

201027118A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

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22年度 総括研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成23（2011）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

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22年度 総括研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成23（2011）年 4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	-----	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（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
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・福祉上きわめて重要な問題である。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を検出し、その認識抗原蛋白を同定した。その後、ELISA システムを用いた検討、抗体の機能解析を行った。

【抗血管内皮細胞抗体の検出と抗 TPM4 抗体の特異性の検討】

昨年度構築した二次元免疫ブロットシステムを用い、広範な大脳白質病変を合併する 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 名の血清中に存在する抗血管内皮細胞抗体を検出した。その結果、60 歳以上の健常者は 40 歳未満の健常者と比較し、有意に一人あたりの抗体数が多い結果となった。大脳白質病変合併患者と非合併患者間において、一人あたりの抗体数に有意差は認めなかった。抗体反応スポット毎における検討では、広範な大脳白質病変を合併する 60 歳以上の対象者に有意に多く認められる 7 つの抗体反応スポットを検出した。その後 LC-MS/MS を用いこれら抗体反応スポットに該当する Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4)をはじめとする 6 つの認識抗原を同定した。次に抗 TPM4 抗体の特異性の検討を目的として、60 歳以上の高齢者 104 名を対象とした ELISA 解析により抗 TPM4 抗体価を測定した。その後の多変量解析の結果、抗 TPM4 抗体価は、癒合性のある大脳深部白質病変 Deep White Matter Hyperintensity (DWMH) の出現に関連する独立した因子であり、抗体価が高くなれば、癒合性のある DWMH 出現の頻度が高まる結果となった。一方、大脳白質病変を合併しない 60 歳以上の対象者に有意に多く認められる 3 つの抗体反応スポットを検出し、質量分析の結果、この中の 2 つの認識抗原 Protein disulfide-isomerase A1 と Annexin A1 を同定した。

A. 研究目的

高度の大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大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広範な大脳白質病変を合併する 60 歳

以上の対象患者：広範な大脳白質病変合併群 (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広範な大脳白質病変を合併しない 60

歳以上の対象患者・健常者：大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

上記対象患者および健常者より血清サンプルを採取した。

臨床データ解析

①既知の脳血管障害危険因子の評価

高血圧・糖尿病・高脂質血症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 HbA_{1c} 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：Total cholesterol 220mg/dl 以上もしくは高脂血症治療中ないし治療歴あり

②認知症の診断

HDS-R \leq 21 and/or MMSE \leq 21 を満たし ECD-SPECT による eZIS 解析と頭部 MRI による VSRAD 解析の結果等を参考として 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。

- ・大脳白質病変の評価

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

4) 特異的抗血管内皮細胞抗体の抽出

全対象患者および健常者の血清中に存在する抗血管内皮細胞抗体の反応スポットを抽出した。次に対象患者・健常者群別にスポット毎の抗体陽性患者率を比較検討した。この中、統計学的に優位なスポットを抽出した。

5) 抗 Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4) 抗体 ELISA 解析

60 歳以上の 104 名を対象に ELISA 解析により抗 TPM4 抗体価を測定した。104 名の内訳はアルツハイマー型認知症患者

66 名、脳血管性認知症患者 27 名、健常者 11 名とした。それぞれの対象患者と健常者の合併症 (高血圧・糖尿病・高脂血症) と頭部 MRI 画像所見を検討した。合併症の定義と大脳白質病変の評価は前述 1) に従い行った。ELISA 解析はヒト TPM4 リコンビナント蛋白 (GenWay) を用い、対象患者および健常者血清を一次抗体 (×400) とし、HRP で標識したヤギ抗ヒト IgG・A・M 抗体を二次抗体 (×2000) として行った。

6) Cell Counting Kit (CCK)-8 を用いたヒト大脳微小血管内皮細胞障害性試験

ヒト大脳微小血管内皮細胞を 96 穴マイクロプレート上で培養し (5×10^3 個/well)、それぞれの well に $\times 10$ (n=6), $\times 50$ (n=6), $\times 100$ (n=6) 希釈のウサギ抗ヒト TPM4 ポリクローナル抗体血清 (Millipore) を添加し 37°C で 24 時間 incubation した。その後、それぞれの well に CCK-8 液 (DOJINDO) を 10 μ l ずつ加え 4 時間発色反応を行った後、マイクロプレートリーダーを用い 450nm の吸光度を測定し生細胞数をカウントした。

