

200935073A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

プロテオーム解析を用いた高齢認知症患者における大脳白質病変と
抗血管内皮細胞抗体の関連性に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成22(2010)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

プロテオーム解析を用いた高齢認知症患者における大脳白質病変と
抗血管内皮細胞抗体の関連性に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成22(2010)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

プロテオーム解析を用いた高齢認知症患者における大脳白質病変と抗血管内皮細胞抗体の 関連性に関する研究	-----	1
木村暁夫		

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
--------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13
------------------	-------	----

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

プロテオーム解析を用いた高齢認知症患者における大脳白質病変と抗血管内皮細胞
抗体の関連性に関する研究

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

高齢者における認知症や運動機能障害による寝たきりの予防は介護・福祉上重要な問題である。近年、認知機能障害と歩行障害などの運動機能障害が頭部 MRI 上認められる大脳白質病変と密接な関連性があることが注目されている。大脳微小血管内皮における炎症機序が白質病変の進展に係っていることを指摘した報告があり、その病態機序の解明は重要なテーマと考える。本研究では、とりわけ液性免疫に着目し、高齢認知症患者を含む対象患者の血清中より大脳白質病変と密接に関連するヒト大脳微小血管内皮細胞に対する自己抗体の検出を試みた。今後その認識抗原蛋白を同定することにより、高齢者の新たな認知症の予防・治療法の開発を目指している。

【抗血管内皮細胞抗体検出システムの構築と対象患者血清を用いた抗体の検出】

本年度、抗血管内皮細胞抗体を同定するためのヒト大脳微小血管内皮細胞ホモジネートをサンプルとした二次元免疫ブロットシステムの構築を行った。その結果極めて再現性よく約 900 個の蛋白スポットの分離に成功した。さらにこのシステムを用いて対象者の 2000 倍に希釈した血清を一次抗体として抗原抗体反応を施行した。これまでに広範な大脳白質病変を合併した 60 歳以上の対象者 21 名（脳血管性認知症 11 名、アルツハイマー型認知症 10 名）、大脳白質病変を合併しない 60 歳以上の対象者 22 名（健常者 12 名、アルツハイマー型認知症 10 名）、40 歳未満の健常者 18 名が終了した。広範な大脳白質病変を合併した 60 歳以上の対象者 21 名の一人あたりの抗体反応スポット数は 43.9 ± 17.0 個、大脳白質病変を合併しない 60 歳以上の対象者 22 名では 46.3 ± 19.6 個、大脳白質病変合併・非合併例を含むアルツハイマー型認知症患者 20 名では 51.7 ± 18.0 個、40 歳未満の健常者 18 名では 22.1 ± 17.8 個という結果であった。60 歳以上の対象者 43 名は、40 歳未満の健常者 18 名と比較し有意に一人当たりの抗体反応スポット数が多く、アルツハイマー型認知症患者 20 名は、60 歳以上の健常者 10 名と比較し有意に抗体反応スポット数が多い結果となった。また特異性の検討では広範な大脳白質病変を合併した患者、大脳白質病変を合併しない患者、それぞれに特異性の高いいくつかの蛋白スポットを抽出した。

A. 研究目的

高度の脳白質病変を合併した高齢認知症患者の血清中に特異的に存在するヒト脳微小血管内皮細胞に対する自己抗体を検出し、その認識抗原を同定することにより、認知症の診断に有用なバイオマーカーの確立や新たな治療法の開発に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1) 対象患者の臨床データ・神経画像解析、血清サンプルの採取

対象患者ならびに健常者の選択

①広範な脳白質病変を合併した60歳以上の対象患者：広範な脳白質病変合併群 (n=21)

- ・脳血管性認知症 11名
- ・アルツハイマー型認知症 10名

②広範な脳白質病変を合併しない60歳以上の対象患者・健常者：脳白質病変非合併群 (n=22)

