

2008J3025B

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18年度～20年度 総合研究報告書

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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成21（2009）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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	-----	19
--------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	21
------------------	-------	----

I 総合研究報告

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

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。

我々は、3年間の研究期間内に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。以下にその概要を示した。

【抗 Hsp60 抗体と大脳白質病変】

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いる。今回我々は、ICR マウスに対しストレス負荷としてその尾静脈に LPS を注射することにより大脳微小血管内皮にも同様に Hsp60 が発現することを免疫組織学的に確認した。Hsp60 が発現した大脳微小血管内皮細胞に対し、抗 Hsp60 抗体が抗血管内皮細胞抗体として障害を与える可能性を考慮し、抗 Hsp60 抗体の特異性につき大脳白質病変に焦点をあて検討した。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。これらの結果から Hsp60 が誘導する免疫現象は大脳微小血管内皮細胞障害をもたらし、大脳白質病変の形成に関与する可能性が示唆された。

【抗 α GDI 抗体と CNS ループス】

CNS ループス患者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ブロットにより検出した。このうち健常者には反応せず CNS ループス患者の血清に反応するスポットを抽出し質量分析を施行した。結果、6 種類の抗原蛋白を同定した。この中の1つが Rab GDP dissociation inhibitor alpha (α GDI)であった。 α GDI に関しては、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、さらに α GDI をコードする GDI-1 遺伝子は非特異的 X 連鎖精神遅滞の原因遺伝子の1つで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報告されている。そこでヒト α GDI 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 CNS ループス患者、健常者、感染性髄膜脳炎患者それぞれ 12 名ずつの血清中の自己抗体を検索した。結果 2 名の精神症状を呈した CNS ループス患者の血清中のみ同抗体が検出された。次に同抗体を有する患者血清を用いてラット大脳凍結切片に対し免疫組織学的な検討を行った。結果、ラット大脳の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と錐体細胞において著明な反応性が確認された。 α GDI の神経シナプスにおける機能および今回得られた免疫組織学的な検討の結果より抗 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何らかの関連性がある可能性が考えられた。

【抗 GRP75 抗体および抗 PGAM1 抗体と通常型多発性硬化症】

通常型多発性硬化症 (CMS) 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、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 を同定した。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 (NMO) 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。

【中枢神経障害を合併したシェーグレン症候群患者における抗神経抗体】

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、Dynammin-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。

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。SLEの診断においては1997年アメリカリウマチ協会臨床診断基準を満たす患者とし、シェーグレン症候群の診断においては1999年厚生省改訂基準を満たす患者とした。

二次元免疫プロットに関しては、一次元目として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行った。その後二次元目として12.5%のpolyacrylamide gelによるSDS-PAGEを行い、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CBB染色もしくは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) 広範な白質病変を有する CNS ループス患者における検討

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・脳幹に拡がる広範な白質病変を呈した69歳 CNS ループス男性患者の血清を用い二次元免疫プロットにより抗神経抗体を検出した。その後、その抗体反応スポットを抽出し質量分析を行い抗体認識抗原蛋白を同定した。

4) 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。

5) 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 whitematter 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。

6) 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 grade 2, 3 ないし PVH が grade 3 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。

7) 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

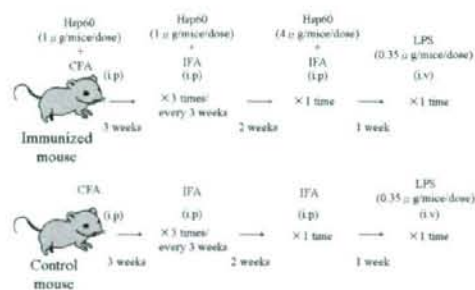
大脳血管内皮においてストレス負荷後に Hsp60 抗原が発現されることを確認するために、ストレス負荷として LPS 0.35 μ g/mice/dose を 8 週齢の雄 ICR マウスの尾静脈に注射した後、大脳凍結切片を作成した。その後一次抗体として Rabbit anti-mouse Hsp60 monoclonal antibody (EPT) \times 100 を、二次抗体として Alexa Fluor 546 goat anti-Rabbit IgG antibody \times 200 を用い免疫染色を行った。