7) BBB モデルを用いた血管透過性試験

血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトから構成される市販の BBB モデル (BBB Kit, PharmaCo-Cell Company Ltd.) を用いて血管透過性試験を施行した。ウサギ抗ヒト TPM4 ポリクローナル抗体血清 (Millipore) 添加前後での電気抵抗値の変化と、添加後の BBB の透過性を NaF と Evan's blue を用いて評価した。

8) 統計処理解析

◆ 対象患者・健常者間の一人当たりの抗血管内皮細胞抗体数の比較は Student's t testを用い、対象患者・健常者間のスポット毎の抗体陽性率の比較はFisher's exact testを用いた。CCK8を用いた細胞障害性試験における吸光度データは、one-way ANOVAで解析し、各条件下の平均値の差をTukey-Kramerの多重比較検定で解析した。BBBモデルを用いた血管透過性試験に関しては、抗TPM4抗体付加あり・なしの群間データの比較をMann-Whitney testを用いた。

◆ 抗TPM4抗体価と癒合性DWMHおよび癒合性PVHの関連性の検討

1) DWMHおよびPVHに関しては、病理学的に癒合性病変が大脳微小血管障害に伴う虚血性変化を反影しているとした従来報告 (Fazekas F; Neurology 1993, Schmidt R; Neurology 2004, Young VG; Neurology 2008)をもとに下記のようにカテゴリー化した。また年齢・性別と合併症(高血圧・糖尿病・高脂血症)の有無についても下記のようにカテゴリー化して単変量解析 (univariate analysis) を施行した。単変量解析は χ^2 乗検定, Student's t test, Mann-Whitney testを用いた。

・ PVH, DWMH

【PVH: FRS 3 (深部白質病変と癒合性を示す不整形高信号), DWMH: FRS 2(早期癒合性高信号領域)or 3 (び慢性癒合性高信号領域)】を1とし、それ以外を0とした。

・ 性別

男性=1, 女性=2とした。

・ 合併症

ありを1、なしを0とした。

・ 年齢, 抗TPM4抗体価

分布に正規性があることを確認し、年齢に関しては75歳未満、75歳以上に分け検討した。抗体価に関しては、中央値0.5525で分けた群(中央値未満, 中央値以上)で検討した。

2) 多変量解析 (multivariate analysis) はロジスティック回帰分析 (logistic regression analysis)を用いた。その際、抗TPM4抗体価は、測定実測値及び四分位数で4つにカテゴリー化して検討を行った。

(倫理面への配慮)

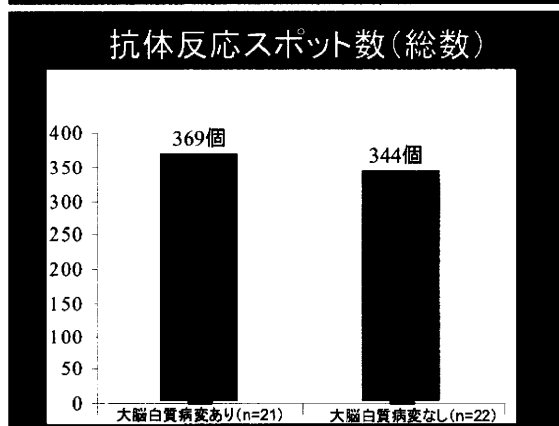
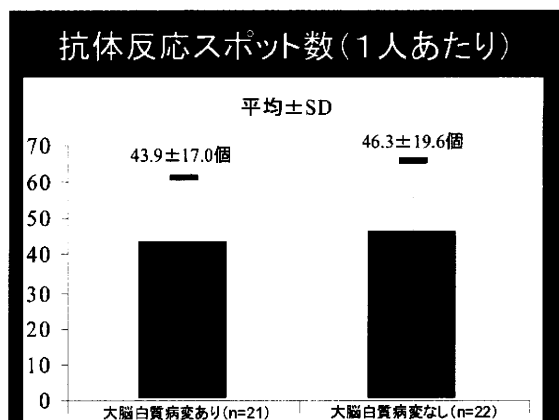
厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針 (H20年厚生労働省告示第415号)に従い、被検者の人権に十分留意しながら行った。また患者血清の自己抗体の検索については、岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理委員会に提出し承認を得た。動物実験についても、同様に岐阜大学大学院医学系研究科動物実験委員会に提出し承認を得た。