- ・健常者 12名
- ・アルツハイマー型認知症 10名

③40歳未満の健常者 18名
上記対象者より血清サンプルを採取した。

臨床データ解析

①対象患者の認知機能評価

Mini mental state examination (MMSE) を用いて評価した。

②リスクファクターのチェック

高血圧・糖尿病・高脂質血症・虚血性心疾患・心房細動の合併につきそれぞれ検討した。高血圧・糖尿病・高脂質血症

に関しては下記項目を満たすものとした。

- ・高血圧：140/90mmHg 以上もしくは高血圧治療中ないし治療歴あり
- ・糖尿病：空腹時血糖 126mg/dl 以上(2回以上)もしくは随時血糖 200mg/dl 以上(2回以上)もしくは HbA1c 6.5 以上(1回)もしくは糖尿病治療中ないし治療歴あり
- ・高脂血症：LDL-Cho 140mg/dl 以上もしくは HDL-Cho 40mg/dl 未満もしくは高脂血症治療中ないし治療歴あり

③認知症の診断

ECD-SPECT による eZIS 解析と頭部 MRI による VSRAD 解析の結果を参考として DSM-IV に基づきアルツハイマー型認知症ならびに脳血管性認知症を診断した。

神経画像解析

3人の日本神経学会専門医が頭部 MRI FLAIR 画像における Deep White Matter Hyperintensity (DWMH)、Peri Ventricular Hyperintensity (PVH) を Fazekas rating scale (FRS) を用いて評価した。

・脳白質病変の評価

DWMH もしくは PVH が FRS にて grade 3 に該当するものを“広範な脳白質病変有り”と定義し、DWMH と PVH がともに FRS にて grade 0 or 1 のものを“脳白質病変無し”と定義した。

・海馬傍回の萎縮の評価

早期アルツハイマー型認知症診断支援システム (VSRAD) を用い評価を行った。

・脳血流シンチグラフィ
ECD-SPECT を行い eZIS 解析により特異的
血流低下の有無を評価した。

2) ヒト大脳微小血管内皮細胞の培養

ヒト大脳微小血管内皮細胞 (Cell
System-BME Cells, 大日本住友製薬) を
CS-C 培地を用い 100mm ディッシュ上で培
養した。

3) 抗血管内皮細胞抗体の検出

上記、ヒト大脳微小血管内皮細胞ホモ
ジネートを抗原サンプルとして、13 cm,
PH 3-10 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
14cm×14cm polyacrylamide gel による
SDS-PAGE を行った後、PVDF メンブレンに
対しブロッティングを施行した。ブロッ
ト後の PVDF メンブレンを用い対象患者
および健常者血清を一次抗体 (×2000)
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後
に蛍光色素 (SYPRORuby) にて全蛋白染色
したゲル上の蛋白スポットと画像解析ソ
フト (Adobe Photoshop 6.0, Adobe
Systems) を用いてマッチングを行った。

(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

1) 対象患者の臨床データ

対象患者の臨床データを表1にまとめた。

2) 二次元免疫プロットの結果

60歳以上の広範な大脳白質病変を合併した患者が反応した総スポット数は369スポット、60歳以上の大脳白質病変を合併しない患者ならびに健常者血清が反応した総スポット数は344スポット、大脳白質病変合併・非合併例を含むアルツハイマー型認知症患者血清が反応した総スポット数は360スポットであった。また各群の一人当たりの自己抗体反応スポット数は下記となった。

60歳以上(n=43)

I、広範な大脳白質病変合併群(n=21)

43.9±17.0個/人

- 脳血管性認知症患者(n=11)
42.0±17.1個/人
- アルツハイマー型認知症(n=10)
45.9±17.7個

II、大脳白質病変非合併群(n=22)

46.3±19.6個/人

- 健常者(n=12)
37.0±17.8個/人
- アルツハイマー型認知症(n=10)
57.5±17.2個/人

40歳未満(n=18)

- 健常者(n=18)
22.1±17.8個/人

図1に蛍光色素にて全蛋白染色した二次

元電気泳道後のゲル画像を、図2, 3に実際に患者血清を用いて行った抗原抗体反応後のPVDFメンブレン画像を提示した。

3) 各群間の抗体反応スポット数の比較

各群間における一人あたりの抗体反応スポット数を比較検討した。結果、60歳以上の患者・健常者群(n=43, 45.1±18.2個/人)と40歳未満健常者群(n=18, 22.1±17.8個/人)との比較では、60歳以上患者・健常者群のスポット数が有意に多い結果となった($p < 0.001$, Student's t test)。これは60歳以上(n=12, 37.0±16.8個/人)と40歳未満の健常者群のみの比較でも有意であった($p < 0.02$, Student's t test)。また60歳以上におけるアルツハイマー型認知症患者群(n=20, 51.7±18.0個/人)と60歳以上の健常者群(n=12, 37.0±16.8個/人)との比較では、同様に2群間に有意な相違を認めた($p < 0.02$, Mann-Whitney's U test)。

