

200833025A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

自己免疫疾患に伴う中枢神経障害に関連する抗神経抗体の検索と抗原機能の解析；
病態の解明から治療法確立に向けて

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

自己免疫疾患に伴う中枢神経障害に関連する抗神経抗体の検索と抗原機能の解析：
病態の解明から治療法確立に向けて

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
自己免疫疾患に伴う中枢神経障害に関連する抗神経抗体の検索と抗原機能の解析： 病態の解明から治療法確立に向けて	----- 1
木村暁夫	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 15
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 17

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
総括研究報告書

自己免疫疾患に伴う中枢神経障害に関連する抗神経抗体の検索と抗原機能の解析：
病態の解明から治療法確立に向けて

研究代表者：木村 暁夫
岐阜大学医学部附属病院 神経内科・老年内科 助教

研究要旨

全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群など全身性自己免疫疾患はしばしば中枢神経障害を合併することが知られており、その臨床症状も精神症状、痙攣、認知障害、運動麻痺など多岐にわたり、いずれも患者の予後を左右する重要な病態である。これらの疾患には多種類の自己抗体が存在することが知られており診断項目の一つにもなっている。しかし一方でこれら自己抗体の特異性および病的意義に関しては不明な点が多い。本研究の目的は、中枢神経障害を合併した全身性自己免疫疾患患者の血清・髄液検体を用いて、疾患特異的抗神経抗体の検出ならびにその認識抗原を同定し、得られた抗原情報をもとに新たな診断および治療法の開発を行うことである。

【抗 Hsp60 抗体と大脳白質病変】

研究初年度より我々は二次元免疫プロット法および高感度ナノ LC-MS/MS システムを構築し、様々な免疫性神経疾患と健常者の血清を用い、抗神経抗体の検出およびその認識抗原の同定を行ってきた。その中に多発単ニューロパチーで発症し、その後特徴的な大脳・小脳・脳幹に広範な白質病変を呈した CNS ループス患者を経験し、その血清中に4種類のラット大脳蛋白と免疫学的に反応する抗神経抗体を検出し報告した。そのうちの1つが Heat-shock protein 60(Hsp60)であった。この Hsp60 に関しては、ストレス下に大動脈およびその分枝の血管内皮細胞膜表面に発現することが報告されており、今回の検討で大脳微小血管内皮にも発現することを確認した。そこで同抗体が抗血管内皮細胞抗体として大脳微小血管障害に関与する可能性を考慮し、同抗体価と大脳白質病変につき検討した。ELISA 法により計 215 名の各種神経疾患患者、健常者の抗 Hsp60 抗体価を測定した。このうち高血圧・糖尿病・高脂血症を合併しない 109 名につき頭部 MRI FLAIR 画像での大脳白質病変を Fazekas' rating scale(FRS)を用いて評価した。疾患毎の比較では神経症状を合併した全身性自己免疫疾患患者(CNS ループス、シェーグレン症候群など)において抗体価が高値を示した。大脳白質病変との検討では、高度白質病変合併群(FRS が Deep white matter hyperintensity 2, 3もしくは Periventricular hyperintensity 3)は非合併群と比較し、有意な抗体価の上昇がみられた。また Hsp60 を ICR マウスの腹腔内に接種し免疫マウスを作製し、動物の血中に抗 Hsp60 抗体が検出されることを確認した。この作製した免疫マウスにストレス負荷として LPS を尾静注することにより大脳血管内皮細胞膜表面に Hsp60 を発現させ、エバンスブルーを心腔内に注入した後の大脳切片につき、組織学的な検討を行った。結果、抗 Hsp60 抗体産生マウスでは線条体の血管を中心に血液脳関門の破綻をしめすエバンスブルーの漏出が認められた。

【抗神経抗体と認識抗原の解析】

昨年度、2名の精神症状を呈した CNS ループス患者の血清中に存在する自己抗体の認識抗原蛋白として Rab GDP dissociation inhibitor alpha (α GDI)を同定した。この抗 α GDI 抗体の特異性を確認するために本年度、同抗体を有する患者血清を用いてラット大脳切片に対し免疫組織学的な検討を行った。結果、ラット大脳神経細胞に対し反応性を示した。とりわけ海馬の顆粒細胞および錐体細胞に対する著明な反応性が確認された。 α GDI はプレシナプスにおける神経伝達物質の放出に関与することが知られており、今回得られた免疫組織学的な結果と合わせ、抗 α GDI 抗体と、同抗

体を有する2名の精神症状を呈した CNS ループス患者の病態との間には何らかの関与がある可能性が考えられた。また、抗アクアポリン4抗体陰性のシェーグレン症候群を合併した視神経脊髄型多発性硬化症患者の血清中に存在する抗体が反応するラット大脳蛋白二次元電気泳動上の11個のスポットにつき質量分析を行った。結果、Dynamin-1 (DYN1)、Leucine-rich repeat-containing protein 48 (LRC48)、Synapsin-2 (SYN2)、Excitatory amino acid transporter 5 (EAA5)、Methionine synthase (METH)、Serum albumin (ALBU)、Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT) 以上7つの抗原蛋白を同定した。さらに、通常型多発性硬化症(CMS)患者の血清中よりストレス蛋白の1つである Stress-70 protein (GRP75; 75 kDa glucose-regulated protein)と解糖系酵素の一つである Phosphoglycerate mutase (PGAM) 1 に対する自己抗体を検出した。抗 GRP75 抗体陽性患者は5名中4名が再発期で、3名が髄液中のオリゴクローナルバンドが陽性であった。PGAM1 に関してはリコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロット法により各種神経疾患患者の血清中における同抗体の陽性率を比較検討した。結果、CMS および視神経脊髄炎患者ではその他神経疾患、健常者と比較し抗 PGAM1 抗体が高率に陽性となった。

