



Title	Subgroup differences in "brain-type" transferrin and -synuclein in Parkinson's disease and multiple system atrophy(本文)
Author(s)	吉原, 章王
Citation	
Issue Date	2016-09-29
URL	<a href="http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/935">http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/935</a>
Rights	This thesis/dissertation is translated from "J Biochem. 2016 Aug;160(2):87-91. doi: 10.1093/jb/mvw015. © The Authors 2016. Published by Oxford University Press".
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2024-04-19T00:10:30Z

# 学 位 論 文

## Subgroup differences in "brain-type" transferrin and $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease and multiple system atrophy

(パーキンソン病と多系統萎縮症では、髄液中の脳型  
トランスフェリンと $\alpha$ -シヌクレイン値が異なるサブグ  
ループが存在する)

福島県立医科大学医学部

生化学講座

神経内科学講座

吉原章王

## 概要：

### 【背景と目的】

多くのタンパク質はリン酸、脂質、糖鎖などの翻訳後修飾を受けている。このうち糖鎖修飾は細胞種特異性がある。すなわち、細胞種特異的な糖鎖修飾により、タンパク質部分は共通だが糖鎖部分が異なる分子群（糖鎖アイソフォーム）が生合成される。従って、糖鎖アイソフォームは特定の細胞の異常を示す疾患マーカーとなりうる。

トランスフェリン（transferrin, Tf）は鉄輸送タンパク質である。主に肝臓で生合成され、血液中に分泌される（血清 Tf）。一方、ヒト脳脊髄液（cerebrospinal fluid, CSF）中には脳型 Tf と血清型 Tf の 2 種類の Tf 糖鎖アイソフォームが存在する。脳型 Tf は CSF の産生組織である脈絡叢に由来し、血清型 Tf は血液に由来すると考えられている。

特発性正常圧水頭症（idiopathic normal pressure hydrocephalus, iNPH）は、認知症・歩行障害・尿失禁および脳室拡大を示す老人性の認知症である。本疾患は CSF の代謝異常が原因であると考えられている。アルツハイマー病（Alzheimer's disease, AD）は認知症と脳室拡大を示すことから、両者の鑑別は重要である。iNPH において Tf 糖鎖アイソフォームを分析したところ、脳型 Tf は減少する一方で、血清型 Tf の変化は認めないことを見出した。一方、AD においては、この変化が認められなかった。すなわち、Tf 糖鎖アイソフォームは iNPH マーカーとなる可能性が示唆された。

神経変性疾患には、タウオパチーおよび $\alpha$ -シヌクレイノパチーが含まれる。タウオパチーは、微小管結合タンパクであるタウ蛋白の異常蓄積により引き起こされる。タウオパチーの代表疾患が AD である。タウオパチーに含まれる他の疾患としては、反社会的人格変化を中核症状とし、前頭側頭葉優位の脳萎縮をきたす前頭側頭型認知症（frontotemporal dementia, FTD）、垂直性の核上性注視麻痺、初期からの易転倒性、パーキンソン症状などを特徴とする進行性核上性麻痺（progressive supranuclear palsy, PSP）、パーキンソン症状のほか失行などの大脳皮質症状を伴う大脳皮質基底核変性症（corticobasal degeneration, CBD）がある。

一方、 $\alpha$ -シヌクレイノパチーは、シナプス前終末に局在する $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の異常蓄積により神経変性が引き起こされる。代表疾患としては、安静時振戦、筋固縮、無動・動作緩慢、姿勢反射障害などの運動障害を主徴とするパーキンソン病（Parkinson's disease, PD）、変動する認知機能、幻視、パーキンソン症状などを特徴とするレヴィ小体型認知症（dementia with Lewy bodies, DLB）、自律神経障害に加えて、パーキンソン症状または小脳症状を伴う多系統萎縮症（multiple system atrophy, MSA）がある。

上記疾患のうち、とくに PD では CSF と血液中のバイオマーカーについてさまざまな検討がなされている。そのうち $\alpha$ -シヌクレインは最も有力なマーカーである。PD では神経細胞内への $\alpha$ -シヌクレイン蓄積の結果、二次的に CSF 中の可溶性 $\alpha$ -シヌクレイン濃度が低下すると報告され、診断的バイオマーカー

と考えられている。一方、PD では脳への異常な鉄沈着が認められ、鉄代謝異常の関与が示唆されている。Tf は鉄輸送タンパク質であることから、脳型 Tf の検討は PD の新たなバイオマーカーとなりうる可能性が推測された。

これらのことから、本研究では AD に加えて各種の神経変性疾患における CSF 中の Tf の測定を行い、脳型 Tf の変化の有無を検討した。

#### 【方法】

対照群 15 例、AD 18 例、FTD 5 例、PSP 7 例、PD 73 例、MSA 20 例の CSF 中の Tf を測定した。各疾患はそれぞれ臨床的診断基準を用いて診断し、対照群は頭痛やてんかんなど種々の神経疾患とした。タウ蛋白異常により発症する AD、FTD、PSP をタウオパチー群、 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白異常により発症する PD と MSA を $\alpha$ -シヌクレイノパチー群とした。Tf の測定はウェスタンブロット法にて行い、ブロット間の誤差を補正するために Tf インデックス (血清型 Tf/脳型 Tf) を採用した。また PD については、CSF 中の $\alpha$ -シヌクレインおよび CSF の代謝マーカーであるプロスタグランジン D2 合成酵素 (prostaglandin D2 synthetase, PGD2S) を酵素免疫測定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法にて測定した。

#### 【結果】

タウオパチー群と対照群で Tf インデックスに差は認めなかった (それぞれ  $2.34 \pm 0.77$ 、 $2.12 \pm 0.92$ ,  $p = 0.248$ )。一方、 $\alpha$ -シヌクレイノパチー群、すなわち PD と MSA の Tf インデックスは対照群と比べて有意に高値であった (それぞれ  $3.38 \pm 1.87$ ,  $p = 0.001$ 、 $3.15 \pm 1.74$ ,  $p = 0.043$ )。PD と MSA の Tf インデックスは単純な正規分布を示さないことから、正規確率プロットによる正規分布性の検定、傾向化除去正規 Quantile-Quantile (Q-Q) プロットを行った。PD の Tf インデックスの傾向化除去正規 Q-Q プロットでは、インデックス 4 付近を境にして、少なくとも 2 つのグループに分けられることが示された。Tf インデックスが 4 以上を示す PD はほぼ 1 本の直線で近似され、独立したサブグループであることが示唆された。同様の Tf インデックス高値群が MSA でも観察された。両者を重ね合わせた傾向化除去正規 Q-Q プロットにおいても、Tf インデックス高値群の直線性が認められた。従って、 $\alpha$ -シヌクレイノパチー群において Tf インデックス高値のサブグループが示唆された。また PD のうち、Tf インデックス高値群は Tf インデックス低値群に比べて CSF 中の $\alpha$ -シヌクレインは有意に高値であった (それぞれ  $38.3 \pm 17.8$  ng/mL,  $25.3 \pm 11.3$  ng/mL,  $p = 0.012$ )。一方、PGD2S 値に差は認めなかったことから、CSF の代謝の大きな変化は示されなかった。

