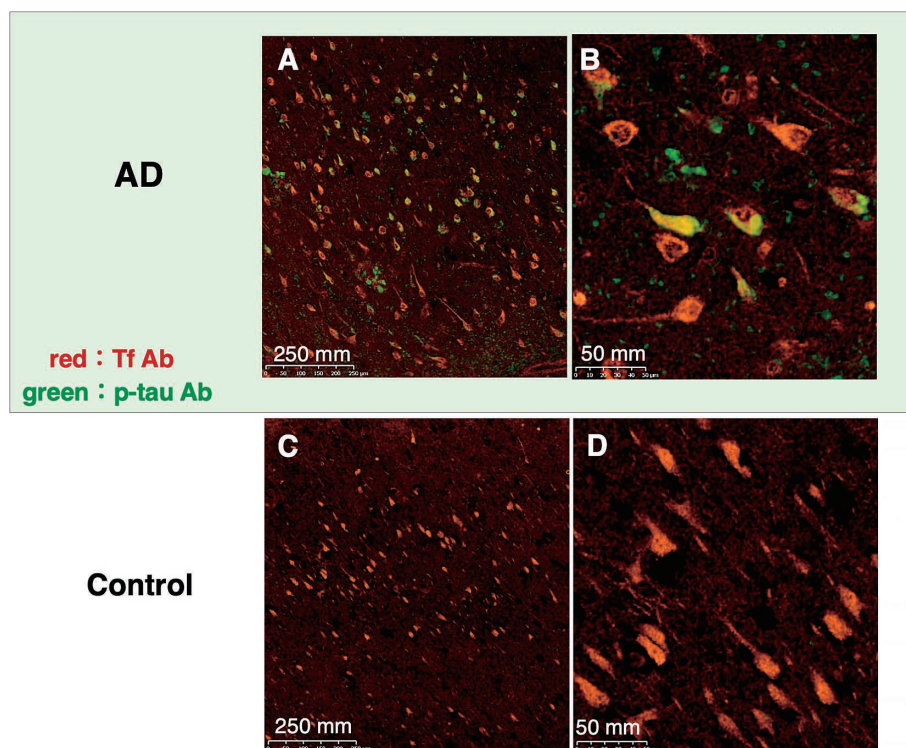


図 11. Tf と p-tau の蛍光二重免疫染色
抗 p-tau 抗体 (緑) および抗 Tf 抗体 (赤) による海馬の二重染色を行なった. 抗 Tf 抗体シグナルは AD 脳 (A) でコントロール (C) よりやや増加していた. 強拡大図では、コントロール切片は抗 p-tau 抗体で染色されなかった (D). 一方、AD 脳においては p-tau と Tf シグナルの共局在が認められた (B) (Hoshi et al., 2021 より引用).