C. 研究結果

1) 抗血管内皮細胞抗体を検出

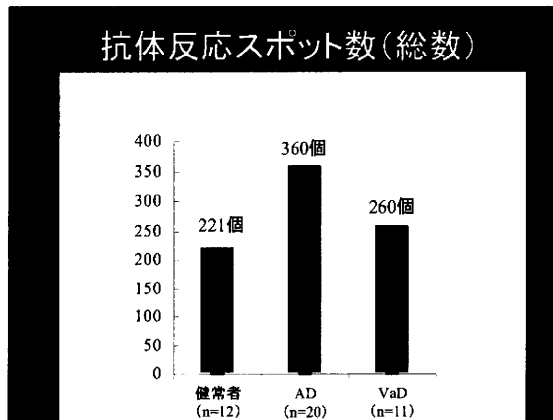
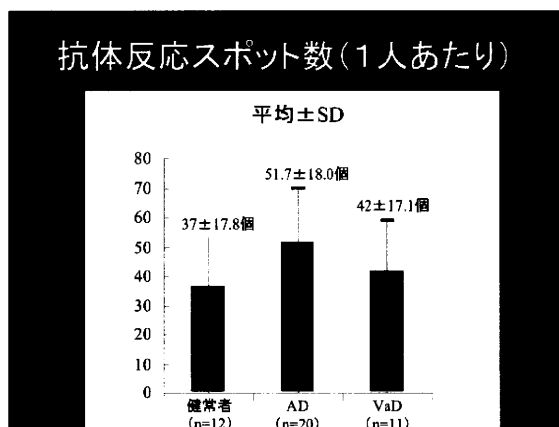
各対象患者・健常者群の抗体反応スポット数（1人あたりと総数）を検討した

① 広範な大脳白質病変の有無での検討（60歳以上）



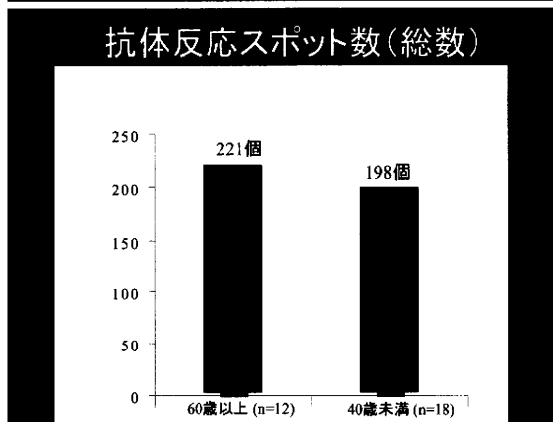
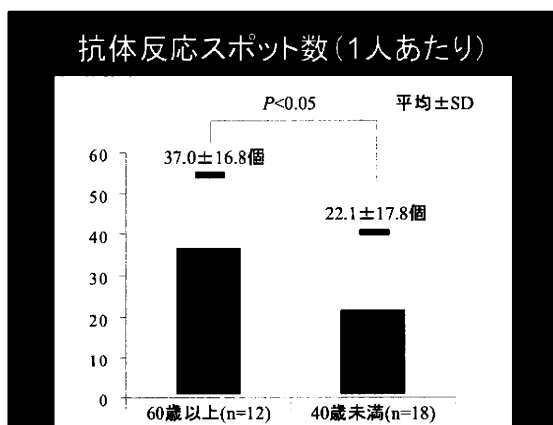
- 広範な大脳白質病変の有無で一人あたりおよび総数のいずれの抗体反応スポット数に相違はみられなかった。

② 疾患別での検討（60歳以上）



- 健常者・疾患別（AD, VaD）における検討でも一人あたりおよび総数のいずれの抗体反応スポット数に相違はみられなかった。

③ 年齢別での検討



- 年齢別では60歳以上の対象者は40歳未満の対象者と比較し有意に一人当たりの抗体反応スポット数が多かった。一方総数では相違はみられなかった。

2) 特異的抗血管内皮細胞抗体抽出とその認識抗原蛋白の同定

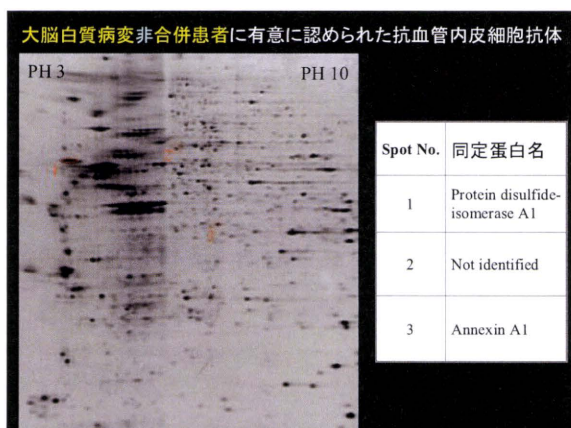
- ◆ 各対象患者群に特異的な抗血管内皮細胞抗体を抽出し、その認識抗原蛋白を同定した。