一方、60歳以上における広範な大脳白質病変合併患者群(n=21, 43.9±17.0個/人)と大脳白質病変非合併患者群(n=22, 46.3±19.6個/人)との比較では、2群間に有意な相違を認めなかった。また60歳以上における脳血管性認知症患者群(n=11, 42.0±17.1個/人)と60歳以上の健常者群(n=12, 37.0±16.8個/人)との比較では、同様に2群間に有意な相違を認めなかった。

4) 特異的抗体反応スポットの抽出

特異性の検討のため、対象者の血清中の自己抗体が反応した全ての蛋白スポッ

ト毎に、各群の陽性者の数を集計し、その陽性率を Fisher exact probability test を用いて比較検討した。広範な大脳白質病変合併群(n=21)と大脳白質病変非合併群(n=22)との比較では、広範な大脳白質病変合併群に比較的特異的と思われる6つのスポット(図4・表2, Spot No. 1~6)を抽出した。一方、大脳白質病変非合併群に比較的特異的と思われる3つのスポット(図4・表2, Spot No. 7~9)を抽出した。

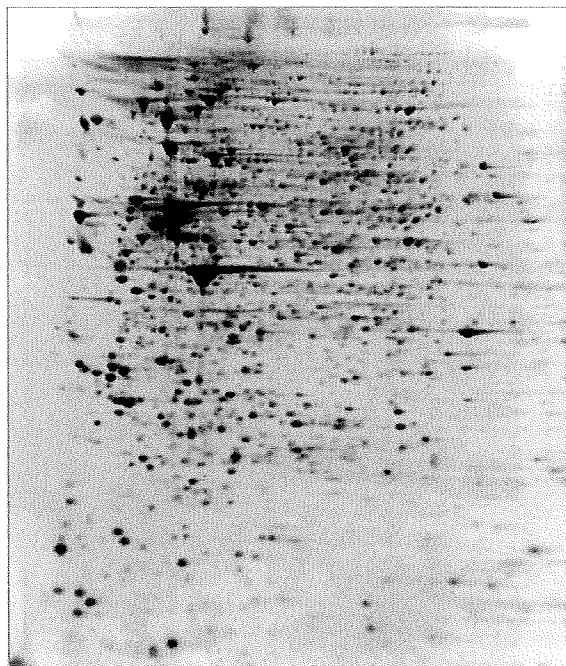
また60歳以上におけるアルツハイマー型認知症患者群(n=20)と60歳以上の健常者群(n=12)との比較では、アルツハイマー型認知症患者群に特異的なスポットは抽出されなかった。

表1) 対象患者の臨床データ

患者群	年齢	男性 (%)	DM (%)	HT (%)	HL (%)	MMSE
VaD (n=11)	78.7 ± 7.6	27.3	40	90	27	19.5 ± 6.8
AD with WML (n=10)	79.7 ± 4.6	40	33	50	38	15.3 ± 4.2
AD without WML (n=10)	76.7 ± 8.2	50	33	63	60	18.4 ± 5.9
normal (>60) (n=12)	70.6 ± 6.8	41.7	25	33	9.1	-
normal (<40) (n=18)	26.9 ± 5.1	55.6	0	0	0	-

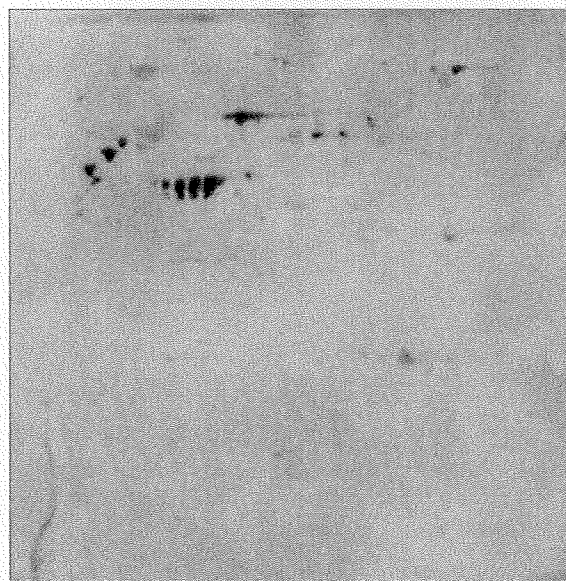
DM: 糖尿病、HT: 高血圧、HL: 高脂血症
MMSE: Mini mental state examination
VaD: 脳血管性認知症、AD: アルツハイマー型認知症、WML: 大脳白質病変