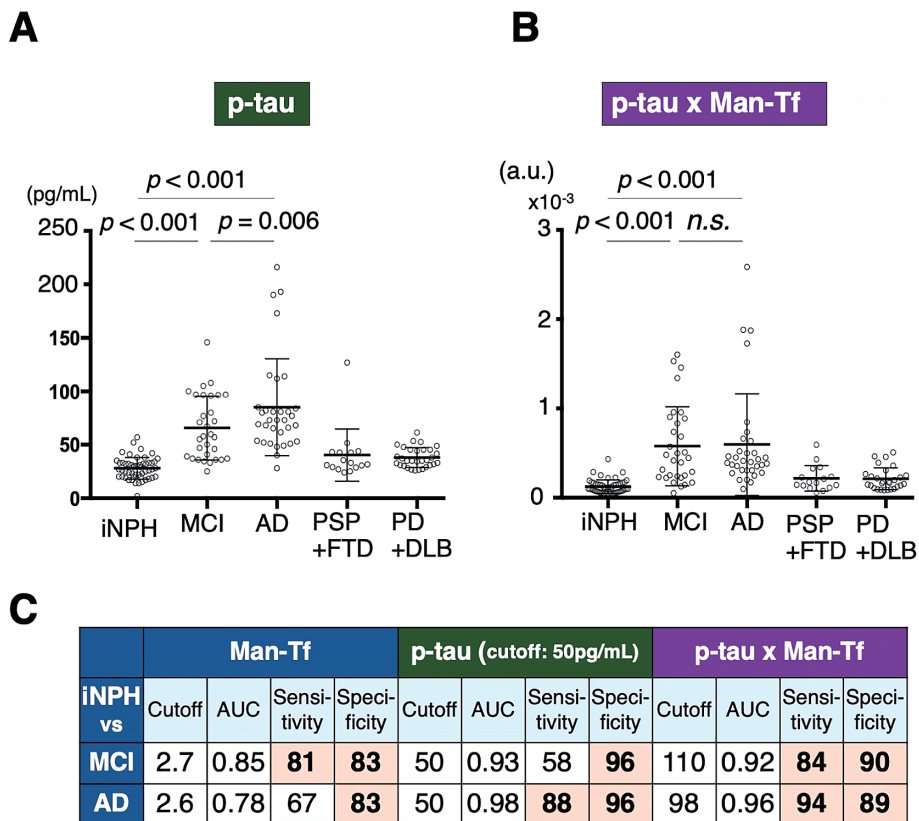


図 12. Man-Tf, p-tau, および p-tau x Man-Tf の診断能
 図 9C に示した Man-Tf 値, p-tau 値 (A) および Man-Tf x p-tau の積 (B) を iNPH, MCI および AD, その他のタウオパチーである進行性格上性麻痺 (PSP) および前頭側頭型認知症 (FTD), またシヌクレイノパチーであるパーキンソン病 (PD) およびレビー小体型認知症 (DLB) で比較した. 多重検定は Kruskal-Wallis 法で行なった. また, MCI および AD に対する診断能を示した (C): sensitivity (感度), specificity (特異度), AUC, cutoff 値を示した (Hoshi et al., 2021 より引用).

tein が増加した場合には高マンノース糖鎖がリガンドとなる再フォールディングプロセスが亢進する (小胞体ストレス反応). Tinto らは, 小胞体ストレス反応関連のタンパク質を neuroblastoma で高発現しておくくと Aβ オリゴマーによる細胞死が抑制されると報告している (Tinto et al., 2011). AD 病理では小胞体ストレスのためにマンノース型糖鎖の代謝が活発化され, Man-Tf を含めたマンノース型糖タンパク質の増加を伴う可能性が考えられる.

14. Tf 糖鎖異性体の先行研究について

谷口らは, 脳脊髄液を SDS-PAGE 後にプロットを作製し, WGA レクチンにて染色した. Tf の移動度に一致して WGA レクチン陽性バンドが検出さ

れ, AD でのシグナル低下を見出した (Taniguchi et al., 2008). 谷口らの解釈では, WGA が Tf 上のシアル酸エピトープを認識しており, AD ではシアル酸が離脱するために WGA シグナルが低下すると結論している. 一方, 我々の分析では AD でシアル酸化 Tf (Sia-Tf) は低下しておらず上記のメカニズムは確認できなかった. 確かに WGA がシアル酸を持つ糖鎖に結合するとの報告がある (Peters et al., 1979). 一方で, NEDO のヘクトバイヘクト・プロジェクト (<https://acgg.asia/lfdb2/>) では, フロントアルフィンティークロマトグラフィー (Tateno et al., 2007) により, 100 種類の糖鎖と 100 種類のレクチンの相互作用を網羅的に解析し, WGA の GlcNAc に対する高い親和性を示した. また, 板倉らは, キチン (GlcNAc のポリマー) 結合性レクチンを系統的に解

析して、WGAのGlcNAcへの結合性を示している (Itakura et al., 2017). 我々のTf糖鎖解析ではGlcNAc末端糖を持つ異性体が20%含まれている(図4). この中にWGAと強く結合する糖鎖異性体があり、そのシグナルの減少が谷口らにより検出されたのかもしれない. 今後、WGAが認識するTf糖鎖の構造を確定することが重要である.