A. 研究目的

中枢神経障害を合併した全身性自己免疫疾患患者に対し、疾患特異的抗神経抗体の検出ならびに認識抗原の同定を行い、得られた抗原情報を新たな診断および治療法の開発に反映し、同疾患による精神・身体障害を軽減することにより国民福祉に貢献する。

B. 研究方法

1) 患者サンプルの採取と抗神経抗体の検出

中枢神経障害を合併した全身性自己免疫疾患患者(SLE、シェーグレン症候群)、自己免疫性神経疾患(多発性硬化症、視神経脊髄炎)および健常者より血清を採取した。ラット大脳ホモジネートを抗原サンプルとして、13 cm or 18cm, PH 3-10NL or PH 4-7 の dry strip を用いて等電点電気泳動を施行した。その後 12.5% の polyacrylamide gel による SDS-PAGE を施行し、PVDF メンブレンに対しプロットングを施行した。プロット後の PVDF メンブレンを用い上記患者および健常者血清を一次抗体(×1500)とし、HRP で標識したヤギ抗ヒト IgG・A・M 抗体を二次抗体(×2000)として抗原・抗体反応を行い蛍光スキャナーにてスポットを検出した。抗体の反応スポットと、同じサンプルを用いた二次元電気泳動の SyproRuby 染色したゲル上の蛋白スポットとマッチングを行った。

2) 認識抗原の同定

1)にて一致したスポットに対しゲル内トリプシン消化を行い nanoscale capillary liquid chromatography (LC) system (LV-VP, Shimadzu)および ion-trap を原理とした tandem mass spectrometer (LCQ Advantage max, Thermo electron)を組み合わせた高感度の質量分析システムを用い、データベース検索 [Mass data 収集ソフト X calibur TM (Thermo finnigan), Mass data 解析・蛋白同定ソフト MASCOT (Matrix Science)]により患者血清中の抗神経抗体の認識抗原蛋白の同定を試みた。

3) 抗 Hsp60 抗体の ELISA 解析

ELISA kit (Stressgen, Ann Arbor, MI, USA) を用い 180 名の各種神経疾患患者(多発性脳梗塞 18 名、アルツハイマー型認知症 16 名、筋萎縮性側索硬化症 22 名、パーキンソン病 18 名、脊髄小脳変性症 13 名、ギランバレー症候群 11 名、髄膜炎 26 名、多発性硬化症 13 名、視神経脊髄炎 11 名、CNS ループス 15 名、神経症状を合併したシェーグレン症候群 17 名)および 35 名の健常者、合わせて 215 名の血清中抗 Hsp60 抗体価を測定した。またこれら患者の臨床データと頭部 MRI 画像所見を検討した。

4) 大脳白質病変の評価

上記神経疾患患者の頭部 MRI T2 ないし FLAIR 画像を 2 名の神経内科専門医が解析した。大脳深部白質の高信号病変(deep white matter hyperintensity: DWMH)を Fazekas rating scale [grade 0; absent, grade 1; punctate foci, grade 2; initial confluence of foci, grade 3, large confluent areas]を用い、側脳室周囲の白質病変(periventricular hyperintensity: PVH)を Fazekas rating scale [grade 0; absent, grade 1; 'caps' or pencil-thin lining, grade 2; smooth 'halo', grade 3; irregular PVH extending into the deep white matter]を用い評価した。

5) 各患者群の抗 Hsp60 抗体価の比較検討

まず初めに、上記患者のうち神経症状を合併した全身性自己免疫疾患患者(CNS ループス 12 名、神経症状を合併したシェーグレン症候群 13 名)25 名で大脳白質病変の有無に分け抗 Hsp60 抗体価を比較検討した。さらに疾患をひろげて高血圧・糖尿病・高脂血症といった既知の動脈硬化のリスクファクターを有さない 109 名の神経疾患患者で年齢・性別をマッチさせ大脳白質病変の有無に分け抗 Hsp60 抗体価を比較検討した。大脳白質病変の有無に関しては前記 Fazekas' rating scale の DWMH が grade2, 3 ないし PVH が grade3 となる患者群を大脳微小血管内皮細胞障害と関連した高度の大脳白質病変ありと定義した。各群の抗体価の統計学的な有意差を Mann-Whitney's U test

を用いて確認した。

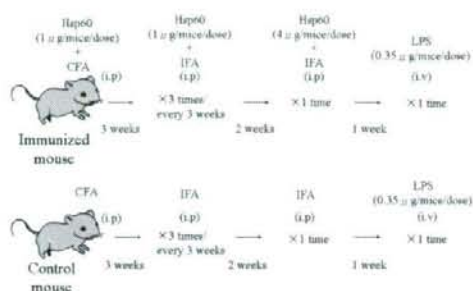
6) ストレス負荷後のマウス大脳血管内皮における Hsp60 抗原の発現に関する検討