#### 【考察】

本研究により、PD (および MSA) において Tf インデックス高値 (脳型 Tf 低値) を示すサブグループの存在が示された。また、このサブグループでは、従来報告されている $\alpha$ -シヌクレインの低下は認められなかった。すなわち、このサブグループでは、PD 病理において中心的役割を果たす $\alpha$ -シヌクレイン代謝が異なっている事が示された。Tf は鉄輸送タンパク質であることから、その代謝変化は、神経細胞

への鉄沈着および酸化ストレスを誘導し細胞死を促進する可能性が考えられる。今後このサブグループの剖検例における鉄沈着や $\alpha$ -シヌクレイン沈着の解析が重要であると考えられる。

**【結論】**

$\alpha$ -シヌクレイノパチーには脳型 Tf の代謝が異なる 2 つのサブグループが存在する。脳型 Tf は $\alpha$ -シヌクレイノパチーの臨床病型やその他疾患との鑑別マーカーになる可能性がある。

目次 (content) :

表題 (title)、所属・著者名 (name)	p. 1
概要	p. 2
略語 (abbreviations)	p. 6
序論 (introduction)	p. 8
方法 (materials and methods / procedures)	p. 10
結果と考察 (results and discussion)	p. 12
引用文献 (references)	p. 14
図説明 (figure legends)、図 (figures)	p. 17
謝辞等 (acknowledgment)	p. 23

**略語 (abbreviations) :**

AD, Alzheimer's disease

BACE1, beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme

CBD, corticobasal degeneration

CSF, cerebrospinal fluid

DLB, dementia with Lewy bodies

DTT, dithiothreitol

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

FTD, frontotemporal dementia

Fuc, fucose

Gal, galactose

GlcNAc, N-acetylglucosamine

HRP, horseradish peroxidase

iNPH, idiopathic normal pressure hydrocephalus

L-PGDS, lipocalin-type prostaglandin D synthase

Man, mannose

MSA, multiple system atrophy

NINCDS-ADRDA, National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

NeuAc, N-acetylneuraminic acid

NINDS-SPSP, National Institutes of Neurological Disorders and Stroke-Society for PSP

PA, pyridyl-amination

PBST, phosphate buffered saline-tween

PD, Parkinson's disease

PGD2S, prostaglandin D2 synthetase

PSP, progressive supranuclear palsy

Q-Q, Quantile-Quantile

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-poly acryl amide gel electrophoresis

SNCA,  $\alpha$ -synuclein

Tf, transferrin

TH, tyrosine hydroxylase

TMB, tetramethylbenzidine

UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale



## 序論 (introduction) :

多くのタンパク質はリン酸、脂質、糖鎖などの翻訳後修飾を受けている。そのうち分泌タンパク質や膜タンパク質の多くは糖鎖修飾を受けており、この糖鎖修飾構造は細胞種特異的である。このように、タンパク質部分は共通で糖鎖部分が異なる分子群は糖鎖アイソフォームと呼ばれ、特定の細胞の異常を示す疾患マーカーとなりうる。

鉄輸送タンパク質である Tf には、ヒト CSF 中に脳型 Tf と血清型 Tf の 2 種類の Tf 糖鎖アイソフォームが存在することが報告されている (図 1)。脳型 Tf は糖鎖末端のシアル酸とガラクトースを欠く特徴的なバイアンテナの N-グリカンを持ち、さらにバイセクト N-アセチルグルコサミンとコアフコースの修飾を受けている [1,2]。抗 Tf 抗体により脈絡叢が強く染色されたことから、脳型 Tf は CSF の産生組織である脈絡叢に由来すると考えられている [1]。なお、“脳型”糖鎖は PGD2S や  $\beta$ -セクレターゼ (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme, BACE1) などの脳内で生合成される糖タンパク質上にも発現することが知られている [3,4]。一方、血清型 Tf は血清 Tf と同様にバイアンテナの  $\alpha$ -2,6 シアル酸末端糖鎖を有し、血清型 Tf は血液に由来すると考えられている [5]。

われわれは、CSF の代謝異常が原因である iNPH において Tf 糖鎖アイソフォームを分析したところ、脳型 Tf は減少する一方、血清型 Tf の変化は認めないことを見出した (図 2A) [1]。また認知症と脳室拡大をきたす点から、ときに鑑別が重要となる AD でも検討したところ、iNPH と AD の鑑別にも有用であることが明らかとなった (図 2B) [1]。すなわち、Tf 糖鎖アイソフォームは疾患鑑別マーカーとなる可能性が示唆された。

AD は認知症をきたす神経変性疾患であり、微小管結合タンパクであるタウ蛋白の異常蓄積により発症し、タウオパチーに分類される [6]。タウオパチーはほかに反社会的な人格変化を中核症状とし、前頭側頭葉優位の脳萎縮をきたす FTD、垂直性の核上性注視麻痺、初期からの易転倒性、パーキンソン症状などを特徴とする PSP、パーキンソン症状のほか失行などの大脳皮質症状を伴う CBD がある。一方、シナプス前終末に局在する  $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の異常蓄積により発症する  $\alpha$ -シヌクレイノパチーには、安静時振戦、筋固縮、無動・動作緩慢、姿勢反射障害などの運動障害を主徴とする PD、変動する認知機能、幻視、パーキンソン症状などを特徴とする DLB、自律神経障害に加えて、パーキンソン症状または小脳症状を伴う MSA がある [7]。PD と MSA の全ゲノム関連解析では、 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白をコードする  $\alpha$ -synuclein (SNCA) 遺伝子の一塩基変異多型がこれらの疾患の高い危険因子であることが明らかにされている [8]。

上記疾患のうち、とくに PD では CSF と血液中のバイオマーカーについてさまざまな検討がなされている。そのうち  $\alpha$ -シヌクレインは最も注目されており、PD では神経細胞内への  $\alpha$ -シヌクレイン蓄積の結果、二次的に CSF 中の可溶性  $\alpha$ -シヌクレイン濃度が低下すると報告され、診断的バイオマーカーと考えられている [9]。