15. 中枢神経系以外での糖鎖異性体の利用

胎児の発生・分化過程において糖鎖は劇的に変化する. 糖鎖の多くは細胞外に存在することから細胞間相互作用に働くと考えられている. この胎児性の分化抗原を調べる過程で、成体には見られない糖鎖抗原の存在が示され、後にこれが癌関連抗原であることが明らかとなった(がん胎児性糖鎖抗原) (Kailemia et al., 2017). 代表的な例は、膀胱癌マーカーのCA19-9抗原である. CA19-9はルイス血液型の α 型糖鎖(Lea)がシアル酸化された糖鎖異性体である(SLea). また、この糖鎖抗原は癌の血行性転移を仲介すると考えられている (Berg et al., 1991). 本来、この糖鎖を介した細胞接着は白血球の血管外遊走メカニズムの解析過程で明らかにされた (Walz et al., 1990). すなわち、炎症時には、白血球上のSLeaやSLe^x(前者のアイソマー)糖鎖が、血管内皮上のレクチン(E-セレクトイン/ELAM-1: endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1)により認識される. この糖鎖による結合反応は、引き続きインテグリン系による接着と血管外遊走に必須のプロセスである. がん細胞はこれらのがん関連糖鎖を発現することにより転移巣を形成すると考えられる. これらの糖鎖は成体でも発現するので厳密にはがん胎児性抗原とはいえないが、炎症という非生理的条件で働く糖鎖認識である.

がんタンパク質抗原の糖鎖異性体により診断特異性が増した例がある. 例えば、 α フェトプロテイン(AFP)は典型的ながん胎児性抗原であり、肝癌マーカーとして利用されてきた. しかし、肝炎や肝硬変で上昇することがあり、診断特異性に問題があった. 一方、AFPの糖鎖の根元のGlcNAcにフコースが付

加する異性体がある. このフコースはLens culinaris Agglutinin (LCA)レクチンにより検出可能であり、AFP-L3 (AFP-Lectin III)画分と称される. AFP-L3はがん特異性が高いので臨床で広く利用されている (Taketa et al., 1990). 以上の例に限らず、がん抗原の半数以上が糖鎖(異性体)抗原であり、その多くはがん胎児性抗原である (Kailemia et al., 2017).

16. 糖鎖異性体の今後の展望

最近のグライコプロテオミクス(糖鎖付加位置の情報を含む構造解析)の手法により脳組織の糖鎖発現が極めてユニークであり、脳の部位による差も著しいことが示されている. 糖鎖異性体が複雑かつ多様な神経系細胞のマーカーとなり、さらにはその機能的意義が明らかになることを期待している.

謝 辞

本研究は日本医療研究開発機構(AMED)の支援を受けました. grant number [16hm0102042h0001, 17hm0102042h0002, 18hm0102042h0003, 19dk0310099h0001, 20dk0310099h0002, 21dk0310099h0003, 20dm0307003h0003, 21dm0307003h0004].

臨床材料の提供をして下さった東北大学、東北医科薬科大学、順天堂大学、美原記念病院、福島県立医科大学の先生の皆様に感謝致します. また、本研究プロジェクトの共同研究者の皆様に深謝致します.

文 献

- Abe E et al. (2022) Expression of transferrin protein and messenger RNA in neural cells from mouse and human brain tissue. *Metabolites* 12: 594
- Andrews NC. (2000) Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 1: 208-217
- Berg EL et al. (1991) A carbohydrate domain common to both