大脳血管内皮においてストレス負荷後に Hsp60 抗原が発現されることを確認するために、ストレス負荷として LPS 0.35 μ g/mice/dose を 8 週齢の雄 ICR マウスの尾静脈に注射した後、大脳凍結切片を作成した。その後一次抗体として Rabbit anti-mouse Hsp60 monoclonal antibody (EPT) \times 100 を、二次抗体として Alexa Fluor546 goat anti-Rabbit IgG antibody \times 200 を用い免疫染色を行った。

7) 抗 Hsp60 抗体産生免疫マウスの作成と Hsp60 抗原の血管内皮細胞への誘導実験(図 1)

8 週齢の雄 ICR マウスの腹腔内に、マウス Hsp60 リコンビナント蛋白(StressGen Biotechnologies Corp.) 1 μ g/mice/dose を同量の complete Freund's adjuvant (CFA)(PIERCE)とともに注射した(初回)。その後 3 週毎に計 3 回、同リコンビナント蛋白 1 μ g/mice/dose を同量の incomplete Freund's adjuvant (IFA)(PIERCE)とともに注射した。4 回目の注射終了 2 週間後に同リコンビナント蛋白 4 μ g/mice/dose を同量の IFA とともに注射した(最終 5 回目)。最終免疫後のマウスの尾静脈より採血を行い、同リコンビナント蛋白を抗原として用いたウエスタンブロット法により、動物の血中に抗 Hsp60 抗体が検出されることを確認した。最終免疫の一週間後にマウスの尾静脈より LPS 0.35 μ g/mice/dose を注射し、Hsp60 抗原の血管内皮細胞への誘導を行った。一方、対照としてアジュバントのみを注射したマウスを作製し(対照マウス)、免疫マウスと同様に LPS 0.35 μ g/mice/dose の尾静注を行った。

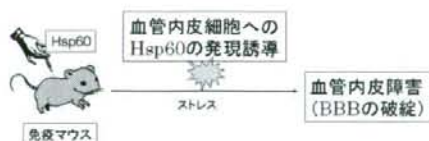
図 1) 免疫マウスの作製と血管内皮への Hsp60 抗原の誘導



8) マウス大脳切片の作製と血液脳関門破壊の評価(図 2)

LPS 尾静注翌日の免疫及び対照マウスに対し、ジエチルエーテルによる麻酔下に開胸し、左心腔内に蛍光標識した 1%エバンスブルー(Sigma-Aldrich)を含む 4%パラホルムアルデヒド固定液を 50ml 注入した。その後、大脳を採取しさらに 4 時間 4%パラホルムアルデヒドにて固定を行った。4 $^{\circ}$ C 下で 30%ショ糖に 24 時間浸した後、ドライアイスパウダーにて急速凍結を行いクリオスタットで切片を作製した。

図 2) 抗 Hsp60 抗体産生免疫マウスに Hsp60 を発現させ血管内皮障害を検討



エバンスブルーを心腔内に注入後大脳切片を作成し、切片の破壊を評価

9) 抗 α GDI 抗体の特異性に関する免疫組織学的検討

7 週齢の雄 Wister ラットの脳凍結切片を作製した。一次抗体に抗 α GDI 抗体を有する患者血清 \times 500 を用い、二次抗体として Alexa Fluor488 goat anti-Rabbit IgG antibody \times 200 を用い免疫組織学的な検討を行った。

10) 中枢神経障害を合併したシェーグレン症候群患者血清中の抗神経抗体の検索

シェーグレン症候群を合併し球後視神経炎の既往と頸髄に long cord lesion ではない髄内病変を認め、臨床的に視神経脊髓型多発性硬化症 (OSMS) と診断された抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体陰性の 41 歳女性患者の血清を用い二次元免疫プロットを施行した。

11) 通常型多発性硬化症 (CMS) 特異的自己抗体の検出

CMS に特異的な自己抗体を検出するため、12名の健常者と12名の CMS 患者の血清中の抗神経抗体を二次元免疫プロットにより検出した。このうち健常者の血清には反応せず CMS 患者の血清のみに反応したスポットを抽出し質量分析を施行した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針 (H20年厚生労働省告示第415号) に従い、被検者の人権に十分留意しながら行った。また患者血清の自己抗体の検索については、岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理委員会に提出し承認を得た。動物実験についても、同様に岐阜大学大学院医学系研究科動物実験委員会に提出し承認を得た。

C. 研究結果

I: 抗Hsp60抗体

1) ELISA 法による抗 Hsp60 抗体価の測定

抗 Hsp60 抗体価を各種神経疾患患者及び健常者合わせて 215 名に対し測定した(図 3)。

結果、多発性脳梗塞(n=18, mean±SD:

31.9±36.0 ng/mL)、アルツハイマー型認知症

(n=16, 25.9±14.6 ng/mL)、筋萎縮性側索硬化

症(n=13, mean±SD: 38.9±33.5 ng/mL)、パーキン

ソン病(n=22, 26.2±18.1 ng/mL)、脊髄小脳変

性症(n=18, 25.9±19.8 ng/mL)、ギランバレー症

候群(n=11, 22.1±20.1 ng/mL)、髄膜炎(n=13,

23.6±13.2 ng/mL)、多発性硬化症(n=26,

33.2±23.2 ng/mL)、視神経脊髄炎(n=11,

20.7±12.1 ng/mL)、CNS ループス(n=15,

51.1±83.8 ng/mL)、神経症状を合併したシェー

グレン症候群(n=17, 46.0±60.4 ng/mL)および

健常者(n=35, 22.7±13.6 ng/mL)となった。群間

比較では明らかな有意差は認められなかった

が、全身性自己免疫疾患患者(CNS ループス、

神経症状を合併したシェーグレン症候群)群で

高値の傾向を示した。

次に、抗 Hsp60 抗体価を神経症状を合併した

全身性自己免疫疾患患者群(CNS ループス

12名、神経症状を合併したシェーグレン症候

群 13名)25名で脳白質病変の有無に分け

検討した(図 4)。脳白質病変を Fazekas'