① 広範な大脳白質病変合併患者 (60 歳以上) に有意に認められた抗血管内皮細胞抗体の反応スポットとその認識抗原蛋白



- ・ 上記7つの抗体反応スポットを抽出し、そのうちの6つのスポットにつき抗原蛋白を同定した。

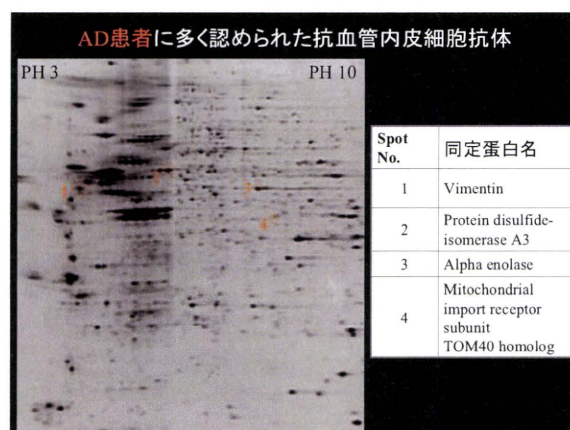
② 大脳白質病変非合併患者・健常者 (60 歳以上) に有意に認められた抗血管内皮細胞抗体の反応スポットとその認識抗原蛋白



- ・ 上記3つの抗体反応スポットを抽出し、そのうちの2つのスポットにつき抗原蛋白を同定した。

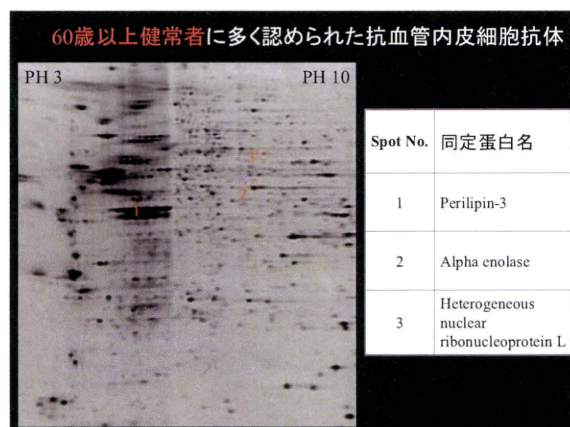
- ◆ アルツハイマー型認知症患者、60 歳以上健常者、40 歳未満健常者に比較的多く認められた抗体反応スポット (統計学的有意差は認めず) を抽出し、その認識抗原蛋白を同定した。

③ アルツハイマー型認知症患者に比較的多く認められた抗血管内皮細胞抗体の反応スポットとその認識抗原蛋白



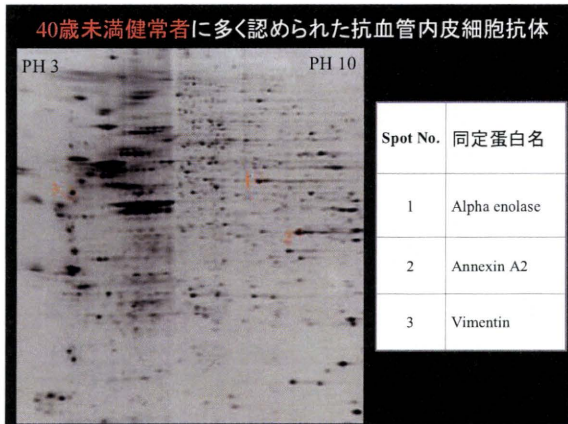
- ・ 上記4つの抗体反応スポットを抽出し、その抗原蛋白を同定した。

④ 60 歳以上健常者に比較的多く認められた抗血管内皮細胞抗体の反応スポットとその認識抗原蛋白



- ・ 上記3つの抗体反応スポットを抽出し、その抗原蛋白を同定した。

⑤ 40 歳未満健常者に比較的多く認められた抗血管内皮細胞抗体の反応スポットとその認識抗原蛋白



- ・ 上記3つの抗体反応スポットを抽出し、その抗原蛋白を同定した。

以上①～⑤の質量分析結果のまとめ



Spot No.	Protein Name	Score
1	Tropomyosin alpha-4 chain	250
2	Protein disulfide-isomerase A1	386
3	Vimentin	783
4	Vimentin	909
5	Not identified	
6	Reticulocalbin-1	78
7	Perilipin-3	92
8	Protein disulfide-isomerase A3	871
9	Not identified	
10	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	90
11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	208
12	Perilipin-2	69
13	Annexin A1	527
14	Alpha enolase	596
15	26S protease regulatory subunit 8	125
16	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	54
17	Annexin A2	1001
18	Phosphoglycerate mutase 1	152