8) 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。

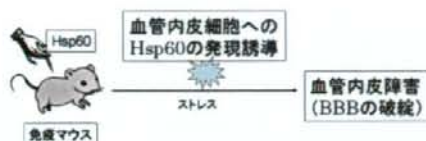
図 1) 免疫マウスの作製と血管内皮への Hsp60 抗原の誘導



9) マウス大脳切片の作製と血液脳関門破綻の評価 (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%ショ糖にて 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、BBBの機能を評価

10) CNS ループス特異的自己抗体の検出

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。このうち健常者の血清には反応せずCNS ループス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。

11) 抗 α GDI抗体の検出

Human Rab GDP dissociation inhibitor alpha (α GDI) recombinant protein (Abnova, Taipei, Taiwan)を用い、CNS ループス患者、感染性髄膜脳炎患者、健常者それぞれ12名ずつの血清を一次抗体としてウエスタンブロットを施行し、抗体の有無を検討した。

12) 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ラットの大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。

13) 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出

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、臨床的に視神経脊髄型多発性硬化症(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。

14) 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出については、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

【抗Hsp60抗体】

1) 抗 Hsp60 抗体 の 同 定

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・脳幹に広がる広範な白質病変(図3)を呈した CNS ループスの男性患者を経験した。その血清中にラット大脳ホモジネートと反応する9つの抗体反応スポットを二次元免疫プロット法にて確認した(図4)。これらスポットのうち4種類の認識抗原蛋白を同定した。それらは Beta-actin, Alpha-internexin, Heat-shock protein 60 (Hsp60), GFAP であった(表1)。

この中の Hsp60(図5)に関しては、ミトコンドリアのシャペロン蛋白で、ミスフォールド・変性蛋白の除去に関与していることが知られている。一方、ストレス下に血管内皮細胞膜表面に発現することも知られており抗 Hsp60 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、同抗体価と大脳深部白質病変につき検討した。

図3) 頭部 MRI T2WI



図4) 二次元免疫プロット法

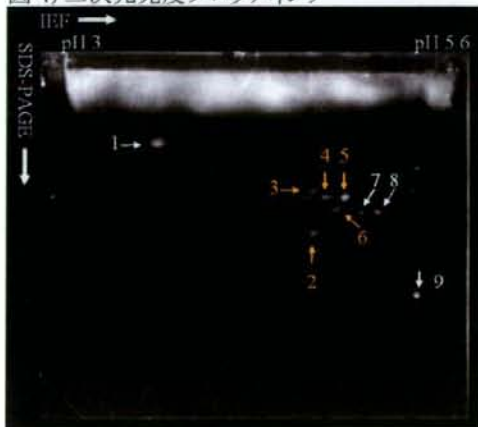


表1) 質量分析の結果

Spot Num	protein name	score	peptides	Coverage %	M.W. (kDa)/pI	Theoretical M.W./pI
2	Beta-actin	421	16	41	46K/5.15	42K/5.29
3	Alpha-Inx	203	5	12	63K/5.15	56K/5.20
4	Hsp 60	112	3	6	57K/5.25	61K/5.91
5	Hsp 60	112	3	8	57K/5.4	61K/5.91
6	GFAP	113	2	2	53K/5.3	50K/5.35