rating scale を用い評価し、同スケールの

DWMH が grade2, 3 ないし PVH が grade3 に

該当する患者群を'高度の脳白質病変を有

する群'と定義した。結果、高度の脳白質病

変を有する群(n=11, mean±SD: 70.8±93.3

ng/mL)が高度脳白質病変を有さない群

(n=14, 19.5±9.75 ng/mL)と比較し有意に抗体

価の上昇を認めた(P=0.035)。

さらに疾患の範囲を広げ年齢・性別をマッチ

させた高血圧・糖尿病・高脂血症といった既知

の動脈硬化のリスクファクターを有さない 109 名

の神経疾患患者で同様に抗 Hsp60 抗体価を

比較検討した(図 5)。結果、高度の脳白質

病変を有する群(n=32, mean±SD: 47.1±60.4

ng/mL)が高度脳白質病変を有さない群

(n=77, 26.1±28.6 ng/mL)と比較し有意に抗体価の上昇を認めた(P=0.039)。

図 3) 健常者ならびに各種神経疾患別抗

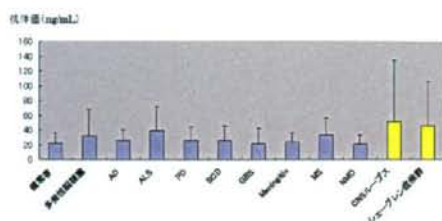


図 4) 抗 Hsp60 抗体価と脳白質病変の検討 (神経症状を合併した全身性自己免疫疾患患者 25 名)

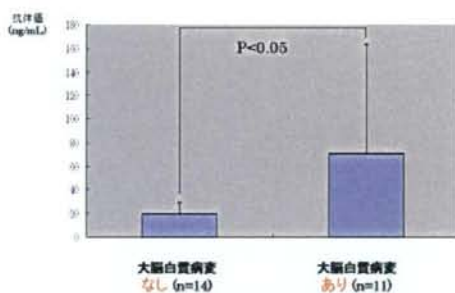
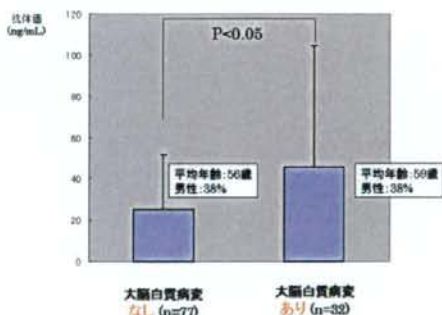


図 5) 抗 Hsp60 抗体価と脳白質病変の検討 (高血圧・糖尿病・高脂血症の無い神経疾患患者 109 名)



2) ストレス負荷後のマウス大脳血管内皮における Hsp60 抗原の誘導

LPS 尾静注翌日の Hsp60 の発現部位を免疫染色にて確認した。結果、大脳細動脈～毛細血管レベルの血管内皮において Hsp60 の発現が確認された(図 6)。一方、ストレスを負荷していない対照マウスでは発現は確認されなかった。

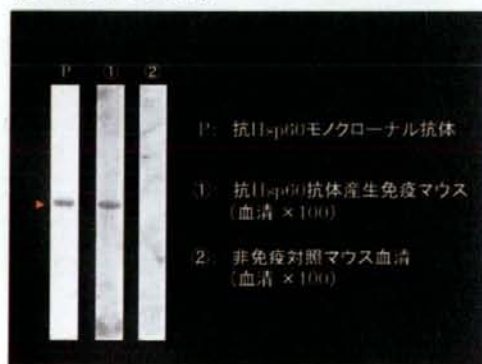
図 6) ストレス負荷(LPS 尾静注)後のマウス大脳血管内皮における Hsp60 抗原の発現



3) 免疫マウスにおける血清中抗 Hsp60 抗体産生の確認

最終免疫後に採血した血清を一次抗体としてマウス Hsp60 リコンビナント蛋白(StressGen Biotechnologies Corp.)をサンプルとしてウエスタンブロットを行い抗 Hsp60 抗体の産生を確認した(図 7)。一方、非免疫対照マウスにおいては確認できなかった。

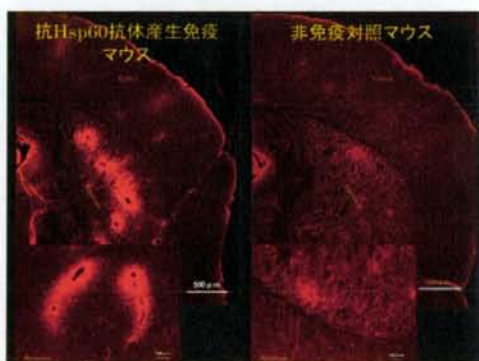
図 7) 抗 Hsp60 抗体産生の確認 (ウエスタンブロット)



4) 抗 Hsp60 抗体産生免疫マウス大脳の病理組織学的検討(図 8)

