

201/22022A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 木村暁夫

平成24（2012）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 | 23 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | 25 |

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

岐阜大学大学院医学系研究科 神経内科・老年学分野 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とされ、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。ヒト大脳微小血管内皮培養細胞ホモジネートを抗原とする二次元免疫ブロット法により、患者血清中に存在する抗血管内皮細胞抗体を検出し、その認識抗原蛋白を LC-MS/MS システムを用い同定した。認知症患者および健常者、合わせて 112 名を対象とした。はじめにスクリーニングとして、この中の広範な大脳白質病変を合併する 60 歳以上の高齢者 21 名と大脳白質病変を合併しない 60 歳以上の高齢者 22 名で、抗体反応スポットを比較検討し、特異的な抗血管内皮細胞抗体を抽出した。広範な大脳白質病変を合併する 60 歳以上の高齢者に特異的な 6 つの抗血管内皮細胞抗体を同定した。次に ELISA 解析により 112 名の対象者の血清を用い、同定した抗血管内皮細胞抗体の抗体価を測定し、大脳白質病変との関連性を多変量解析を用いて検討した。これまでに終了した ELISA 解析では、Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4) に対する自己抗体の抗体価と大脳白質病変の程度に相関性を認め、多変量解析の結果、大脳深部白質の癒合性病変の出現と有意な相関性が認められた。さらに免疫染色による検討により、TPM4 の大脳微小血管内皮細胞膜表面の発現を確認した。次に、抗 TPM4 抗体の機能解析を行った。抗 TPM4 抗体付加による大脳微小血管内皮細胞の viability の変化や、blood brain barrier (BBB) モデルを用いた抗体付加前後での電気抵抗値や透過性の変化を検討したが、大脳微小血管内皮細胞に対する障害性や BBB の透過性への影響は確認されなかった。その一方、tube formation assay による検討により、抗 TPM4 モノクローナル抗体および抗 TPM4 抗体高値の患者 IgG の血管新生阻害作用を確認した。

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ならびに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

研究の概略を図1に示した

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アルツハイマー型認知症患者 63名
- ②脳血管性認知症患者 22名
- ③健常者 27名

上記対象患者および健常者あわせて112名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・高脂血症の合併につきそれぞれ検討した。高血圧・糖尿病・高脂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。

対象患者および健常者 112 名の臨床データを表 2 に示した。

2) ヒト脳微小血管内皮細胞の培養

ヒト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

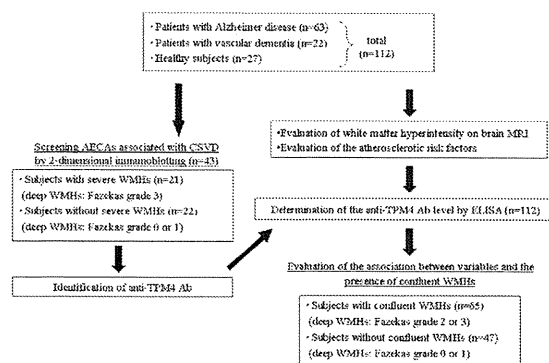
(SYPRORuby) にて全蛋白染色したゲル上の蛋白スポットと画像解析ソフト (Adobe Photoshop 6.0, Adobe Systems) を用いてマッチングを行った。

4) 特異的抗血管内皮細胞抗体の抽出

大脳白質病変と密接に関連する抗血管内皮細胞抗体のスクリーニングとして、上記 112 名のうち、広範な大脳白質病変を合併する 60 歳以上の高齢者 21 名 (アルツハイマー型認知症 10 名、脳血管性認知症 11 名) と大脳白質病変を合併しない 60 歳以上の高齢者 22 名 (アルツハイマー型認知症 10 名、脳血管性認知症 12 名) の抗体反応スポットを比較検討した。その結果、両群それぞれにおいて統計学的