Spot number は図2の spot number に対応

図5) Hsp60 アミノ酸配列

```

1 MLRLPTVLRQ MRPVSRALAP HLTRAYAKDV KFGADARALM LQGVDLLADA
51 VAVTMGPKGR TVIIHQSWGS PKVTKDGVTV AKSIDLKDKY KNIGAKILVGD
101 VANNTNFEAGDGTITATVLABSIAKEGFEK ISKGANPVEI RRGVMLAVDA
151 VIAELKKQSK PVTTPPELAQ VATISANGDK DIGNUSDAMKKVGRKGVIT
201 VKDGKTLNDE LEIHGEMKFD RGYISPYFIN TSKGQKCEPQ DAYVLLSEK
251 ISSVQSVPA LEIANHRKRP LVIAEDVDG EALSTLVNLR LKVGQLQVAV
301 KAPGFGDNRK NQDKDMALAT GGAVFGEELG NLNLEDVQAH DLGKVGVEIV
351 TKDDAMLLKG KGDKAHIEKR IQEITEQLDI TTSEYEKELI NERLAKLSDG
401 VAVLKVGSTG DVEVNEKKDR VTDALNATRA AVEEGIVLGG GCALLRCIPA
451 LDLSKPNANED QKIGIEIKR ALKIPAMTIA KNAGYFGSLIYKILQSSSE
501 VGYDAMLGDF VNMVEKGHID PTKVVRTALL DAAGVASLLT TAEAVVTEIP
551 KEEKDPGMGA MGGMGGMGG GMF
    
```

質量分析の結果、一致したスポットを赤字とアンダーラインにて示す

2) 抗 Hsp60 抗体と大脳深部白質病変

i) 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6)。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 名で大脳白質病変の有無に分けて検討した(図 7)。大脳白質病変を 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'高度の大脳白質病変を有する群'と定義した。結果、高度の大脳白質病変を有する群(n=11, mean±SD: 70.8±93.3 ng/mL)が高度大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 8)。結果、高度の大脳白質病変を有する群(n=32, mean±SD: 47.1±60.4 ng/mL)が高度大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 6) 健常者ならびに各種神経疾患別抗 Hsp60 抗体価(n=215)

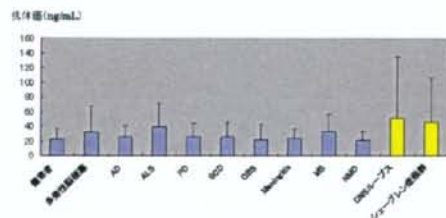


図 7) 抗 Hsp60 抗体価と大脳白質病変の検討 (神経症状を合併した全身性自己免疫疾患患者 25 名)

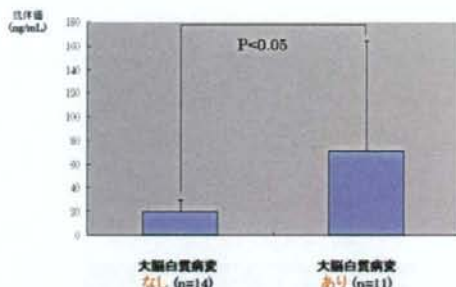
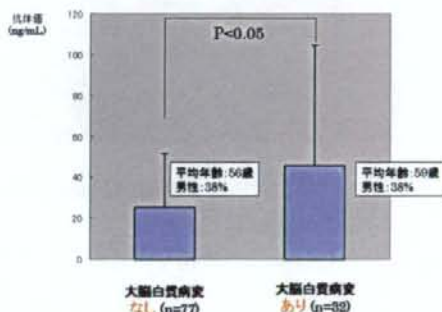


図 8) 抗 Hsp60 抗体価と大脳白質病変の検討 (高血圧・糖尿病・高脂血症の無い神経疾患患者 109 名)



ii) 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 9)。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。

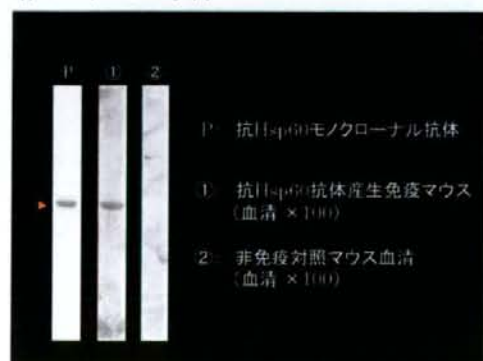
図 9) ストレス負荷(LPS 尾静注)後のマウス大脳血管内皮における Hsp60 抗原の発現



iii) 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 10)。一方、非免疫対照マウスにおいては確認できなかった。