抗 Hsp60 抗体産生免疫マウスの大脳切片を用い病理組織学的検討を行った。結果、線条体の血管を中心とした最小血管周囲に血液脳関門の破綻を示す著明なエバンスブルーの漏出所見を認めた。一方、対照マウスでは著明なエバンスブルーの漏出所見は認められなかった。

図 8) 抗 Hsp60 抗体産生免疫マウスの大脳切片を用いた病理組織学的検討



II:抗神経抗体の認識抗原の解析

1) CNSループス

昨年度、CNS ループスに特異的な自己抗体を検出するため、12名の健常者と6名のCNS ループス患者の血清中の抗神経抗体を二次元免疫プロットにより検出した。そのうち健常者の血清に反応せず CNS ループス患者の血清に反応した9つの抗体反応スポットに対し、質量分析を行った結果、Stress-70 protein、Rab GDP dissociation inhibitor alpha (α GDI)、Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha、L-lactate dehydrogenase B chain、F-actin-capping protein subunit alpha-2、Rab GDP dissociation inhibitor beta 以上合計6種類の自己抗体認識抗原蛋白を同定した。同定した6種類の蛋白のうちのRab GDP dissociation inhibitor alpha (α GDI)は、神経シナプスに局在し小胞輸送に必要なG蛋白Rab3aのリサイクリングに関与することが知られており、抗 α GDI抗体が神経シナプスにおける伝達障害に関与する可能性を考慮し、同抗体の特異性につき検討した。

● 抗 α GDI抗体の特異性に関する免疫組織学的検討

抗 α GDI抗体陽性の患者血清を用いて免疫組織学的に検討を行った(図9)。結果、ラット大脳の神経細胞に対する反応性を示した。とりわけ海馬の顆粒細胞および錐体細胞で強い反応性が確認された(図10)。

図9)抗 α GDI抗体陽性患者血清を用いた免疫染色

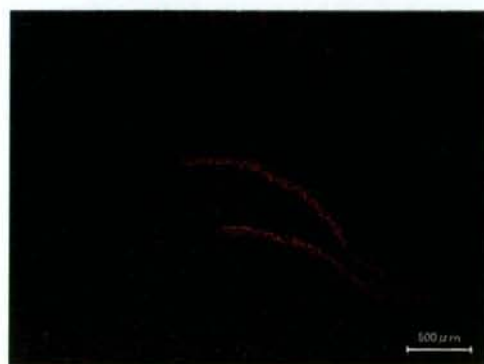
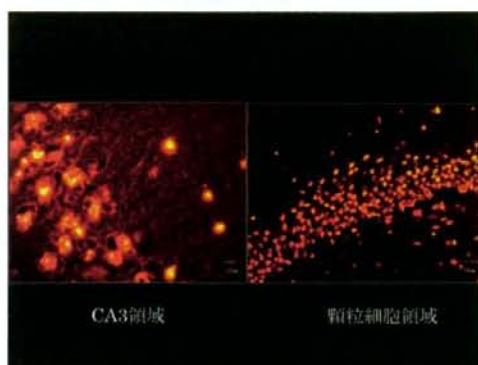


図10)抗GDI抗体陽性患者血清を用いた免疫染色(海馬領域)



2) シェーグレン症候群と抗神経抗体

当科にてこれまで経験した中枢神経障害を合併したシェーグレン症候群患者15例を表にまとめた(表1)。このうちの5例で抗アクアポリン4抗体が陽性をしめた(残りの10例は2例が陰性、7例が未測定、1例が検査中)。

さらにこの中の抗アクアポリン4抗体陰性のOSMS患者につき二次元免疫プロットを行い、そのうちの11のスポットにつき質量分析を施行した(図11)。結果、Dynamin-1 (DYN1)、Leucine-rich repeat-containing protein 48 (LRC48)、Synapsin-2 (SYN2)、Excitatory amino acid transporter 5 (EAA5)、Methionine synthase (METH)、Serum albumin (ALBU)、Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT)以上9つの認識抗原蛋白を同定した(表2)。

表1)当科における中枢神経障害を合併したシェーグレン症候群患者

症例	年齢	性別	臨床診断名	抗AQP4抗体
1	59	F	Encephalitis	検査中
2	28	M	Meningitis	未測定
3	78	M	MND	未測定
4	35	F	Myelitis	陽性
5	55	F	Myelitis	陽性
6	62	M	Myelitis	未測定
7	63	M	Myelitis	陽性
8	72	M	Myelitis	未測定
9	79	F	Myelitis	未測定
10	30	F	NMO	陽性
11	39	M	NMO	陽性
12	50	F	NMO	陽性
13	41	F	OSMS	陽性
14	71	M	PML	未測定
15	77	F	PSP	未測定

■ 二次元免疫プロット実行例

図 11) 抗アクアポリン4抗体陰性視神経脊髄型多発性硬化症患者の血清を用いた二次元免疫プロット



表 2) 質量分析の結果

Spot number	Protein name
1	Dynammin-1
2	Leucine-rich repeat-containing protein 48
3	Synapsin-2
4	Excitatory amino acid transporter 5
5	Methionine synthase
6	Serum albumin
7	検査中
8	検査中
9	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase
10	検査中
11	検査中