に優位な抗血管内皮細胞抗体の反応スポットを抽出し、その認識抗原蛋白の同定を行った。

図 1) 研究の概略



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

上記 112 名を対象に ELISA 解析により抗 TPM4 抗体価を測定した。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) を用いて作成したプレート上で、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) として反応させた後、マイクロプレートリーダーを用い 450nm の吸光度で測定した。

6) 免疫染色による TPM4 の発現部位の検討

ラット大脳をエーテル麻酔下に 4% paraformaldehyde にて還流固定後に取り出した。取り出した大脳より凍結切片を作成し、一次抗体にウサギ抗ラット

TPM4 ポリクローナル抗体(1:500) [Chemicon, CA, USA]を、二次抗体にヤギビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体[Nichirei, Japan]を用いた ABC 法により免疫組織学的検討を行った。

ヒト大脳微小血管内皮細胞を 12well のプレート上で 37°C 下に一晚培養し、マウスの抗ヒト TPM4 モノクローナル抗体 (1:2500) [Abnova, Taiwan] と 37°C 1 時間反応させた。洗浄後、培養細胞を 4% paraformaldehyde で固定し、Alexa Fluor 抗マウス IgG 抗体を二次抗体として免疫染色を行った。全ての操作は非浸透下で行った。

7) 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 300nM (n=6), 600 nM (n=6) のマウス抗ヒト TPM4 モノクローナル抗体(Abnova, Taiwan)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。

8) 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。Medium で 16 倍に希釈したウサギ抗

ラット TPM4 ポリクローナル抗体血清 (Millipore) 添加の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。

9) Endothelial tube formation assay を用いた血管新生阻害試験

血管新生を *in vitro* で評価するために endothelial tube formation assay (Cell Biolabs) キットを用いた。同測定法は、血管内皮細胞を基底膜外抽出物より成るゲル上で培養することにより、血管内皮細胞の三次元管腔形成能力を測定するものであり、これまでも血管新生を評価する目的で同測定法を用いた報告が多数みられる(Masamune et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.2008; Weskamp et al., Circ Res. 2010)。具体的には Engelbreth-Holm-Swarm tumor cells (50 μ l/well) から調整された細胞外マトリックスゲルで 96-well sterile plates (Becton Dickinson, NJ, USA) を薄く覆った後、37°C で 1 h インキュベートすることにより重合化させた。固層化したゲル上に 40 ng/ml の FGF-2 を含むヒト大脳微小血管内皮培養細胞を 1.2×10^4 cells/well で添加した。さらに 600 nM のマウス抗ヒト TPM4 モノクローナル抗体(Abnova, Taiwan) と抗 TPM4 抗体が高値であった脳血管性認知症患者の血清より抽出した IgG を加えて、5 時間後に顕微鏡で血管内皮細胞の管腔形成の程度を観察した。評価の指標は、管腔の枝分かれの数と全長とした。また、抗体および血清より抽出した IgG をそれぞれ細胞に添加する前

にヒト TPM4 リコンビナント蛋白と反応させた吸収試験を追加して行った。

10) アルツハイマー型認知症に関連する抗血管抗細胞抗体の特異性の検討

本研究において大脳白質病変と密接に関連する抗血管内皮細胞抗体のスクリーニング試験の過程（前述 4）でアルツハイマー型認知症患者に比較的多く存在する 5 つの自己抗体を同定した。これら自己抗体のさらなる特異性の検証のため、対象者数を増やし二次元免疫ブロットによりこれら自己抗体の検出をこころみた。対象者の詳細を表 1 に示す。

表 1)

| | Alzheimer disease | Control subjects with no neurological diseases | | Multiple sclerosis |
|-----------------|-------------------|--|---------------|--------------------|
| Age group | ≥ 60 y | ≥ 60 y | < 40y | All ages |
| No. of patients | 24 | 19 | 18 | 17 |
| Sex, male (%) | 10 (42) | 10 (53) | 10 (56) | 7 (41) |
| Age (year) | 78 (60 to 88) | 72 (60 to 83) | 27 (16 to 35) | 44 (24 to 65) |