図1) 二次元電気泳動後ゲル画像 (SYPRORubyによる全蛋白染色)



約900個の蛋白スポットが分離された

図2) 抗原抗体反応後メンブレン画像 (脳血管性認知症患者血清×2000)



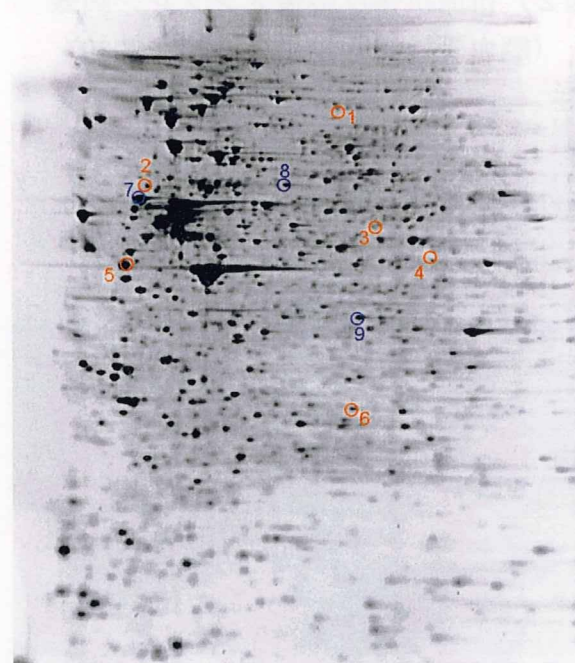
39個の自己抗体反応スポットを認めた

図3) 抗原抗体反応後メンブレン画像
(広範な大脳白質病変を伴うアルツハイマー型認知症患者血清×2000)



50個の自己抗体反応スポットを認めた

図4) 特異的抗体反応スポット



橙色：広範な大脳白質病変合併群に特異的なスポット (No. 1~6)

青色：大脳白質病変非合併群に特異的なスポット (No. 7~9)

表2) 特異的抗体反応スポット

Spot No.	M. W.	PI	患者	P value*
1	120	5.9	大脳白質病変有	<0.01
2	80	4.5	大脳白質病変有	<0.02
3	51	6.2	大脳白質病変有	<0.05
4	43	7	大脳白質病変有	<0.05
5	40	4.4	大脳白質病変有	<0.03
6	20	6	大脳白質病変有	<0.05
7	62	4.6	大脳白質病変無	<0.03
8	74	5.7	大脳白質病変無	<0.01
9	33	6	大脳白質病変無	<0.03

M. W. 分子量、PI 等電点

Spot No. は図4のNo. に対応

* Fisher exact probability test を用い $p < 0.05$ を有意差ありとした

D. 考察

今回の検討により、多数の患者ならびに健常者の血清中にヒト大脳微小血管内皮細胞に反応する自己抗体が存在することが明らかとなった。一人当たりのこれら自己抗体の反応スポット数に関しては、40歳未満と比較すると疾患の有無に関らず60歳以上に多い傾向がみられた。これは、加齢に伴い、大脳微小血管内皮障害がoccurしやすく、その結果として二次的に自己抗体が産生された可能性が示唆された。

60歳以上における検討では広範な大脳白質病変の合併の有無により一人当たりの自己抗体の反応スポット数に相違はみられなかった。しかし、広範な大脳白質病変合併群に特異的に認められる抗体や、その反対に大脳白質病変非合併群に特異的に認められる抗体が存在した。抗血管内皮細胞抗体に関するこれまでの報告では、自己抗体が血管内皮細胞障害をもたらすという報告 (Margutti P, et al. Blood, 2008) や、反対に自己抗体が血管内皮細胞に保護的に作用するといった報告 (Ronda N, et al. Clin Exp Immunol, 2003) があり今後、今回検出した自己抗体が大脳微小血管内皮細胞に及ぼす影響につき検討する必要があると考えられた。