Spot number は図 11 の spot number に対応

3) 多発性硬化症と抗神経抗体

a) 抗 GRP75 (Stress-70 protein) 抗体

通常型多発性硬化症 (CMS) に特異的な自己抗体を検出するため、12名の健常者と12名の CMS 患者の血清中の抗神経抗体を二次元免疫プロットにより検出した。そのうち健常者の血清に反応せず CMS 患者の血清に反応したスポットは合計 35 個であった。この中で PH 5.8, 分子量 67Kd に位置するスポットは、最も多い 12 名中 5 名の CMS 患者の血清で反応が認められた。このスポット (図 12) につき質量分析を施行した結果、Stress-70 protein (GRP75; 75 kDa glucose-regulated protein) を同定した。次に、この抗 GRP75 抗体を有する 5 名の臨床的特徴を検討した。病期に関しては 4 名が再発期で 1 名が寛解期であった。また 3 名がオリゴクローナルバンドが陽性であった (表 3)。

図 12) 抗 GRP75 抗体陽性 CMS 患者の血清を用いた二次元免疫プロット

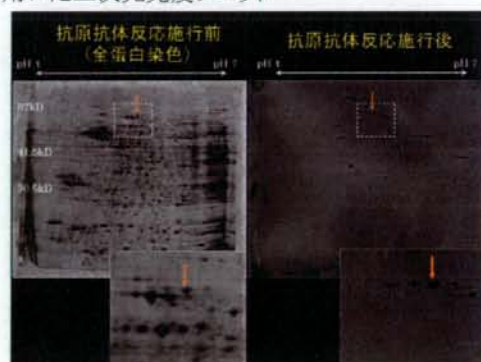


表 3) 抗 GRP75 抗体陽性患者を含む CMS 患者 12 名の臨床所見 (橙: 抗体陽性患者)

年齢・性別	罹病期間	血清採取時の状態	血清採取時の治療	OCBの有無
34 F	5年	再発	なし	+
34 M	12年	再発	なし	+
40 F	5年	再発	IFNβ 1b	+
57 F	11年	再発	なし	-
38 F	5年	寛解	PSL	-
48 F	13年	再発	なし	-
57 F	2ヶ月	再発	なし	-
31 M	11年	再発	IFNβ 1b, PSL	-
40 M	2ヶ月	再発	PSL	-
54 F	3年	寛解	なし	+
38 M	9ヶ月	寛解	なし	-
65 M	38年	寛解	なし	-

b) 抗 Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1) 抗体

CMS 患者の血清中より解糖系酵素の一つである PGAM 1 に対する自己抗体を検出した(図 13)。同抗体の陽性率をリコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロットを行い検討した(図 14)。対象患者として 12 名の CMS 患者 [男:女=4:8; 年齢 31-65 歳; 平均年齢 45 歳], 10 名の視神経脊髄炎(NMO)患者 [男:女=2:8; 年齢 26-79 歳; 平均年齢 48 歳], 12 名の多発性脳梗塞患者 [男:女=4:8; 年齢 53-82 歳; 平均年齢 68 歳], 12 名の感染性髄膜脳炎患者 [男:女=10:2; 年齢 16-68 歳; 平均年齢 46 歳], 12 名の健常者 [男:女=5:7; 年齢 25-67 歳; 平均年齢 37 歳]。全ての CMS 患者は 2001 年 McDonald らの診断基準を、全ての NMO 患者は 2006 年の Wingerchuk の診断基準を満たす症例とした。結果、各疾患毎の抗体陽性率は CMS が 92%、NMO が 90%、多発性脳梗塞が 33%、感染性髄膜脳炎が 33%、健常者が 33%となり、多発性脳梗塞、感染性髄膜脳炎、健常者と比較し CMS, NMO 患者で抗 PGAM1 抗体が高率に陽性になることを確認した(図 15)。

図 13) 抗 PGAM1 抗体陽性 CMS 患者の血清を用いた二次元免疫ブロット

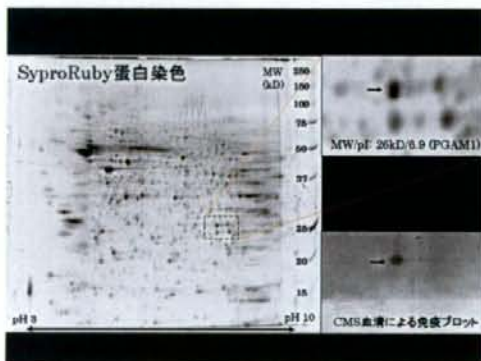
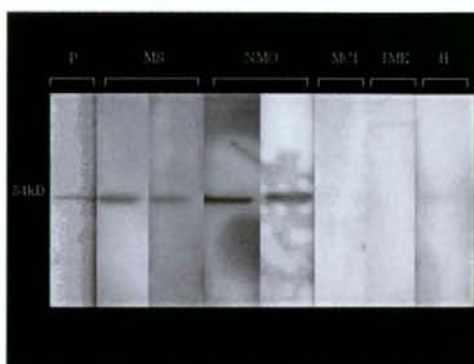
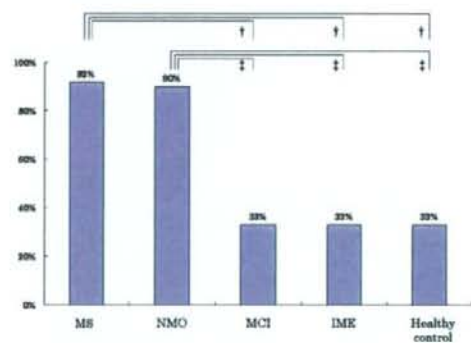