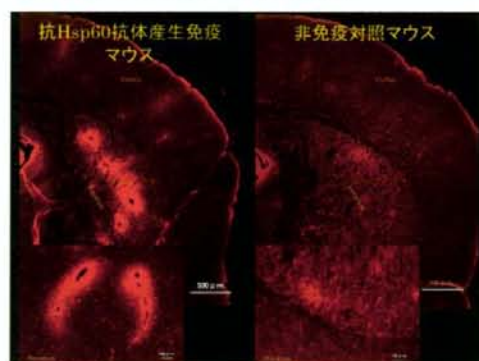
図 10) 抗 Hsp60 抗体産生の確認(ウエスタンブロット)



iv) 抗 Hsp60 抗体産生免疫マウス大脳の病理組織学的検討(図 11)

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 11) 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

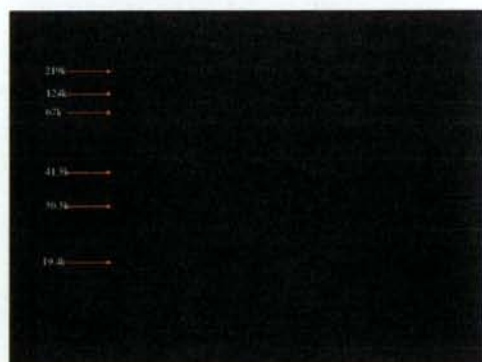


【抗 α GDI 抗体】

i) 抗 α GDI-1 抗体の同定

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ブロットにより検出した。一人あたりの抗体反応スポット数はCNSループス患者で約6~12個、健常者で約2~38個であった。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抗体反応スポット数は9個であった(図12)。これらのスポットに対する質量分析の結果、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(表2)

図12) 健常者にはなくCNSループス患者のみに認められたスポット



(表2) 質量分析の結果

Spot number	Protein name	Molecular weight	Corrected %	Calculated M.R.D. (pI)
1	Stress-70 protein	616	22	71007.5.91
2	Stress-70 protein	30	2	71007.5.91
3	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	171	10	5102.13.00
4	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	363	19	0001.06.17
5	L-lactate dehydrogenase B chain	302	29	3087.13.70
6	F-actin capping protein subunit alpha-2	83	6	0111.05.77
7	Rab GDP dissociation inhibitor beta	137	10	5103.5.93
8	Not identified	-	-	-
9	Not identified	-	-	-

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。

ii) ヒト α GDI リコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロット

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。CNSループス患者、感染性髄膜炎患者、健常者それぞれ12名ずつの血清を一次抗体としてウエスタンブロットを施行した。結果、2名のCNSループス患者(表3)のみに同抗体を検出した(図13)。その2名の神経症状は1名がmyelopathyとpsychosisを呈し、残りの1名がpsychosisを呈した。

図13) ヒト α GDI リコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロット



表 3) CNS ループス対象患者の神経所見
(アメリカリウマチ学会全身性エリテマトー
デスの精神神経症状の分類による)

age/sex	neurological symptoms
31/F	aseptic meningitis
32/F	myelopathy, psychosis
22/M	psychosis
68/M	polyneuropathy, cognitive dysfunction, psychosis
61/F	movement disorder (chorea)
55/F	mood disorders (depressive), seizure disorders
58/F	mood disorders (depressive), headache
46/F	mood disorders (manic)
16/F	cerebrovascular disease, mood disorder
29/F	cerebrovascular disease, acute confusional state
63/F	cerebrovascular disease
42/F	mood disorders (depressive), headache