同じく60歳以上における検討で、アルツハイマー型認知症患者群において健常者群と比較し一人あたりの自己抗体反応スポット数が有意に多い結果となった。これまでアルツハイマー型認知症の発症機序において脳実質内におけるアミロイドβ蛋白質(Aβ)の過剰な蓄積と神経細胞死が重要とされてきたが、同時にBBB

の機能障害や大脳還流障害といった血管障害因子も重要であるとされている (Jack C, Lancet Neurol, 2004)。これらは、単に認知機能の低下を促進させるだけでなく、最近の研究では発症早期よりみられることが確かめられ、アルツハイマー型認知症の病態機序における主役を担っている可能性も示唆される。さらにAβの血液脳関門排出輸送系としてlow density lipoprotein related protein 1 (LRP-1)やP-糖蛋白質が関わっていることが明らかとなり、アルツハイマー型認知症患者におけるこれらの down regulationによるAβのクリアランスの低下が報告されている (Bell RD, et al. Nat Cell Biol, 2009)。しかし、これらはAβの血液脳関門排出輸送系の一部にすぎず、その他の輸送系候補の存在も指摘されている。一方、アルツハイマー型認知症の病態において自己免疫機序の存在を指摘する報告もあり、Aβのクリアランス低下につながるBBBの機能障害の一因とも考えられている。自己抗体という観点からは、これまでアルツハイマー型認知症患者においていくつかの報告はあるが (Kellner A. et al. Ann Neurol, 2009)、特にAβ特異的自己抗体がAβのクリアランスの促進に関与するといった報告は注目される (Weiner HL, et al. Nat Rev Immunol, 2006)。これらの報告を踏まえ、アルツハイマー型認知症患者の血清中に存在する抗血管内皮細胞抗体が微小血管内皮に対しどのような影響を及ぼすのか検討することは、同疾患の病態機序の解明ならびに診断・治療法の開発に重要であると考えられた。

E. 結論

- 1、ヒト血清中に存在する大脳微小血管内皮細胞を抗原とする自己抗体の検出システムを構築した。
- 2、一人当たりのこれら自己抗体の反応スポット数は、40歳未満と比較すると疾患の有無に関らず60歳以上に多い傾向がみられた。
- 3、60歳以上における検討では広範な大脳白質病変の合併の有無により一人当たりの自己抗体の反応スポット数に相違はみられなかった。一方、アルツハイマー型認知症患者群においては健常者群と比較しスポット数が多い傾向がみられた。
- 4、広範な大脳白質病変合併患者群、大脳白質病変非合併患者群のそれぞれに比較的特異性が高いと思われる抗体反応スポットを抽出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kimura A, Kanoh Y, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T. Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Neurology* 2010;74:1372-1379.
- Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Yoshino H, Yuasa T, Inuzuka T. Motor-dominant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurology*. 2010;257:621-629
- Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Tanaka R, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T. High prevalence of autoantibodies against phosphoglycerate mutase 1 in patients with autoimmune central nervous system diseases. *J Neuroimmunology*. 2010;219:105-108.
- Hayashi Y, Kimura A, Watanabe M, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T. Serial monitoring of basal metabolic rate for therapeutic evaluation in an Issacs' syndrome patient with chronic fluctuating symptoms. *Internal medicine*. 2010;49:475-477.
- Hayashi Y, Sakurai T, Tanaka Y, Yamada M, Koumura A, Kimura A, Hozumi I, Inuzuka T. Serial monitoring of basal metabolic rate for therapeutic evaluation in an Issacs' syndrome patient with chronic fluctuating symptoms. *Internal medicine*. 2010;49:475-477.
- Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon

R, Dalmau J. Antibodies to the GABAB receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterization of the antigen. Lancet Neurol 2010;9:67-76.

- 櫻井岳郎, 田中優司, 木村暁夫, 保住 功, 犬塚 貴: 胃腸炎後に発症した抗GQ1b抗体陽性の小脳失調を伴わない急性一側性外転神経麻痺の1例 神経内科 2009;71:514-516.