図 14) ヒト PGAM1 リコンビナント抗原を用いたウエスタンブロット



P: 抗 PGAM1 モノクローナル抗体 (×300)
MS: CMS 患者血清 (×1500)
NMO: NMO 患者血清 (×1500)
MCI: 多発性脳梗塞患者血清 (×1500)
IME: 感染性髄膜脳炎患者血清 (×1500)
H: 健常者血清 (×1500)

図 15) 各種神経疾患別抗 PGAM1 抗体陽性率



MCI: 多発性脳梗塞
IME: 感染性髄膜脳炎
H: 健常者
† $P=0.003$, ‡ $P=0.007$

D. 考察

本年度、我々は3つの成果を収めることができた。1つ目として昨年度指摘した抗 Hsp60 抗体と大脳白質病変との関連性につき、免疫動物の作製を行い組織学的に検討したことである。その結果、Hsp60 が誘導する免疫応答が大脳微小血管障害をもたらすことにより大脳白質病変と関連する可能性を指摘した。大脳白質病変に関しては、これまでに認知機能障害や運動機能障害との関連性を指摘する報告を多数認め、大脳白質病変の進展を未然に予防することが高齢者の自立と寝たきりの予防、介護者の負担軽減につながると期待される。今回の成果により大脳白質障害の予防的治療法のターゲットとして Hsp60 を介する免疫応答をコントロールすることが1つの候補としてあげられる。ストレス下に Hsp60 が大脳微小血管内皮に過剰に発現することを抑制することによりこの Hsp60 を介する免疫応答を軽減できる可能性が考えられる。具体的には PPAR γ アゴニストである Thiazolidinediones が HUVEC に対し Hsp60 の誘導とアポトーシスを阻害するとの報告があり、今後、今回作製したモデルマウスを用いてその効果を確認する必要があると考えられた。

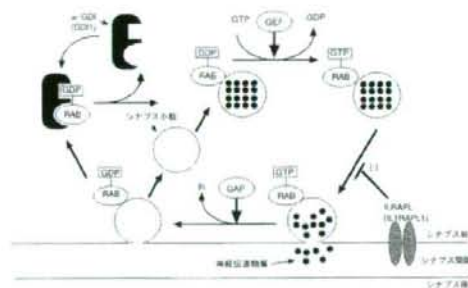
2つ目は昨年度2名の psychosis を呈した CNS ループス患者の血清中に抗 α GDI 抗体を検出したが、その抗体陽性患者の血清を用いて免疫組織学的に検討を行ったことである。 α GDI は、神経シナプスに局在し小胞輸送に必要な G 蛋白 Rab3a のリサイクリングに関与することが知られている (Pfeffer SR, et al. J Biol Chem 1995, 図 16 参照)。さらに α GDI をコードする GDI-1 遺伝子は、精神発達遅滞を唯一の臨床症状とする非特異的 X 連鎖精神遅滞の原因遺伝子の1つであり、そのノックアウトマウスでは、短期記憶障害、攻撃性の低下、社会行動の変化を示すことが知られている (D'Adamo P, et al. Nature Genet 1998)。これらの報告を踏まえ抗 α GDI 抗体が神経シナプスにおける伝達障害に関与する可能性を考慮し、同抗体の特異性につき免疫組織学的に検討した。まず抗 α GDI 抗体陽性の患者血清を用いて免疫

組織学的に検討を行った。結果、ラット大脳の神経細胞に反応性を示した。とりわけ海馬の顆粒細胞および錐体細胞で強い反応性が確認された。患者血清中の自己抗体が α GDI を認識しているかに関しては、今後抗 α GDI モノクローナル抗体を用いた検討が必要と考えられるが、mRNA レベルにおいて α GDI が海馬や piriform cortex に高発現しているという過去の報告もあり可能性はあるものと考えられた。今後の検討課題として症例数を増やして抗体の特異性を確認すること、実際に抗 α GDI 抗体がシナプスにおける神経伝達障害をもたらすか細胞生物学的な検討を行う必要があると考え、現在海馬の急性スライス標本を用いた電気生理学的検討を行っている。

3つめの成果として、CMS 患者より比較的特異性が高いと思われる抗 GRP75 抗体と抗 PGAM1 抗体を検出したことである。抗 GRP75 抗体に関しては12例の健常者では検出されず12例中5例の CMS 患者で検出された。NMO に関して、近年抗 AQP4 抗体との関連性が指摘されており、診断項目の1つにもなっている。また、同抗体陽性患者における共通した臨床像や画像所見が注目されるだけでなく、治療に関してもステロイドの少量維持療法やアザチオプリンなどの免疫抑制薬の併用の必要性、免疫吸着療法の有効性などの報告もなされている。同抗体に関しては12例の健常者では検出されず12例中5例の CMS 患者で検出された。GRP75 はストレス蛋白の1つである Heat shock protein 70 (HSP70) family の1つで、MS と HSP70 との関連性を指摘する報告として Mycko らは HSP70 が MBP などの髄鞘蛋白と結合して、抗原提示細胞に作用し、抗原性を高める働きがあるとしている (Mycko MP et al, 2006)。また CMS 患者の髄液中において HSP70 family に対する IgG 抗体が上昇し、疾患活動性とも相関するといった報告もある (Chiba S et al, 2006)。1つの仮説ではあるが、何らかのストレス刺激により通常はオリゴデンドログリアなどの細胞質やミトコンドリア内に存在する GRP75 が細胞外に分泌され一部は MBP などのミエリン蛋白と結合し、