また、鉄は黒質のドーパミン神経細胞においてチロシンをドーパミンに変換するチロシン水酸化酵素

(tyrosine hydroxylase, TH) の補酵素となる重要な物質である。しかし一方で鉄の過剰は酸化ストレスを惹起することで $\alpha$ -シヌクレインの凝集を促進させることが知られていることから[10,11]、鉄代謝異常が PD の発症を促進する可能性がある。細胞外において鉄は Tf と結合することでその毒性は最小限に抑えられており、CSF 中の Tf 値は 20-60 $\mu$ g/ml に維持されている。Tf は鉄輸送タンパク質であることから、脳型 Tf の検討は PD の新たなバイオマーカーとなりうる可能性が推測された。

これらのことから、本研究では AD に加えて各種の神経変性疾患における Tf の測定を行い、脳型 Tf の変化の有無を検討した。

## 方法 (materials and methods / procedures) :

対照群 15 例、AD 18 例、FTD 5 例、PSP 7 例、PD 73 例、MSA 20 例の CSF 中の Tf を測定した。

PD と MSA はそれぞれ UK brain bank の臨床的パーキンソン病診断基準と Gilman らの改訂 MSA 診断基準を用いて診断した[12, 13]。AD は Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition (DSM-4) 改訂版と National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) 研究班の診断基準を用いて診断した[14]。FTD と PSP はそれぞれ Neary らの臨床的 FTLD 診断基準と National Institutes of Neurological Disorders and Stroke-Society for PSP (NINDS-SPSP) の臨床診断基準を用いて診断した[15, 16]。対照群は頭痛やてんかんなど種々の神経疾患とした。タウ蛋白異常により発症する AD、FTD、PSP をタウオパチー群、 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白異常により発症する PD と MSA を $\alpha$ -シヌクレイノパチー群とした。

脳型 Tf および血清型 Tf は Futakawa らの方法を用いてウェスタンブロット法により定量し、ブロット間の誤差を補正するために Tf インデックス (血清型 Tf/脳型 Tf) を採用した[1]。すなわち、検量線の範囲内に入るようにおおよそのタンパク量を揃えて調整した CSF サンプルを、還元剤 (dithiothreitol, DTT) を用いない緩衝剤 (phosphate buffered saline-tween, PBST) で溶解後 3 分煮沸し、7.5%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (SuperSep™ Ace; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-poly acryl amide gel electrophoresis, SDS-PAGE) により展開した。コントロールとして毎回同じ CSF サンプルと、検量線を作成するための標準サンプル (ヒト血清 Tf) を同一ゲル上で 300V、20mA/枚、75 分間泳動した。SDS-PAGE 展開後、Tris Glycine buffer のもと 300V、350mA、45 分間のウェット式ウェスタンブロッティングによりニトロセルロース膜 (Nitrocellulose Membranes, #162-0115, 0.45 $\mu$ m, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif, USA) へ転写した。3% milk PBST、4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングを行い、3% milk PBST で 2000 倍希釈した抗 Tf 抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, Tex, USA) を室温で 2 時間、3% milk PBST で 4000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヒツジ IgG 抗体 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa, USA) を室温で 2 時間インキュベートした後、Supersignal West Dura Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rock-ford, Ill, USA) を用いて検出した。検出したバンドのシグナルは CoolSaver 1.0 および CS Analyzer 2.0 (ATTO, Tokyo, Japan)により解析し定量した (図 3)。

また PD については、CSF 中の $\alpha$ -シヌクレインおよび CSF の代謝マーカーである PGD2S を ELISA 法にて測定した。 $\alpha$ -シヌクレインは Tokuda らの方法を用いて測定した[17]。PGD2S は iNPH において減少することが知られている CSF の代謝マーカーであるが[18]、human prostaglandin D synthase (lipocalin-type) ELISA kit (BioVendor Laboratorní medicína, Modrice, Czech Republic) を用いて測定した。抗ヒト lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) ポリクローナル抗体がコートされ

た 96 ウェルプレートに標準サンプル、100 倍に希釈した陽性コントロール、500 倍に希釈した CSF サンプルをデュプリケートで添加し常温で 1 時間インキュベートした。3 回洗浄後に HRP 標識抗ヒト L-PGDS ポリクローナル抗体を加え常温で 1 時間インキュベートし、3 回洗浄後に tetramethylbenzidine (TMB) 基質液を加え遮光して常温で 10 分間静置後に停止液を加え、プレートリーダー (Bio-rad Laboraories) にて 450nm の吸光度を測定した。

統計解析は SPSS version 17 (SPSS, Chicago, IL) と“R” version 3.2.0 (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。Kolmogorov-Smirnov 法または Shapiro-Wilk 法により正規性の検定を行い、2 群間において Levene T 検定もしくは Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。

なお、本研究は福島県立医科大学倫理委員会承認番号 613 に基づいて行われた。

## 結果 (results) と考察 (discussion) :

$\alpha$ -シヌクレイノパチー群 (PD と MSA) とタウオパチー群 (AD、FTD と PSP) において Tf インデックス (血清型 Tf/脳型 Tf) を測定した。Tf インデックスはタウオパチー群と対照群で差は認めなかった (それぞれ  $2.34 \pm 0.77$ 、 $2.12 \pm 0.92$ ,  $p = 0.248$ , Mann-Whitney U 検定) (図 4)。一方、 $\alpha$ -シヌクレイノパチー群、すなわち PD と MSA の Tf インデックスは対照群と比べて有意に高値であった (それぞれ  $3.38 \pm 1.87$ ,  $p = 0.001$ 、 $3.15 \pm 1.74$ ,  $p = 0.043$ , Mann-Whitney U 検定)。PD と MSA の Tf インデックスは単純な正規分布を示していないことから、正規確率プロットによる正規分布性の検定 (傾向化除去正規 Q-Q プロット) を行った。PD の Tf インデックスの傾向化除去正規 Q-Q プロットでは、インデックス値 4 付近を境にして、少なくとも 2 つのグループに分けられることが示された (図 5A)。Tf インデックス値が 4 以上を示す PD はほぼ 1 本の直線で近似され、統計的に独立したサブグループであることが示唆された。同様の Tf インデックス高値群が MSA でも観察され (図 5B)、両者を重ね合わせた傾向化除去正規 Q-Q プロットにおいても Tf インデックス高値群の直線性が認められた (図 5C)。したがって、 $\alpha$ -シヌクレイノパチー群において Tf インデックス高値のサブグループが示唆された。PD のサブグループを Tf インデックス高値群と Tf インデックス低値群に分類し、重症度 (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS)、罹病期間、年齢、性別などの臨床データを比較したが、有意差は認めなかった。