2, 学会発表

- 第50回日本神経学会総会(2009年5月20日、仙台) 抗Hsp60抗体と大脳白質病変に関する研究; 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50回日本神経学会総会(2009年5月22日、仙台) プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体の検索; 櫻井岳郎、木村暁夫、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(2009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
- 第21回日本神経免疫学会学術集会(2009年3月13日、大阪) プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体

の検索; 櫻井岳郎、木村暁夫、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, Kanoh Y, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T	Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus	Neurology	74	1372-1379	2010
Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Yoshino H, Yuasa T, Inuzuka T	Motor-dominant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy	Journal of Neurology	257	621-629	2010
Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Tanaka R, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T	High prevalence of autoantibodies against phosphoglycerate mutase 1 in patients with autoimmune central nervous system diseases	Journal of Neuroimmunology	219	105-108	2010
Hayashi Y, Kimura A, Watanabe N, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T	Serial monitoring of basal metabolic rate for therapeutic evaluation in an Issacs' syndrome patient with chronic fluctuating symptoms	Internal medicine	49	475-477	2010
Hayashi Y, Sakurai T, Tanaka Y, Yamada M, Koumura A, Kimura A, Hozumi I, Inuzuka T	Markedly ring-enhanced optic nerves due to metastasis of signet-ring cell gastric carcinoma	Internal medicine	49	517	2010

Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J	Antibodies to the GABAB receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterization of the antigen.	Lancet Neurol	9	67-76	2010
櫻井岳郎, 田中優司, 木村暁夫, 保住 功, 犬塚 貴	胃腸炎後に発症した抗GQ1b抗体陽性の小脳失調を伴わない急性一側性外転神経麻痺の1例	神経内科	71	514-516	2009

Ⅲ 研究成果の刊行物・別刷

NEUROLOGY

Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus
A. Kimura, Y. Kanoh, T. Sakurai, A. Koumura, M. Yamada, Y. Hayashi, Y. Tanaka, I.
Hozumi, M. Takemura, M. Seishima and T. Inuzuka
Neurology 2010;74;1372-1379
DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181dad590

This information is current as of April 26, 2010

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:
<http://www.neurology.org/cgi/content/full/74/17/1372>

Neurology® is the official journal of the American Academy of Neurology. Published continuously since 1951, it is now a weekly with 48 issues per year. Copyright © 2010 by AAN Enterprises, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0028-3878. Online ISSN: 1526-632X.



Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

A. Kimura, MD
Y. Kanoh, MD
T. Sakurai, MD
A. Koumura, MD
M. Yamada, MD
Y. Hayashi, MD
Y. Tanaka, MD
I. Hozumi, MD
M. Takemura, PhD
M. Seishima, MD
T. Inuzuka, MD

Address correspondence and reprint requests to Dr. Akio Kimura, Department of Neurology and Geriatrics, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, 1-1 Yanagido, Gifu City, Gifu 501-1194, Japan
kimura1@gifu-u.ac.jp

ABSTRACT

Objective: To investigate a target for antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE).

Background: Pathogenesis of NPSLE may be related to autoantibody-mediated neural dysfunction, vasculopathy, and coagulopathy. However, very few autoantibodies are sensitive and specific to NPSLE because the neuropsychiatric syndromes associated with SLE are diverse in cause and presentation.

Methods: We identified antibodies against brain antigens in the sera of 7 patients with NPSLE and 12 healthy controls by 2-dimensional electrophoresis, followed by Western blotting and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), using rat brain proteins as the antigen source.

Results: Six antibodies were detected in patients with NPSLE. One of these 6 antibodies was found in antibodies against Rab guanosine diphosphate dissociation inhibitor α (α GDI) (which is specifically abundant in neurons and regulates synaptic vesicle exocytosis) in patients with NPSLE with psychosis. We tested more samples by 1-dimensional immunoblotting of human recombinant α GDI. Positivity of the anti- α GDI antibody was significantly higher in patients with NPSLE with psychosis (80%, 4 of 5) than in patients with NPSLE without psychosis (0%, 0 of 13), patients with systemic lupus erythematosus without neuropsychiatric symptoms (5.3%, 1 of 19), patients with multiple sclerosis (0%, 0 of 12), patients with infectious meningoencephalitis (0%, 0 of 13), patients with polyneuropathy (0%, 0 of 10), patients with psychotic syndromes (0%, 0 of 10), and healthy controls (0%, 0 of 12).