3) 抗 TPM4 抗体価と癒合性 DWMH、癒合性 PVH の出現との関連性の検討
 広範な大脳白質病変合併患者に有意に認められた抗血管内皮細胞抗体の一つである抗Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4) 抗体の特異性につき検討した。まず ELISA解析により60歳以上対象者の抗 TPM4抗体価を測定し、癒合性DWMH、癒合性PVHとの関連性を検討した。

<単変量解析結果>

癒合性PVH(FRS3)出現の有無と各項目の関連性 FRS*: Fazekas rating scale

		PVH FRS* 0, 1, 2	PVH FRS 3	計	χ2値	P値
年齢	75未満	36	4	40	5.5391	0.0186
	75以上	45	19	64		
性別	M	42	8	50	2.0908	0.1482
	F	39	15	54		
抗体価	中央値未満	42	10	52	0.5024	0.4784
	中央値以上	39	13	52		
高血圧	なし	42	6	48	3.8043	0.0511
	あり	39	17	56		
糖尿病	なし	59	15	74	0.5070	0.4764
	あり	22	8	30		
高脂血症	なし	47	15	62	0.3849	0.5350
	あり	34	8	42		
計		81	23	104		

癒合性DWMH(FRS 2, 3)出現の有無と各項目の関連性

		DWMH FRS 0, 1	DWMH FRS 2, 3	計	χ2値	P値
年齢	75未満	22	18	40	10.6989	0.0011
	75以上	15	49	64		
性別	M	19	31	50	0.2467	0.7705
	F	18	36	54		
抗体価	中央値未満	26	26	50	11.3321	0.0008
	中央値以上	11	41	54		
高血圧	なし	20	28	48	1.4424	0.2298
	あり	17	39	56		
糖尿病	なし	24	50	74	1.1067	0.2928
	あり	13	17	30		
高脂血症	なし	23	39	62	0.1547	0.6941
	あり	14	28	42		
計		37	67	104		

[単変量解析結果のまとめ]

PVH出現と有意に関連している因子は、年齢であり、DWMH出現と有意に関連する因子は、年齢・抗体価であった。

これらの結果から、FRS3に該当する癒合性のあるPVHの出現、FRS2, 3に該当する癒合性のあるDWMH出現に関連する独立因子を検討するための多変量ロジスティック解析を行った。各々PVH出現、DWMH出現を目的変数として、説明変数を年齢、性別、抗体価、高血圧の有無として検討した。抗体価を25%値未満=1, 25%値~50%値=2, 50%~75%値=3, 75%以上=4に4分割して検討した。

<多変量ロジスティック解析結果>

◆ PVH

	P値	Odds比	95%信頼区間	
			下限	上限
年齢	0.0847	1.0682	0.9910	1.1514
性別	0.4346	1.4450	0.5739	3.6388
抗体価4分割	0.9495	1.0139	0.6607	1.5560
高血圧	0.2318	1.7753	0.6930	4.5479

◆ DWMH

	P値	Odds比	95%信頼区間	
			下限	上限
年齢	0.0156	1.089	1.016	1.166
性別	0.9870	1.007	0.423	2.397
抗体価4分割	0.0204	1.620	1.078	2.435
高血圧	0.4183	1.434	0.599	3.432

[多変量解析結果のまとめ]

FRS3に該当する癒合性のあるPVH出現には、年齢が関連する傾向を示したが、抗体価との関連性は認められなかった。一方、FRS2, 3に該当する癒合性のあるDWMH出現に関しては年齢および抗体価4分割が有意に関連する独立因子であ

ることが分かった。ちなみに抗体価の連続量では有意な相関性は認められなかった。次に抗TPM4抗体価4分割と癒合性のあるDWMH出現率に関して検討した。

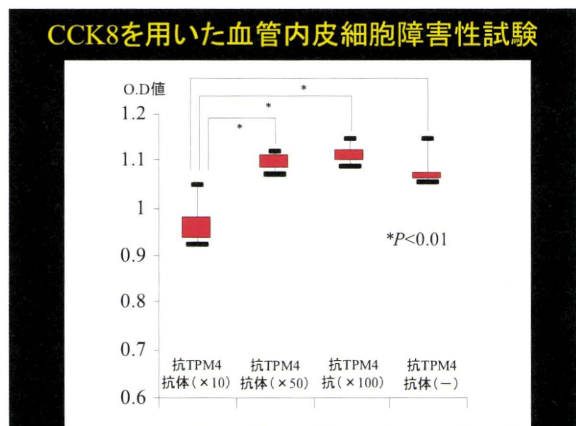
[抗体価と癒合性DWMH出現の関連性]