$\alpha$ -シヌクレイノパチーでは、神経細胞に $\alpha$ -シヌクレインが蓄積する一方で CSF 中の $\alpha$ -シヌクレインは低下するとされている。Mollenhauer らは、PD では対照群に比べて CSF 中の $\alpha$ -シヌクレインは 60%まで低下すると報告している[9]。本研究においても PD のサブグループにおいて、CSF 中の $\alpha$ -シヌクレインを測定した (図 6A)。Tf インデックス高値群の $\alpha$ -シヌクレイン値 ( $38.3 \pm 17.8$  ng/mL) は Tf インデックス低値群の $\alpha$ -シヌクレイン値 ( $25.3 \pm 11.3$  ng/mL) に比べて有意に高値であった ( $p = 0.012$ , Mann-Whitney U 検定)。このことから、これらのサブグループにおいては Tf 糖鎖アイソフォームに加えて $\alpha$ -シヌクレインの代謝も異なることが示された。

$\alpha$ -シヌクレイノパチー群において血清型 Tf 値は一定の範囲内にあることから、 $\alpha$ -シヌクレイノパチー群における Tf インデックス高値は脳型 Tf の減少が主因であると考えられた。脳型 Tf が選択的に減少するとした場合、脈絡叢からの産生の低下あるいは神経系での吸収の亢進のいずれかの機序が考えられる。そこで、代表的な CSF の産生マーカーである PGD2S を測定したが (図 6B)、これらのサブグループにおいて有意差は認めなかった (Levene T 検定)。PGD2S は脈絡叢と同時にクモ膜からも産生されるため確実な証拠とは言えないが、脳型 Tf の産生の低下を示す脈絡叢機能の異常は示唆されなかった。一方、脳型 Tf の選択的な減少が、神経系での吸収の亢進が原因との仮説に対する確実な証拠は得られていない。PD の主病変である黒質線条体ではドーパミンの生合成が行われ、この生合成の初発酵素であるチロシン水酸化酵素は鉄を必須の補酵素とする。従って、黒質線条体系ニューロンでは一定量の鉄を細胞内に保持している。この貯蔵鉄が何らかの原因で過剰になり、その酸化ストレスによって神経細胞死が

誘導されるとの仮説が以前より提唱されている。つまり、黒質線条体における脳型 Tf の吸収が亢進すると鉄沈着が促進される可能性がある。今後、Tf インデックス高値群の高感度 MRI や剖検脳における鉄濃度の測定などの検討が必要と考えられる。

現在、鉄代謝に関連する遺伝子異常が神経変性疾患の危険因子になると考えられている。例えば、全ゲノムスクリーニングにより鉄シャペロン蛋白である *frataxin* の欠損はフリードライヒ失調症を引き起こすことが明らかとなった。また *Hfe* 遺伝子は家族性と孤発性の AD の発症に関連する[19, 20]。*Hfe* 遺伝子は遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子として同定され、その産生タンパク質である HFE は 62-ミクログロブリンと Tf 受容体と複合体を形成し、Tf の受容体結合能を低下させる[21, 22]。これらの結果から、Tf を含めた鉄代謝異常が PD や MSA を含む神経変性疾患の病因となることが示唆される。事実、PD では黒質神経細胞における鉄含有量の異常が示されている[10]。本研究で我々は、PD と MSA において Tf インデックスが高値を示すサブグループの存在を明らかにした。このサブグループにおける病因の一部に脳型 Tf 代謝の関与が考えられる。

引用文献 (references) :

1. Futakawa, S., Nara, K., Miyajima, M., Kuno, A., Ito, H., Kaji, H., Shirotani, K., Honda, T., Tohyama, Y., Hoshi, K., Hanzawa, Y., Kitazume, S., Imamaki, R., Furukawa, K., Tasaki, K., Arai, H., Yuasa, T., Abe, M., Arai, H., Narimatsu, H., and Hashimoto, Y. (2012) A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH. *Neurobiology of aging* **33**, 1807-1815
2. Hoffmann, A., Nimtz, M., Getzlaff, R., and Conradt, H. S. (1995) 'Brain-type' N-glycosylation of asialo-transferrin from human cerebrospinal fluid. *FEBS Lett* **359**, 164-168
3. Hoffmann, A., Nimtz, M., Wurster, U., and Conradt, H.S. (1994) Carbohydrate structures of beta-trace protein from human cerebrospinal fluid: evidence for 'braintype' N-glycosylation. *J. Neurochem.* **63**, 2185-2196
4. Kizuka, Y., Kitazume, S., Fujinawa, R., Saito, T., Iwata, N., Saido, T.C., Nakano, M., Yamaguchi, Y., Hashimoto, Y., Staufienbiel, M., Hatsuta, H., Murayama, S., Many, H., Endo, T., and Taniguchi, N. (2015) An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* **7**, 175-189
5. Nagae, M., Morita-Matsumoto, K., Arai, S., Wada, I., Matsumoto, Y., Saito, K., Hashimoto, Y., and Yamaguchi, Y. (2014) Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin. *Glycobiology* **24**, 693-702
6. Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 783-793
7. Spillantini, M. G., and Goedert, M. (2000) The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **920**, 16-27
8. Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J.M., Sharma, M., Gibbs, J.R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S.W., Hernandez, D.G., Krüger, R., Federoff, M., Klein, C., Goate, A., Perlmutter, J., Bonin, M., Nalls, M.A., Illig, T., Gieger, C., Houlden, H., Steffens, M., Okun, M.S., Racette, B.A., Cookson, M.R., Foote, K.D., Fernandez, H.H., Traynor, B.J., Schreiber, S., Arepalli, S., Zonozi, R., Gwinn, K., van der Brug, M., Lopez, G., Chanock, S.J., Schatzkin, A., Park, Y., Hollenbeck, A., Gao, J., Huang, X., Wood, N.W., Lorenz, D., Deuschl, G., Chen, H., Riess, O., Hardy, J.A., Singleton, A.B., and Gasser, T. (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **41**,