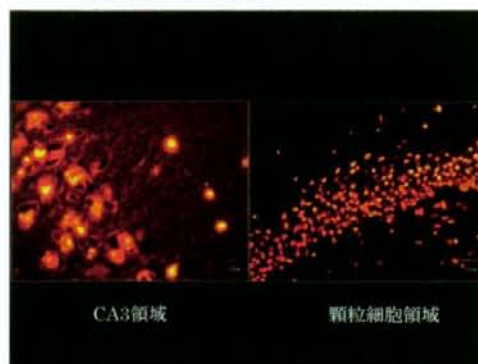
iii) 抗 α GDI 抗体の特異性に関する免疫組織学的検討

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14)。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15)。

図 14) 抗 α GDI 抗体陽性患者血清を用いた免疫染色



図 15) 抗 α GDI 抗体陽性患者血清を用いた免疫染色(海馬領域)



【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 16) 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 4)。

図 16) 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

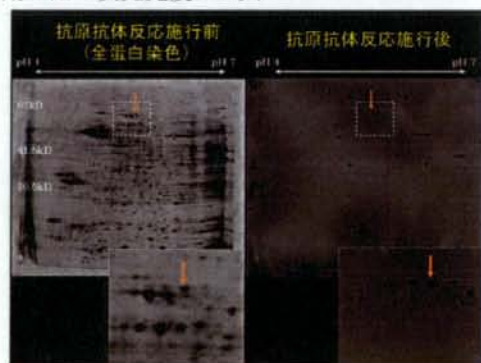


表 4) 抗 GRP75 抗体陽性患者を含む CMS 患者 12 名の臨床所見 (橙: 抗体陽性患者)

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 17)。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 18)。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 19)。

図 17) 抗 PGAM1 抗体陽性 CMS 患者の血清を用いた二次元免疫プロット

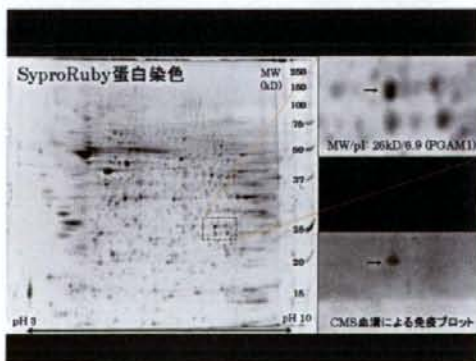
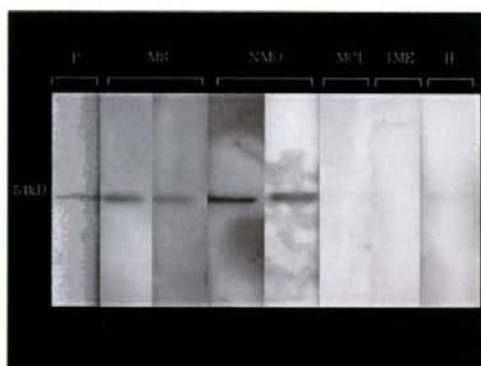
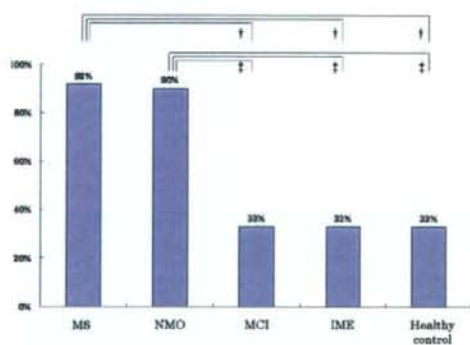


図 18) ヒト PGAM1 リコンビナント抗原を用いたウエスタンブロット



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: 感染性髄膜炎患者血清 (×1500)
 H: 健常者血清 (×1500)

図 19) 各種神経疾患別抗 PGAM1 抗体陽性率



MCI: 多発性脳梗塞

IME: 感染性髄膜炎

H: 健常者

† $P=0.003$, ‡ $P=0.007$

【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 5)。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 20)。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 つの認識抗原蛋白を同定した(表 6)。