Conclusions: We propose that the anti-Rab guanosine diphosphate dissociation inhibitor α antibody is a candidate for further exploration as diagnostic marker of psychosis associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Neurology*® 2010;74:1372-1379

GLOSSARY

1D = 1-dimensional; **2-DE** = 2-dimensional electrophoresis; **α GDI** = Rab guanosine diphosphate dissociation inhibitor α ; **ACR** = American College of Rheumatology; **BRAA** = brain-reactive antibodies; **CBB** = Coomassie Brilliant Blue; **LC** = liquid chromatography; **LC-MS/MS** = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; **NPSLE** = neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; **PAGE** = polyacrylamide gel electrophoresis; **PVDF** = polyvinylidene difluoride; **SDS** = sodium dodecyl sulfate; **SLE** = systemic lupus erythematosus; **TBS** = Tris-buffered saline; **TBST** = Tris-buffered saline Tween-20.

Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE) is one of the most significant manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE). The pathogenesis of NPSLE may be related to autoantibody-mediated neural dysfunction, vasculopathy, and coagulopathy.^{1,2} Previous studies have demonstrated the association of autoantibodies in serum and CSF with CNS involvement in patients with NPSLE.³⁻⁵ Twenty antibodies associated with NPSLE were identified by a thorough MEDLINE search.⁵ However, the authors of these studies concluded that specificity was lacking among these 20 antibodies for any single neuropsychiatric manifestation.

In 1999, the American College of Rheumatology (ACR) nomenclature for NPSLE provided case definitions for 19 neuropsychiatric syndromes observed in SLE.⁶ Lupus psychosis (which is 1 of the

Supplemental data at
www.neurology.org

From the Departments of Neurology and Geriatrics (A. Kimura, T.S., A. Koumura, M.Y., Y.H., Y.T., I.H., T.I.), Diabetes and Endocrinology (Y.K.), and Informative Clinical Medicine (M.T., M.S.), Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu City, Japan.

Study funding: Supported by a Japanese Health and Labor Sciences Research Grant for Research on Psychiatry and Neurologic Diseases and Mental Health (H18-026) and a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (1690486) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

Disclosure: The authors report no disclosures.

19 neuropsychiatric syndromes) is rare, with a reported prevalence that varies from 0% to 11%. The occurrence of psychosis in SLE is not easy to determine reliably, because the literature often fails to distinguish psychosis associated with NPSLE from that associated with other causes, such as steroid psychosis.⁷ In this study, we used proteomic analysis to investigate a novel brain antigen against antibodies in sera of persons with NPSLE with psychosis.

METHODS Patients and serum samples. Serum samples were collected from 18 patients with NPSLE; 19 patients with SLE but without neuropsychiatric symptoms; 12 patients with multiple sclerosis; 13 patients with infectious meningoencephalitis (4 with bacterial meningoencephalitis, 3 with cryptococcal meningoencephalitis, 1 with herpes simplex meningoencephalitis, and 5 with viral meningitis); 10 patients with polyneuropathy (5 with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and 5 with Guillain-Barré syndrome); 10 patients with psychotic syndromes (5 with schizophrenia and 5 with depression); and 12 healthy controls. Diagnosis for patients with SLE was consistent with the revised ACR criteria of 1997.⁸ We examined the neuropsychiatric syndromes of patients with SLE in our hospital and selected those patients whose neuropsychiatric syndromes might be caused by SLE, and not by an opportunistic infection, another mental disorder, other abnormal metabolic conditions, or a drug-induced disorder. The neuropsychiatric syndromes of patients with SLE were classified using an ACR consensus document published in 1999.⁶

For screening antibodies, comparatively specific for NPSLE patients, we investigated all the target spots corresponding to proteins that reacted with antibodies in the sera of 7 of the 18 patients with NPSLE and the 12 healthy controls by 2-dimensional electrophoresis (2-DE), followed by Western blotting. All target spots that reacted with antibodies in the sera of the 12 healthy controls were subtracted from the spots that reacted with antibodies in the sera of the 7 NPSLE patients. After subtraction, the remaining target spots were analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This study is explorative and was approved by the institutional review board of the Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu City, Japan (20-16).