CMS の再発に関与するとともに血中において抗体産生が引き起こされる可能性が推測された。抗 GRP75 抗体が CMS の病態にどのように関与しているのかは、今後その他疾患を含めた多数例での検討が必要と考えられる。また今回、同じく CMS 患者の血清より抗 PGAMI 抗体を検出した。同自己抗体に関してはヒトリコンビナント蛋白を用いた多数例の検討の結果、CMS のみでなく NMO でも高率に陽性になった。この結果は、両疾患の背景に存在する共通した病態メカニズムが抗 PGAMI 抗体の産生に係っている可能性を示唆するものと考えられる。しかし今回の検討では血清抗 PGAMI 抗体は、健常者やその他神経疾患患者においても約 3 割が陽性となるため、今後 CMS および NMO の補助的診断ツールとするには抗体価の定量的な比較による cut off 値の設定が必要と考えられた。

図 16) Rab 蛋白質とシナプスにおける小胞融合とリサイクルの概略図



(和田, 神経進歩 2006)

E. 結論

- 1、Hsp60 が誘導する免疫現象は脳微小血管内皮細胞障害をもたらし、脳白質病変の形成に関与する可能性がある。
- 2、抗 α GDI 抗体は CNS ループス患者にみられる psychosis と関連する可能性がある。
- 3、抗 GRP75 抗体は CMS と、抗 PGAMI 抗体は CMS と NMO において高率に陽性となり、これら疾患の診断マーカーとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kimura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Takahashi K, Takemura M, Saito K, Seishima M, Inuzuka T. Proteomic analysis of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus patient with white matter hyperintensities on brain MRI. *Lupus* 2008;17:16-20.
- Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Nakajima H, Ichiyama T, Inuzuka T: Longitudinal analysis of cytokines and chemokines in the cerebrospinal fluid of a patient with neuro-Sweet disease presenting with recurrent encephal meningitis. *Internal Medicine* 2008;47:135-141
- Hayashi Y, Kimura A, Kato S, Koumura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Sundén Y, Orba Y, Sawa H, Takahashi H, Inuzuka T: Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjögren syndrome. *J Neurol Sci.* 2008;268:195-198.
- Hayashi Y, Sakurai T, Kimura A, Ikeda T, Matsuyama Z, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Hosoe H, Takahashi H, Inuzuka T: Selective cauda equine hypertrophy with idiopathic inflammation. *Muscle Nerve.* 2008;38:1065-1069.
- 櫻井岳郎, 田中優司, 香村彰宏, 林 祐一, 木村暁夫, 保住 功, 米田 誠, 犬塚 貴: Creutzfeldt-Jakob病と類似の臨床経過を示したBasedow病と伴った橋本脳症の1例 *BRAIN and NERVE* 2008;60:559-565.

- ・ 鈴木真理子、林 祐一、木村暁夫、永澤 守、香村彰宏、櫻井岳郎、田中優司、保住 功、犬塚 貴:介護従事者にみられた水痘 脊髄炎 BRAIN and NERVE 2008;60:79-83.

2. 学会発表

- ・ 第49回日本神経学会総会 (2008年5月16日、横浜) CNSループス患者におけるプロテオミクス解析を用いた自己抗体認識抗原の同定; 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
- ・ 第20回日本神経免疫学会学術集会 (2008年4月18日、新潟) プロテオミクス解析を用いた中枢神経ループス特異的抗神経抗体の検索; 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
- ・ 第21回日本神経免疫学会学術集会 (2008年3月13日、大阪) 多発性硬化症患者における抗Phosphoglycerate mutase 1抗体の特異性に関する検討; 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
- ・ American Academy of Neurology 61st Annual Meeting (2009.4.29, Seattle, USA) Identification of Antibodies Against Brain Antigen in Sera of Patients with Neuropsychiatric Systemic lupus erythematosus. Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Takahashi K, Takemura M, Saito K, Seishima M, Inuzuka T.	Proteomic analysis of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus patient with white matter hyperintensities on brain MRI.	Lupus	17	16-20	2008
Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Nakajima H, Ichiyama T, Inuzuka T	Longitudinal analysis of cytokines and chemokines in the cerebrospinal fluid of a patient with neuro-Sweet disease presenting with recurrent encephal meningitis.	Internal Medicine	47	135-141	2008
Hayashi Y, Kimura A, Kato S, Koumura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Sunden Y, Orba Y, Sawa H, Takahashi H, Inuzuka T	Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjögren syndrome.	J Neurol Sci.	268	195-198	2008
Hayashi Y, Sakurai T, Kimura A, Ikeda T, Matsuyama Z, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Hosoe H, Takahashi H, Inuzuka T	Selective cauda equina hypertrophy with idiopathic inflammation	Muscle Nerve	38	1065-1069	2008
櫻井岳郎, 田中優司, 香村彰宏, 林 祐一, 木村暁夫, 保住 功, 米田 誠, 犬塚 貴	Creutzfeldt-Jakob病と類似の臨床経過を示したBasedow病と伴った橋本脳症の1例	BRAIN and NERVE	60	559-565	2008
鈴木真理子, 林 祐一, 木村暁夫, 永澤 守, 香村彰宏, 櫻井岳郎, 田中優司, 保住 功, 犬塚 貴	介護従事者にみられた水痘脊髄炎	BRAIN and NERVE	60	79-83	2008

Ⅲ 研究成果の刊行物・別刷