- sialyl Le (a) and sialyl Le (X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* 266 : 14869-14872
- Cushing H (1925) The third circulation and its channels. *Lancet* 2 : 547
- de Jong G et al. (1990) The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 190 : 1-46
- Futakawa S et al. (2012) A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH. *Neurobiol Aging* 33 : 1807-1815
- Hoffmann A et al. (1995) 'Brain-type' N-glycosylation of asialo-transferrin from human cerebrospinal fluid. *FEBS Lett* 359 : 164-168
- Hoshi K et al. (2021) Transferrin biosynthesized in the brain is a novel biomarker for Alzheimer's disease. *Metabolites* 11 : 616-633
- Hoshi K et al. (2022) High correlation among brain-derived major protein levels in cerebrospinal fluid: Implication for amyloid-beta and tau protein changes in Alzheimer's disease. *Metabolites* 12 : 355
- Hoshi K et al. (2023) Brain-derived major glycoproteins are possible biomarkers for altered metabolism of cerebrospinal fluid in neurological diseases. *Int J Mol Sci* 24 : 6084
- Itakura Y et al. (2017) Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study. *Int J Mol Sci* 18 : 1160
- Kailemia MJ et al. (2017) Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Anal Bioanal Chem* 409 : 395-410
- Murakami Y et al. (2018a) Rapid increase of 'brain-type' transferrin in cerebrospinal fluid after shunt surgery for idiopathic normal pressure hydrocephalus: a prognosis marker for cognitive recovery. *J Biochem* 164 : 205-213
- Murakami Y et al. (2018b) Spontaneous intracranial hypotension is diagnosed by a combination of lipocalin-type prostaglandin D synthase and brain-type transferrin in cerebrospinal fluid. *BBA-GEN* 1862 : 1935-1842
- Murakami Y et al. (2019) Transferrin isoforms in cerebrospinal fluid and their relation to neurological disease. *Proc Jpn Acad Ser B* 96 : 198-210
- Nagae M et al. (2014) Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin. *Glycobiology* 24 : 693-702
- Pavone P et al. (2014) Hydranencephaly: cerebral spinal fluid instead of cerebral mantles. *Ital J Pediatr* 40 : 79
- Peters BP et al. (1979) Interaction of wheat grain agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* 18 : 5505-5511
- Reeves BC et al. (2020) Glymphatic system impairment in Alzheimer's disease and idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Trends Mol Med* PMID : 31959518
- Schievink WI et al. (2006) Spontaneous spinal cerebrospinal fluid leaks and intracranial hypotension. *JAMA* 295 : 2286-2296
- Shirotani K et al. (2011) High Throughput ELISAs to Measure a Unique Glycan on Transferrin in Cerebrospinal Fluid: A Possible Extension toward Alzheimer's Disease Biomarker Development. *Int J Alzheimers Dis* 2011 : 352787
- Spiro RG (2004) Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum associated degradation. *Cell Mol Life Sci* 61 : 1025-1041
- Taketa K et al. (1990) Lecin-reactive profules of alpha-fetoprotein characterizing hepatocellular carcinoma and related conditions. *Gastroenterol* 99 : 508-518
- Taniguchi M et al. (2008) Sugar chains of cerebrospinal fluid transferrin as a new biological marker of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 26 : 117-122
- Tateno H et al. (2007) Frontal affinity chromatography: sugar-protein interactions. *J Nt Protoc* 2 : 2529-2537
- Tinto S et al. (2011) The ER stress 664 factor XBP1s prevents amyloid- β neurotoxicity. *Hum Mol Genet* 20 : 2144-2160
- Uddin MS et al. (2021) Exploring ER stress response in cellular aging and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Aging Res Rev* 70 : 101417
- Walz G et al. (1990) Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250 : 1132-1135
- Ward RJ et al. (2014) The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 13 : 1045-1060
- Zecca L et al. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5 : 863-873

Transferrin biosynthesized by neurons is a diagnostic marker for Alzheimer's diseaseYasuhiro Hashimoto¹⁾, Takashi Saito²⁾, Yoshiki Yamaguchi³⁾, Takashi Honda⁴⁾¹⁾Department of Neurosurgery, Fukushima Medical University School of Medicine²⁾Department of Neurocognitive Science, Institute of Brain Science,
Nagoya City University Graduate School of Medical Science³⁾Division of Structural Glycobiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku Medical and Pharmaceutical University⁴⁾Department of Human Life Science, Fukushima Medical University School of Nursing

Glycosylation is a cell type-specific post-translational modification that can be used for biomarker identification in various diseases. Aim of this study is to explore glycan-biomarkers on transferrin (Tf) for Alzheimer's disease (AD) in cerebrospinal fluid (CSF). Glycan structures of CSF Tf were analyzed by ultra-performance liquid chromatography followed by mass spectrometry. We found that a unique mannosylated-glycan is carried by a Tf isoform in CSF (Man-Tf). The cerebral cortex contained Man-Tf as a major isoform, suggesting that CSF Man-Tf is, at least partly, derived from the cortex. Man-Tf levels were analyzed in CSF of patients with neurological diseases. Concentrations of Man-Tf were significantly increased in AD and mild cognitive impairment (MCI) comparing with other neurological diseases, and the levels correlated well with those of phosphorylated-tau (p-tau), a representative AD marker. Consistent with the observation, p-tau and Tf were co-expressed in hippocampal neurons of AD, leading to the notion that a combined p-tau and Man-Tf measure could be a biomarker for AD. Indeed, levels of p-tau x Man-Tf showed high diagnostic accuracy for MCI and AD; 84% sensitivities and 90% specificities for MCI and 94% sensitivities and 89% specificities for AD. Thus Man-Tf could be a new biomarker for AD.

Address correspondence to Dr. Yasuhiro Hashimoto, Department of Neurosurgery, Fukushima Medical University School of Medicine (1 Hikarigaoka, Fukushima-City, Fukushima 960-1295, Japan)