表 6) 質量分析の結果

Spot number は図 11 の spot number に対応

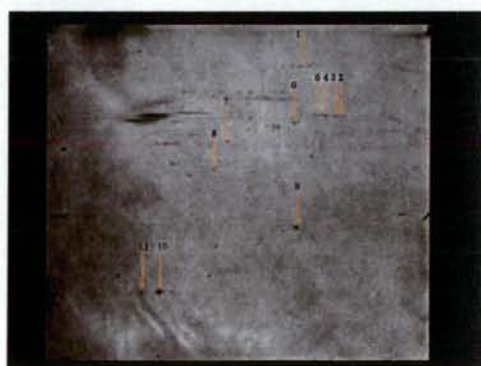
Spot number	Protein name
1	Dynamin-1
2	Leucine-rich repeat-containing protein 48
3	Synapsin-2
4	Excitatory amino acid transporter 5
5	Methionine synthase
6	Serum albumin
7	検査中
8	検査中
9	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase
10	検査中
11	検査中

表 5) 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	50	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	陰性
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施行例

図 20) 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



D. 考察

我々は、本研究期間内に二次元免疫ブ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た。そこから得られた結果のいくつかは、疾患もしくは病態との関連性が疑われるものであり、今後の臨床への応用が期待できる結果であった。

我々は、初年度に広範な大脳白質病変を呈した CNS ループス患者の血清中より抗 Hsp60 抗体を同定し報告した。Hsp60 に関しては、通常ミトコンドリア内のシャペロン蛋白として機能するが (Martin J et al, Science 1992)、同時に細胞膜に発現することが知られている。ストレス下においては血管内皮細胞膜にも同様に発現し抗血管内皮細胞抗体の重要なターゲットとなり、抗体が血管内皮細胞の apoptosis を誘導し (Schett G et al. J Clin Invest 1995; Dieudé M et al. Arthritis Rheum 2004; Alard JE et al. Autoimmun Rev 2007、**図 21** 参照)、血管炎の病態形成に係わっていると報告がある (Jamin et al, Arthritis Rheum, 2005)。これらの報告を背景として抗 Hsp60 抗体と大脳白質病変との関連性に着目し検討を進めた。ELISA や免疫動物の作製などによる検討を行った結果、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した報告を多数認め、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ことを期待される。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 アゴニストの 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。

これまでの CNS ループス患者における自己抗体に関する報告では、抗リボソーム P 抗体、抗 microtubule-associated protein 2 抗体、抗リン脂質抗体、抗 GFAP 抗体、抗血管内皮細胞抗体などの報告がある。また CNS ループス患者に存在する抗二本鎖 DNA 抗体が NMDA 型抗グルタミン酸受容体の一部 [NR2A (GluR ϵ 1) および NR2B (GluR ϵ 2)] と交叉反応性を示し、さらにはアポトーシス経路を介して神経細胞死をもたらすとする報告がある (DeGiorgio et al. Nature medicine 2001)。しかし、一方でこれらの抗体の特異性は確立していない。その理由の一つは CNS ループスの精神神経症状が極めて多様性に富んでいることがあげられる。そこで我々は、CNS ループス患者により特異的な抗神経抗体を検出するために健常対象者の血清を用い二次元免疫ブロットを行い、CNS ループス患者に特異的なスポットを抽出・解析し、さらに神経症状と比較検討した。その結果、ストレス蛋白、小胞輸送に関連する蛋白、ミトコンドリア代謝に関連する蛋白、解糖系酵素、細胞骨格に関連する蛋白の合計 6 種類の抗原蛋白を同定した。この中の 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 22** 参照)。 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ヒト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検討した。結果2名の CNS ループス患者に同抗体を検出した。この2名はともに幻覚を伴った psychosis を呈したことから、同抗体と CNS

ループスにみられる psychosis との関連性を疑い研究を行った。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。