1308-1312

9. Mollenhauer, B., Locascio, J. J., Schulz-Schaeffer, W., Sixel-Döring, F., Trenkwalder, C., and Schlossmacher, M. G. (2011)  $\alpha$ -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *The Lancet Neurology* **10**, 230-240
10. Sofic, E., Paulus, W., Jellinger, K., Riederer, P., and Youdim, M.B. (1991) Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J. Neurochem.* **56**, 978-982
11. Uversky, V.N., Li, J., and Fink, A.L. (2001) Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.* **276**, 44284-44296
12. Gibb, W. R., and Lees, A. J. (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **51**, 745-752
13. Gilman, S., Wenning, G. K., Low, P. A., Brooks, D. J., Mathias, C. J., Trojanowski, J. Q., Wood, N. W., Colosimo, C., Durr, A., Fowler, C. J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K., and Vidailhet, M. (2008) Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* **71**, 670-676
14. Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., and Scheltens, P. (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet. Neurology* **6**, 734-746
15. Neary, D., Snowden, J. S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, A., Robert, P. H., Albert, M., Boone, K., Miller, B. L., Cummings, J., and Benson, D. F. (1998) Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* **51**, 1546-1554
16. Litvan, I., Agid, Y., Calne, D., Campbell, G., Dubois, B., Duvoisin, R. C., Goetz, C. G., Golbe, L. I., Grafman, J., Growdon, J. H., Hallett, M., Jankovic, J., Quinn, N. P., Tolosa, E., and Zee, D. S. (1996) Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* **47**, 1-9
17. Tokuda T, Salem SA, Allsop D, et al. (2006) Decreased  $\alpha$ -synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 162-166
18. Mase, M., Yamada, K., Shimazu, N., Seiki, K., Oda, H., Nakau, H., Inui, T., Li, W., Eguchi, N., and Urade, Y. (2003) Lipocalin-type prostaglandin D synthase (betatrace) in cerebrospinal fluid: a useful



- marker for the diagnosis of normal pressure hydrocephalus. *Neurosci. Res.* **47**, 455-59
19. Moalem, S., Percy, M.E., Andrews, D.F., Kruck, T.P., Wong, S., Dalton, A.J., Mehta, P., Fedor, B., Warren, A.C. (2000) Are hereditary hemochromatosis mutations involved in Alzheimer disease?. *Am. J. Med. Genet.* **93**, 58-66
20. Sampietro, M., Caputo, L., Casatta, A., Meregalli, M., Pellagatti, A., Tagliabue, J., Annoni, G., and Vergani, C. (2001) The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **22**, 563-68
21. Feder, J.N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V.K., Lebrón, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., and Schatzman, R.C. (1998) The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1472-1477
22. Lebrón, J.A., West, A.P. Jr., and Bjorkman, P.J. (1999) The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J. Mol. Biol.* **294**, 239-245

図説明 (figure legends)、図 (figures) :

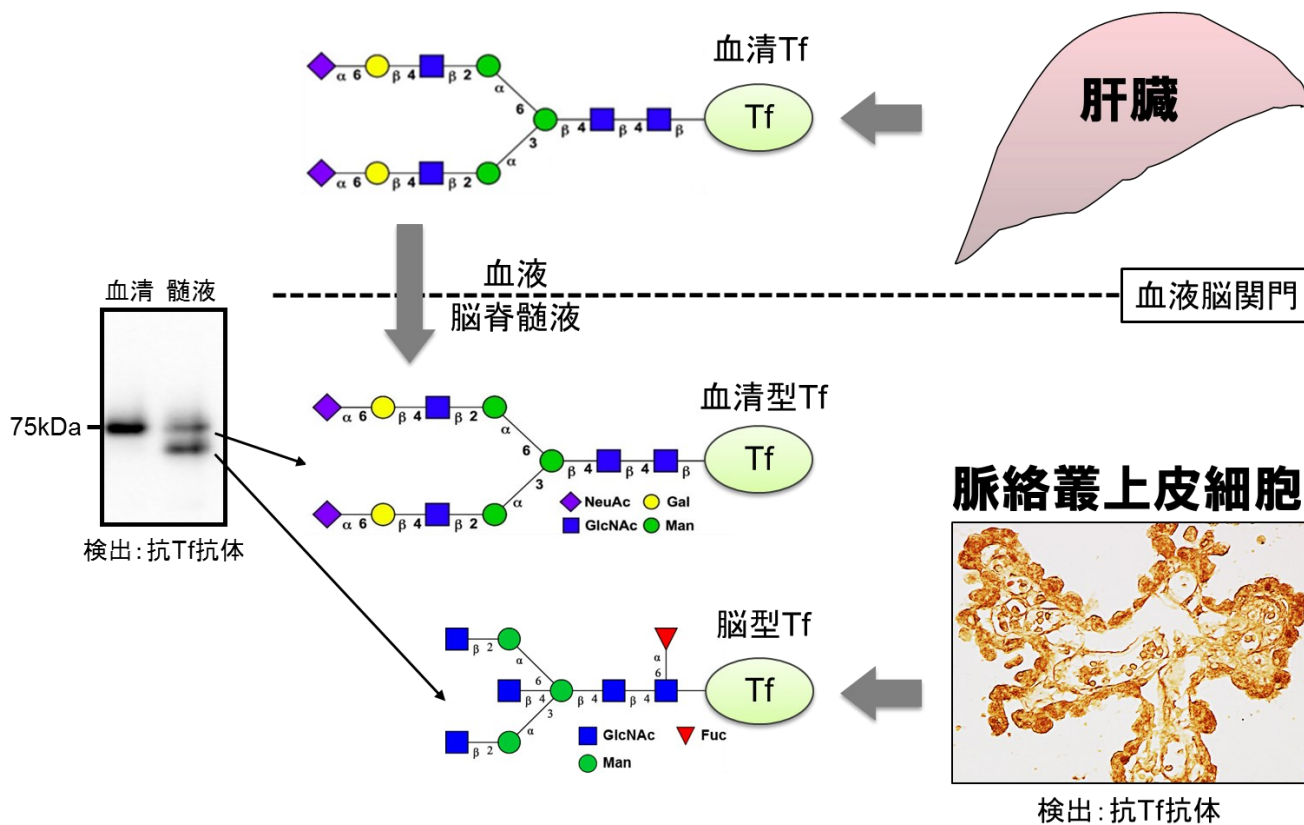


図1 血清およびCSF中のタンパク質の分析とCSF中のTf糖鎖アイソフォーム

CSF中のタンパク質をSDS-PAGEで展開後、抗Tf抗体によるウェスタンブロット法で解析すると、CSF中には血清中に見られない特徴的なバンドが検出される(脳型Tf)。また、血清Tfと同じ移動度のバンドが検出される(血清型Tf)。血清型Tfの分岐した糖鎖末端にはシアル酸 $\alpha$ -2,6ガラクトース末端が存在する。血清Tfの99%以上が血清型Tfと同じ糖鎖を有する。一方、脳型Tfは糖鎖末端のシアル酸とガラクトースを欠き、分岐部分にN-アセチルグルコサミンを、糖鎖の根本にフコースを有する。NeuAc、Gal、GlcNAc、Man、FucはそれぞれN-アセチルノイラミン酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、マンノース、フコースを示す。