抗体価	DWMH FRS 0, 1	DWMH FRS 2, 3	計	χ ² 値	P値
25%値未満	17	9	26	15.5643	0.0007
25%値~50%値	9	17	25		
50%値~75%値	7	19	27		
75%値以上	4	22	25		
計	37	67	104		

25%値：0.432 (OD値), 50%値：0.553, 75%値：0.701

癒合性DWMH出現と抗体価4分割の関連性が認められ、抗体価が25%値以上になれば、癒合性DWMH出現の頻度が高まることが認められた。

4) CCK-8 を用いたヒト大脳微小血管内皮細胞障害性試験



ヒト大脳微小血管内皮細胞に抗TPM4ポリクローナル抗体を添加し24時間 incubation後、CCK8を用い生細胞数を計測した。結果、10倍希釈の抗TPM4ポリクローナル抗体を添加した場合にのみ、その他の条件と比較し有意にcell

viability)の低下が認められた。

5) BBB モデルを用いた血管透過性試験
市販のBBBモデルに抗TPM4抗体を添加し、添加前後におけるBBBの電気抵抗の変化率、添加後のNaFとEvan's blueの透過性を評価した。結果、いずれの指標に関しても抗体を添加しなかった場合と比較し有意差は認められなかった。

【結果のまとめ】

- I. 60歳以上の健常者は40歳未満の健常者と比較し、一人あたりの抗血管内皮細胞抗体数が有意に多かった。
- II. 60歳以上の大脳白質病変合併患者に特異的と思われる6種類の抗血管内皮細胞抗体を同定した。また大脳白質病変非合併患者に特異的と思われる2種類の抗血管内皮細胞抗体を同定した。
- III. アルツハイマー型認知症患者、健常者の血清中に比較的多く存在する合計8種類の抗血管内皮細胞抗体を同定した。
- IV. 大脳深部白質の早期癒合性もしくは、慢性癒合性高信号病変の出現と抗TPM4抗体価4分割の間には有意な相関性が認められ、抗TPM4抗体価が高値となれば、その出現頻度が高まる結果となった。
- V. 抗TPM4抗体はin vitroにおいてヒト大脳微小血管内皮培養細胞のviabilityを低下させた。

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おりやすく、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患者群に特異的に認められる自己抗体や、その反対に大脳白質病変非合併患者群に特異的に認められる自己抗体が存在し、それらが認識する抗原蛋白を同定した。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) がある。そこで、本年度、広範な大脳白質病変合併患者群に特異的に認められた自己抗体の一つである抗 Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4) 抗体の ELISA 解析を行い、多変量解析によりその特異性を検討した。その結果、大脳深部白質における癒合性高信号病変の出現と抗 TPM4 抗体価 4 分割の間には有意な相関性が認められ、抗 TPM4 抗体価が 25%値 (0.432) 以上になれば、癒合性

高信号病変の出現頻度が高まることが確かめられた。過去の報告では大脳深部白質における癒合性病変は、病理学的に大脳微小血管障害に伴う虚血性変化を反映しているとの報告がある (Fazekas F, et al. *Neurology* 1993; Schmidt R, et al. *Neurology* 2004; Young VG, et al. *Neurology* 2008)。そこで、抗 TPM4 抗体が大脳微小血管障害の病態と何らかの関連性がある可能性が推測され、抗体の機能解析を行った。Cell counting kit (CCK8)を用いた cell viability 試験では、ヒト大脳微小血管内皮培養細胞に対する抗 TPM4 ポリクローナル抗体の添加により cell viability の低下がもたらされた。一方、市販の BBB kit を用いた血管透過性試験では、抗体の添加により明らかな電気抵抗値あるいは血管透過性の変化はみられなかった。Tropomyosin は、骨格筋のみでなく、あらゆる細胞に発現するアクチン結合蛋白で4つの異なった遺伝子 (TM1, TM2, TM3, TM4) がコードし約 20 の異なるアイソフォームが存在する。これらアイソフォームは、高分子量グループと低分子量グループの2つのグループに分割され、骨格筋に発現する Tropomyosin は高分子量グループに該当し、骨格筋以外の細胞に発現する tropomyosin は高分子量・低分子量の両者に該当することが知られている。今回同定した TPM4 は低分子量グループに属し、これまでにその詳細な体内発現部位に関する報告はないが、今回の二次元電気泳道の結果、ヒト大脳微小血管内皮細胞に豊富に存在することが確認された。一方、Tropomyosin は α -helical coiled coil 構造を有し、骨格筋においてはトロポニン複合体を形成し骨格筋収縮に関係する。一方、