Preparation of tissue proteins. Under ether anesthesia, 56-day-old Wistar rats were killed. Their cerebrums were immediately removed and frozen in dry-ice powder. The frozen brain tissue was homogenized with a tissue homogenizer, and enriched membrane proteins were extracted using a proteoExtract native membrane protein extraction kit (Calbiochem, San Diego, CA). The protein concentration was determined by Bio-Rad protein assay, based on the Bradford method (Life Science [Research, Education, Process Separations, Food/Animal/Environment Testing], Hercules, CA).

Two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. The samples were dissolved in DeStreak rehydration solution (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ), and loaded onto an immobilized and rehydrated dry strip (pH 4–7, 13 cm long, GE Healthcare). Up to 100 µg of the extracted proteins was applied to a dry strip for Western blotting. Isoelectric focusing was conducted at 20°C for 85,000 Vh, at a maximum of 8,000 V, using a horizontal electrophoresis system (Multiphor

III, GE Healthcare). Before separation in the second dimension, the isoelectric polyacrylamide gel strips were equilibrated for 15 minutes in a buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 6 M urea, 30% volume by volume (v/v) glycerol, 0.001% BPB, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) under reducing conditions, with 65 mM DTT, followed by further incubation for 15 minutes in the same buffer under alkylating conditions with 140 mM iodoacetamide. Equilibrated isoelectric polyacrylamide gel strips were transferred to a 12.5% polyacrylamide gel.

The run in the second dimension was done vertically, using an electrophoresis apparatus (ERICA-S, DRC) at a constant voltage of 300 V for 2 hours. After the electrophoresis, the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) (GelCode Blue Stain Reagent, Pierce) or used for protein transfer onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The separated proteins were electrophoretically transferred to a PVDF membrane at 0.8 mA/cm² for 1 hour, using a semidry blotting apparatus (TE77 PWR Semi-Dry Transfer Unit, GE Healthcare). The PVDF membrane was stained with a fluorescent total protein stain (Deep Purple Total Protein Stain, GE Healthcare) and was scanned using a variable mode imager (Typhoon 9400, GE Healthcare). Subsequently, this membrane was incubated in blocking solution (5% skim milk in 1 × Tris-buffered saline Tween-20 [TBST]; 1 × Tris-buffered saline [TBS] containing 0.1% Tween 20) overnight in a cold room and reacted with the patient's serum, diluted to 1:1,500 with 1% skim milk in 1 × TBST for 1 hour at room temperature. The PVDF membrane was washed 5 times with 1 × TBST, and reacted with peroxidase-conjugated goat antihuman Ig (A+G+M) antibodies (P.A.R.I.S.) diluted to 1:2,000 with 1% skim milk in 1 × TBST for 1 hour at room temperature. After 6 washes, the membrane was incubated with the WB detection reagent (ECL Plus, GE Healthcare) for 5 minutes, and was scanned using Typhoon 9400. The antibody-reactive protein spots were matched with the fluorescent stained total protein spots, using image analysis software (Adobe Photoshop 6.0, Adobe Systems).

In-gel digestion and mass spectrometry. The identified spots were excised from the gel and subjected to trypsin digestion. Peptide fragments were analyzed using a nanoscale capillary liquid chromatography (LC) system (LC-VP, Shimadzu) and an ion trap tandem mass spectrometer (LCQ Advantage Max, Thermo electron). Proteins were identified from MS/MS spectra using protein identification software (X Caliber TM, Thermo Finnigan, and MASCOT Search, Matrix Science).

One-dimensional electrophoresis and immunoblotting using human recombinant Rab GDP dissociation inhibitor α . For 1-dimensional (1D) immunoblotting analysis, the commercially available Rab GDP dissociation inhibitor α (α GDI), full-length, human recombinant protein (Abnova, molecular weight: 75.28 kDa with its N-terminal GST-tag), produced by the method based on the wheat germ cell-free expression system, was separated by 4%–20% SDS-PAGE. Immunoblotting was the same as described previously. We tested the serum samples from 18 patients with NPSLE, 19 patients with SLE without neuropsychiatric symptoms, 12 patients with multiple sclerosis, 13 patients with infectious meningoencephalitis, 10 patients with polyneuropathy, 10 patients with psychotic syndromes, and 12 healthy controls.

Immunocytochemistry of human neuroblastoma culture cells. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells on coverslips