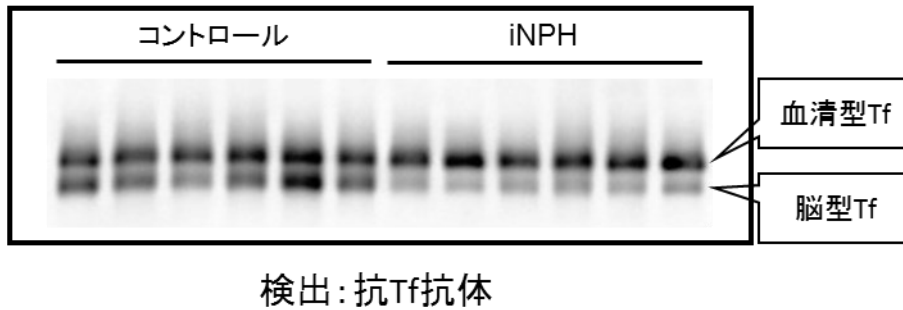
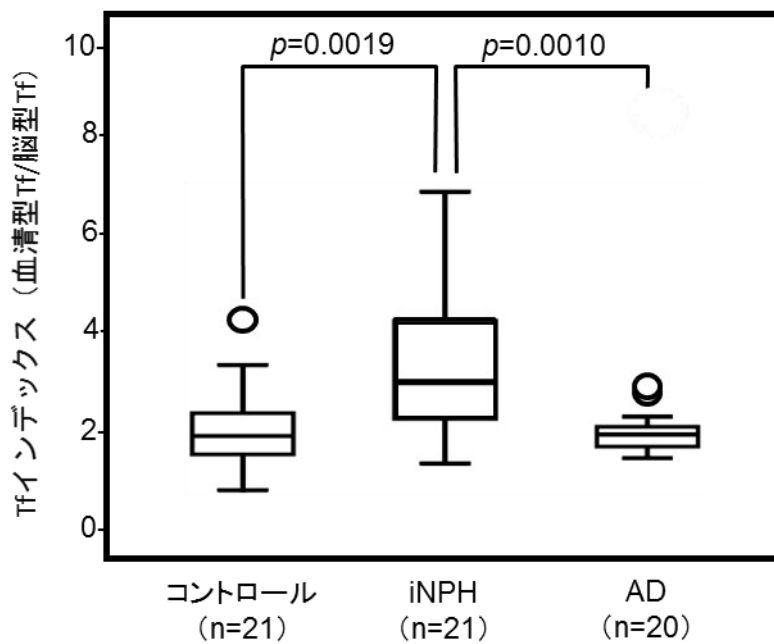
**A****B**

図2 iNPH および AD における脳型 Tf の変化(引用文献 1 より)

(A) 抗 Tf 抗体を用いた CSF 中 Tf のウェスタンブロット法による解析。CSF の代謝異常である iNPH ではコントロールに比べて脳型 Tf は減少する。

(B) iNPH の Tf インデックス(血清型 Tf/脳型 Tf)はコントロールに比べて有意に増加していた。また AD とも有意差を認めた (Steel-Dwass 検定)。白丸は外れ値を示す。

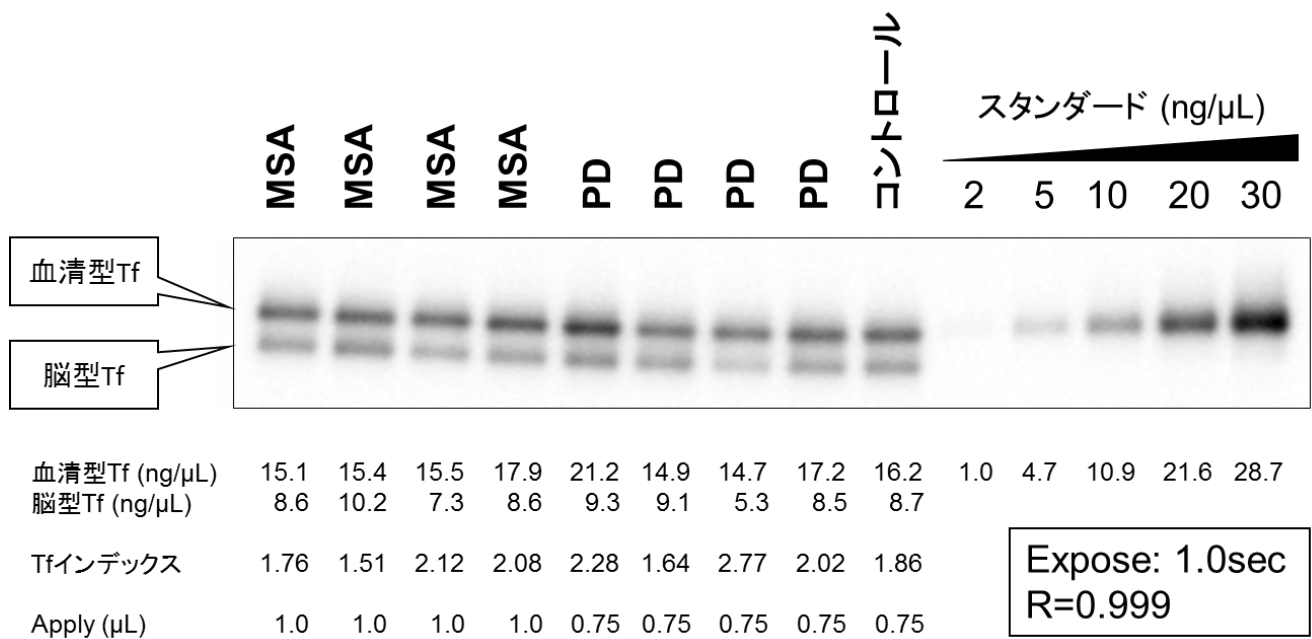


図3 神経変性疾患におけるCSF中Tfのウェスタンブロット法による解析

方法に従ってMSA、PD、コントロール、標準サンプル（ヒト血清Tf）を解析した一例を示す。検量線の範囲内に入るようにおおよそのタンパク量を揃えて調整したCSFサンプル（本例では0.75~1.0μL）を用いて泳動した。血清型Tfと脳型Tfの定量については、ブロット間での誤差を補正するためにTfインデックス（血清型Tf/脳型Tf）を採用した。