筋以外の細胞においてはトロポニンとは関係せず細胞形態や運動性の調節を行うことが知られている。

抗 TPM4 抗体の産生機序およびその血管内皮細胞に対する病的意義に関しては十分に解明されていない。これまでにベーチェット病や潰瘍性大腸炎患者の血清中に抗 TPM4 抗体とはアイソフォームを異にする抗トロポミオシン抗体が存在することが報告されている (Mor F, et al. *Eur J Immunol.* 2002, Ebert EC, et al. *Cell Immunol.* 2006)。これらの報告の中で、抗体産生機序に関する仮説として、トロポミオシンが有する α -helical coiled coil 構造が自己抗体産生を誘導しやすく、甲殻類やハウスダストなどの主要なアレルゲンであるといった報告や A 型溶連菌の M 蛋白と共通のエピトープを有するといった報告をもとに分子相同性による産生機序が重要であることが指摘されている。一方、我々が考えるもう一つの仮説としては、炎症や低酸素による大脳微小血管内皮細胞障害に伴い二次的に抗体が産生された可能性である。

抗 TPM4 抗体の血管内皮細胞に対する病的意義に関しても2つの可能性が考えられる。トロポミオシンは通常、細胞質に局在するが、増殖期血管内皮細胞においては細胞膜表面に発現し、angiogenesis に関与することが報告されている (Zhang JC, et al. *PNAS* 2002)。さらに、Tropomyosin は angiogenesis を阻害する分子である high molecular weight kininogen (HKa)、Endostatin が血管内皮細胞に作用する際のレセプターになるといった報告もある (Donate F, et al. *Current Cancer Drug Targets* 2004)。これらの報告と今回我々が行った、CCK8を用いた in vitro の実験結果

をふまえ抗TPM4抗体は、増殖期の脳微小血管内皮細胞に対し、そのangiogenesisを抑制することにより脳白質病変の進展に関与している可能性が考えられた。その一方で抗TPM4抗体は、生体内においてはangiogenesisを阻害する分子であるHKAやEndostatinなどから血管内皮細胞を保護する役割を果たしている可能性も否定できないと考えられた。今後も引き続き、Tropomyosin alpha-4 chainの脳微小血管内皮細胞における役割と抗TPM4抗体が脳微小血管内皮細胞に及ぼす影響に関して、検討を加える必要があると考えられた。

今回、抗TPM4抗体以外にも広範な脳白質病変との関連性が予想される5つの抗血管内皮細胞抗体を同定した。これら自己抗体の認識抗原蛋白は、コラーゲン様ペプチドのリシル残基のヒドロキシル化を触媒する蛋白、小胞体内腔に存在するカルシウム結合性蛋白、脂肪滴に関連する蛋白、ATP依存性にユビキチン化蛋白のデグラデーションに関連する蛋白、解糖系酵素であった。これまでの報告では、このうちのPGAM1とReticulocalbin-1に関しては血管内皮細胞に発現するとして報告がある(Wang Q, et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005, Jacobowitz DM, et al. *Microvasc Res.* 2008)。これら自己抗体に関しては、現在、多数例でELISA解析を行い、特異性の検討をおこなっている。

脳微小血管内皮細胞障害は、認知機能障害と歩行障害などの運動機能障害をきたす原因となりうる脳白質病変と密接に関連し、その血清学的診断マーカーの確立は極めて重要と考えられる。今回同定した6つの抗血管内皮細胞抗体が、新

たなバイオマーカーとなり得る可能性があり今後の多数例での検討が重要であると考えられた。

また今回の研究成果として、晩期発症型アルツハイマー型認知症患者、60歳以上健常者、40歳未満健常者の血清中に比較的多く認められる抗血管内皮細胞抗体を同定したことがあげられる。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重要な役割を担っている可能性も示唆される。一方、アルツハイマー型認知症の病態において炎症機序や自己免疫機序の存在を指摘する報告もある。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があり(Kellner A. et al. *Ann Neurol*, 2009)、最近では同年代の健常者と比較すると、アルツハイマー型認知症患者の剖検脳ではニューロンに免疫グロブリンの沈着が有意に多くみられることが報告されている(Levin et al., *Brain research*, 2010など)。