多発性硬化症に関してはこれまで細胞性免疫との関連性が重要視されてきたが、最近 NMO 患者でアストロサイトおよびクモ膜下腔・脳室壁を縁取る細胞に水チャンネル分子として広く発現するアクアポリン 4 に対する自己抗体が高率に陽性になることが報告されている (Lennon VA et al., Lancet 2004)。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。一方、多発性硬化症における液性免疫の関与は病理学的にも示唆されており (Lucchinetti C et al., Ann Neurol 2000)、抗アクアポリン 4 抗体以外にも中枢神経組織に対する自己抗体を有する症例が存在すると考えられる。今回通常型多発性硬化症 (CMS) 患者を対象として自己抗体の検出を試みた。結果、比較的特異性が高いと思われる抗 GRP75 抗体を検出した。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 つの仮説として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る。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、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ピ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。

今回、中枢神経障害を合併したシェーグレン症候群患者において検討も行った。当科で経験したシェーグレン症候群を伴う脊髄炎患者 10 例中 6 例が抗アクアポリン 4 抗体陽性であり、NMO 患者にて高率にシェーグレン症候群などの全身性自己免疫疾患を合併し易いとするこれまでの報告に矛盾しない結果となった。この中の抗アクアポリン 4 抗体陰性の症例に対し、二次元免疫プロットを行った。計 11 個の強く反応する抗体反応スポットを検出し、この中の 7 個につき抗原蛋白を同定した。この中にはアミノ酸の輸送に関連する蛋白、小胞輸送に関連

する蛋白などが含まれ、現在これらの抗原蛋白の特異性につき検証中である。

図 21) Hsp60 が誘導する免疫現象

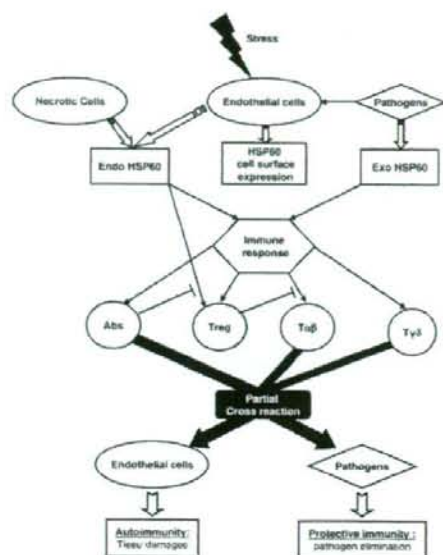
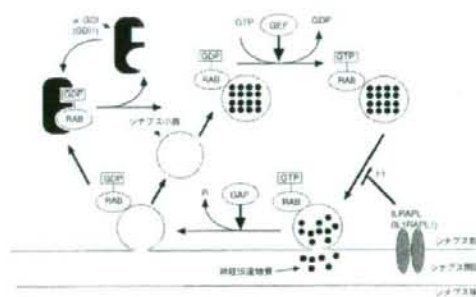


図 22) Rab 蛋白質とシナプスにおける小胞融合とリサイクルの概略図



(和田, 神経進歩 2006)

E. 結論

- 1、Hsp60 が誘導する免疫現象は大脳微小血管内皮細胞障害をもたらし、大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 PGAM1 抗体

は CMS と NMO において高率に陽性となり、これら疾患診断マーカーとなる可能性がある。

F. 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, 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.* 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.
- Kimura A, Sakurai T, Suzuki Y, Hayashi Y, Watanabe O, Arimura K, Takahashi Y, Hozumi I, Inuzuka T: Autoantibodies against Glutamate Receptor ϵ_2 -Subunit Detected in a Subgroup of Patients with Reversible Autoimmune Limbic Encephalitis. *Eur Neurol.* 2007;58:152-158.
- Nozaki H, Ikeuchi T, Kawakami A, Kimura A, Koide R, Tsuchiya M, Nakamura Y,