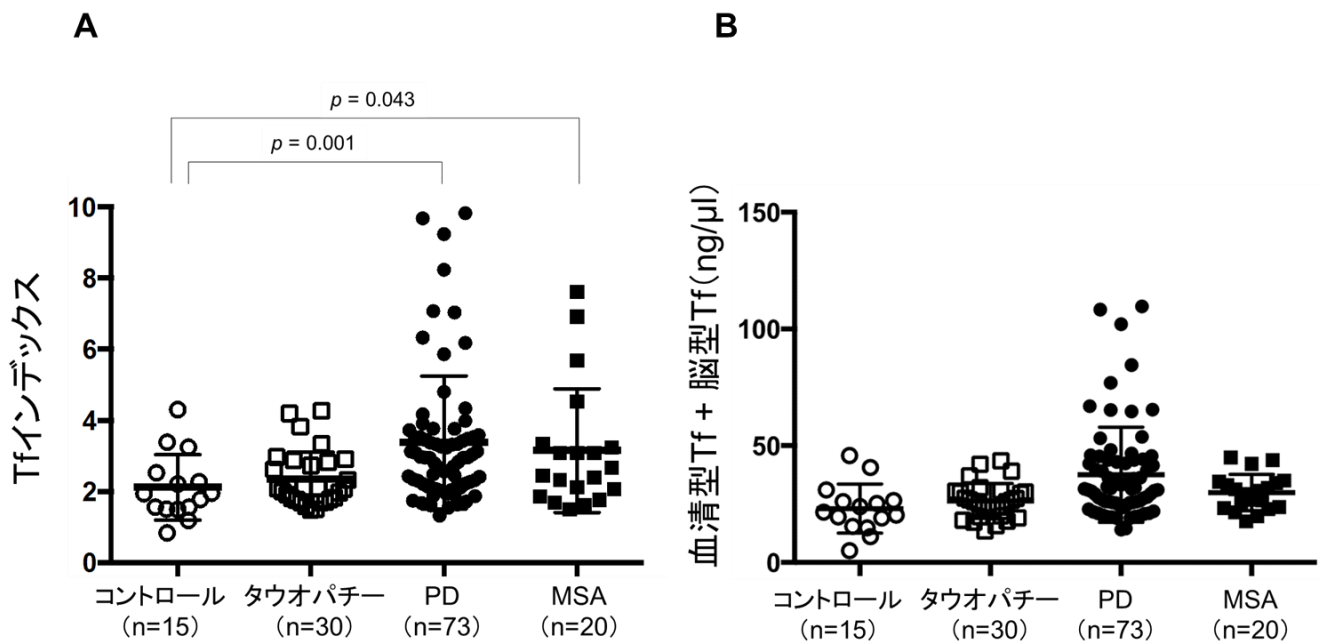


図4 神経変性疾患におけるCSF中のTfインデックスと総Tf量

(A) 対照群 (n = 15)、AD (n = 18)、FTD (n = 5) と PSP (n = 7) を含むタウオパチー、PD (n = 73)、MSA (n = 20) におけるTfインデックス (血清型Tf/髄液型Tf)。ADのTfインデックスはわれわれが報告した文献1から引用した。Tfインデックスはタウオパチー群と対照群で差は認めなかったが (それぞれ  $2.34 \pm 0.77$ 、 $2.12 \pm 0.92$ 、 $p = 0.248$ 、Mann-Whitney U検定)、PDとMSAのTfインデックスは対照群と比べて有意に高値であった (それぞれ  $3.38 \pm 1.87$ 、 $p = 0.001$ 、 $3.15 \pm 1.74$ 、 $p = 0.043$ 、Mann-Whitney U検定)。

(B) 対照群、タウオパチー、PD、MSAにおけるTf総量 (血清型Tfと脳型Tfの和)