今回、晩期発症型アルツハイマー型認知症患者の血清中に多く存在する抗血管内皮細胞抗体の認識抗原蛋白の一つとしてMitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog (Tom40)を同定した。

Tom40はミトコンドリア内に存在し、ミトコンドリア内への蛋白の選択輸送に関与するチャンネルを形成していることが知られている。Tom40をコードする遺伝子 TOMM40は19番染色体上のAPOE遺伝子近傍に位置し、最近のゲノムワイド関連解析の結果、TOMM40のリスクアリルはコントロールと比較し晩期発症型アルツハイマー型認知症の発症が2倍になる (Potkin et al., PLoS ONE, 2009) といった報告や TOMM40 のイントロン変異

(poly-T insertion) を持つ患者は、晩期発症型アルツハイマー型認知症の発症が約7年早くなる (Rosese et al., Pharmacogenomics J, 2010) といった報告もある。また同じく今回新たに同定した Protein disulfide isomerase (PDI) に関しては、蛋白のジスルフィド結合を触媒することにより蛋白のフォールディングを促進することが知られている。最近アルツハイマー型認知症患者の神経原線維変化中に、この PDI 陽性の封入体が存在することが報告された (Honjo et al., Brain Res, 2010)。以上の報告からも、今回同定した認識抗原蛋白はアルツハイマー型認知症の病態において近年、非常に注目されている分子といえる。

今後、これら自己抗体とアルツハイマー型認知症の病態との関連性を検討することにより、同疾患の病態機序の解明ならびに新たな診断マーカーの確立と治療法の開発につながる可能性も考えられた。

E. 結論

1. 広範な大脳白質病変と関連することが予想される抗血管内皮細胞抗体が存在する。

2. 抗 TPM4 抗体高値は、大脳深部白質の癒合性病変の出現に関連する独立した危険因子である。
3. 抗 TPM4 抗体は、大脳微小血管内皮細胞の angiogenesis を抑制することにより白質障害の進展に関与している可能性がある。
4. 晩期発症型アルツハイマー型認知症患者の血清中に抗 Tom40 抗体と抗 PDI 抗体が存在する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kimura A, Kanoh Y, Saukurai 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 Neuroimmunol*. 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.
 - 木村暁夫, 犬塚 貴: 膠原病に伴う神経・筋障害—診断と治療の進歩 膠原病における新たな抗神経抗体の検索. 日本内科学会雑誌. 2010;99: 115-120.
 - Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T: Elevated anti-heat shock protein 60 antibody titer is related to white matter hyperintensities. J Stroke Cerebrovasc Dis. In press.
 - Hozumi I, Koumura A, Kimura A, Hasegawa T, Honda A, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T: High levels of copper, zinc, iron and magnesium, but not calcium, in the cerebrospinal fluid of patients with Fahr's disease. Case Rep Neurol. 2010;2:46-51.
 - Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T: Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. J Neurol Sci. 2011;303:95-99.
 - Sakurai T, Kimura A, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T : Identification of antibodies as biological markers in serum from multiple sclerosis patients by immunoproteomic approach. J Neuroimmunol. 2011;233:175-180.
2. 学会発表
- 第51回日本神経学会総会(2010年5月21日、東京) Motor-dominant CIDP患者の臨床的検討: 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、香村彰宏、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
 - 第51回日本神経学会総会(2010年5月22日、東京) 通常型多発性硬化症における抗Stress 70 protein抗体の特異性に関する検討: 櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、香村彰宏、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
- 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
<u>Kimura A</u> , 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
<u>Kimura A</u> , 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
<u>Kimura A</u> , 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, <u>Kimura A</u> , 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, <u>Kimura A</u> , 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, <u>Kimura A</u> , 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

木村曉夫, 犬塚 貴	膠原病に伴う神経・筋障害－診断と治療の進歩 膠原病における新たな抗神経抗体の検索	日本内科学会雑誌	99	115-120	2010
<u>Kimura A</u> , Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T	Elevated anti-heat shock protein 60 antibody titer is related to white matter hyperintensities	Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease	In press		
Hozumi I, Koumura A, <u>Kimura A</u> , Hasegawa T, Honda A, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T	High levels of copper, zinc, iron and magnesium, but not calcium, in the cerebrospinal fluid of patients with Fahr's disease.	Case Reports in Neurology	2	46-51	2010
Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, <u>Kimura A</u> , Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T	Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases	Journal of the Neurological Sciences	303	95-99	2011
Sakurai T, <u>Kimura A</u> , Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T	Identification of antibodies as biological markers in serum from multiple sclerosis patients by immunoproteomic approach	Journal of Neuroimmunology	233	175-180	2011