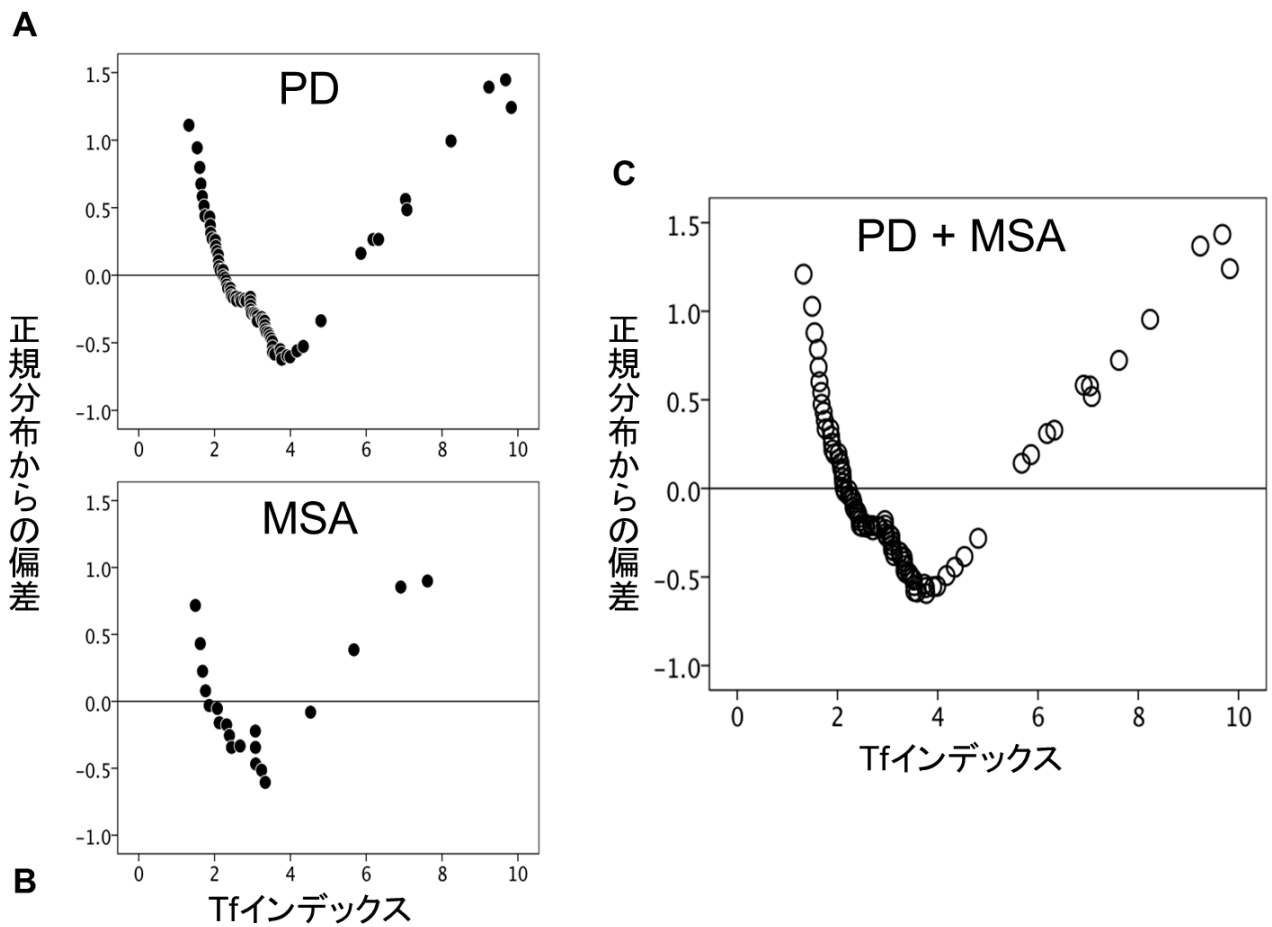


図5  $\alpha$ -シヌクレイノパチーにおける Tf インデックスの正規分布性（傾向化除去正規 Q-Q プロット）

(A) PD の傾向化除去正規 Q-Q プロット。インデックス値 4 付近を境にして、少なくとも 2 つのグループに分けられることが示された。インデックス値が 4 以上を示す PD はほぼ 1 本の直線で近似され、統計的に独立したサブグループであることが示唆された。

(B) MSA の傾向化除去正規 Q-Q プロット。PD と同様の Tf インデックス高値群が MSA でも観察された。

(C) PD と MSA を重ね合わせた傾向化除去正規 Q-Q プロット。Tf インデックス高値群の直線性を認めた。

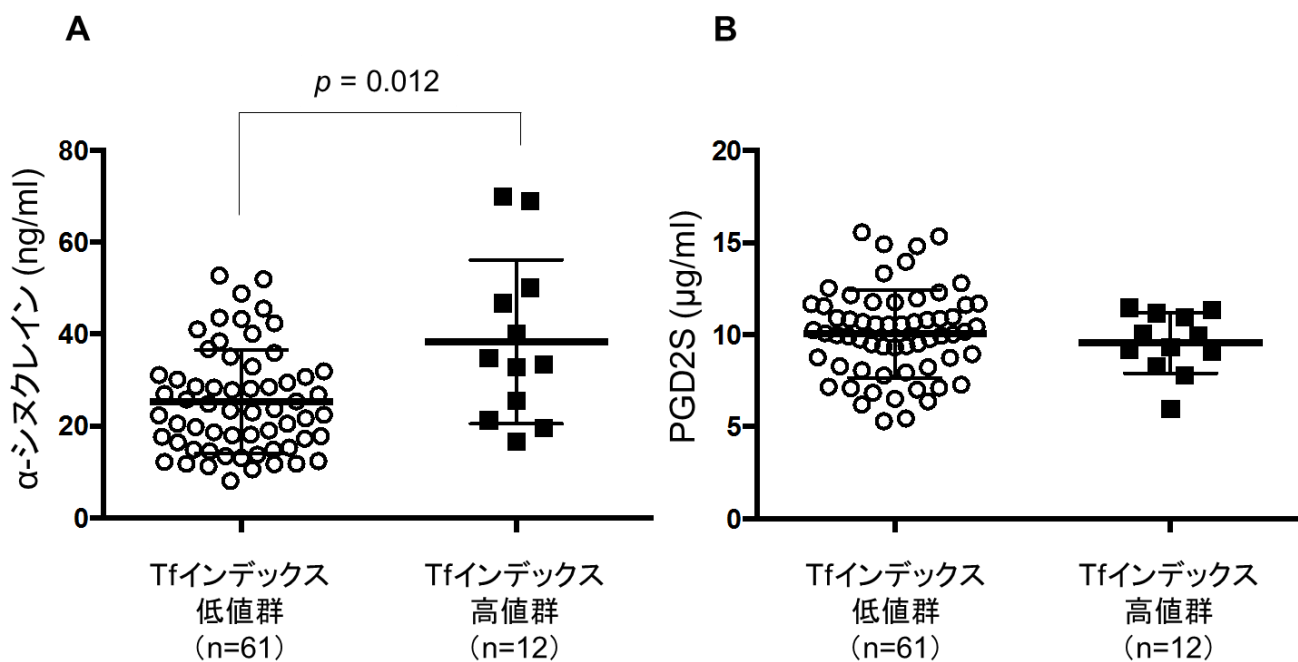


図6 PDにおけるCSF中の $\alpha$ -シヌクレイン値とPGD2S値

(A) PDのTfインデックス低値群(n = 61)と高値群(n = 12)におけるCSF中の $\alpha$ -シヌクレイン値。Tfインデックス高値群の $\alpha$ -シヌクレイン値 ( $38.3 \pm 17.8$  ng/mL) はTfインデックス低値群の $\alpha$ -シヌクレイン値 ( $25.3 \pm 11.3$  ng/mL) に比べて有意に高値であった ( $p = 0.012$ , Mann-Whitney U検定)。

(B) PDのTfインデックス低値群(n = 61)と高値群(n = 12)におけるCSF中のPGD2S値。これらのサブグループに有意差は認めなかった (Levene T検定)。

## 謝辞等 (acknowledgment) :

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；厚労科研費 No. 2014-難治一般-052；JST、A-step No. AS221Z00232F、AS231Z01053、241FT02551 および 149；文科省科研費 No. 23590367 および新学術領域研究 No. 23110002（神経糖鎖生物学）

本研究を行うにあたり、福島県立医科大医学部生化学講座橋本康弘教授、神経内科学講座宇川義一教授から研究全般ならびに本論文の作成にわたり多大なご助言とご指導を頂いた。また、福島県立医科大学医学部生化学講座星京香先生、伊藤浩美先生には研究全般にわたり終始多くのご助言、ご指導を頂いた。

以上の先生方、並びに本研究に多大なご協力を頂いた下記の先生方に心より感謝申し上げます。

福島県立医科大医学部神経内科学講座

榎本博之先生

福島県立医科大学医学部生化学講座

深津真彦先生

福島県立医科大医学部輸血・移植免疫学講座

Kenneth Nollet 先生

理化学研究所

山口芳樹先生

京都府立医科大学大学院医学研究科分子脳病態解析学（神経内科学併任）

石井亮太郎先生、徳田隆彦教授

順天堂大学医学部脳神経外科学講座

宮嶋雅一准教授、新井一教授

山形大学医学部内科学第三講座

加藤丈夫教授

東北大学加齢医学研究所老年医学分野

古川勝敏准教授、荒井啓行教授

東北大学医学部神経内科

菊池昭夫先生

仙台西多賀病院神経内科

武田篤先生