11) アルツハイマー型認知症患者における認知機能障害と抗 Tom40 抗体との関連性の検討

抗 Tom40 抗体陽性のアルツハイマー型認知症患者と抗体陰性のアルツハイマー型認知症患者の認知機能を Mini-Mental Scale Examination を用いて評価し、比較検討した。

12) 統計処理解析

- ◆ 広範な大脳白質病変を合併する 60 歳以上の高齢者と大脳白質病変を合併しない 60 歳以上の高齢者のそれぞれに存在する抗血管内皮細胞抗体の反応スポット毎の抗体陽性率の比較は Fisher exact test を用いた。2 群間の連続変数の相違は Mann-Whitney's U test を用い、3 群間以上の連続変数の相違は全体の群間の差を一元配置分散分析で確認した。一元配置分散分析が有意だった場合に、個々の分散の差を least significant difference (LSD) 検定により比較した。
- ◆ 病理学的に大脳深部白質の癒合性病変(DWMHがFRS 2 or 3)が大脳微小血管障害に伴う虚血性変化を反映しているとした従来の報告 (Fazekas F et al., Neurology 1993; Schmidt R et al., Neurology 2004; Young VG et al., Neurology 2008) をもとに下記因子を変数として、単変量および多変量解析により大脳深部白質の癒合性病変との関連性を検討した。
 1. 年齢（対象の平均年齢である 73 歳未満と以上）
 2. 性別
 3. 高血圧の合併
 4. 糖尿病の合併
 5. 高脂血症の合併
 6. 抗 TPM4 抗体[0.78 optical density (OD) (健常者の平均+2SD) を cut off とし、それ以上を陽性とした] まず単変量解析を施行した。単変量解析は χ^2 乗検定, Fisher exact test を用いた。

その後、単変量解析により関連性が認められた因子に関して重回帰分析を施行した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

表 2) 対象患者・健常者の臨床データ

* WMH, white matter hyperintensity

| Variable | No. of subjects (%) |
|---------------------------|---------------------|
| Age, y | 72.1 ± 13.9† |
| Male | 51 (46) |
| Clinical diagnosis | |
| Alzheimer's disease | 63 (56) |
| Vascular dementia | 22 (20) |
| Healthy subjects | 27 (24) |
| Fazekas grade (deep WMH*) | |
| 0 | 13 (12) |
| 1 | 34 (30) |
| 2 | 36 (32) |
| 3 | 29 (26) |
| Anti-TPM4 Ab level** | |
| Alzheimer's disease | 0.64 ± 0.31 |
| Vascular dementia | 0.63 ± 0.25 |
| Healthy subjects | 0.49 ± 0.14 |
| Hypertension | 55 (49) |
| Diabetes mellitus | 29 (26) |
| Hyperlipidemia | 43 (38) |

** Anti-TPM4 Ab, anti-tropomyosin

alpha-4 chain antibody

†Mean ± SD

‡Mean ± SD shown as optical density units

(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。

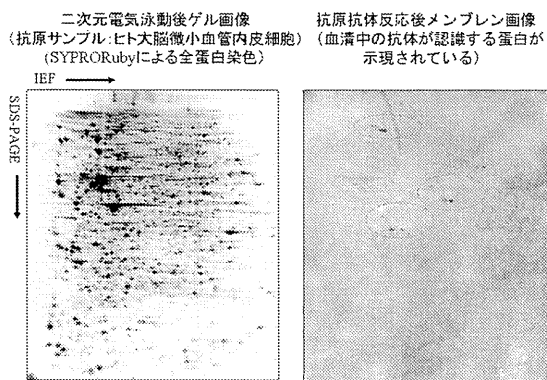
C. 研究結果

1) 抗血管内皮細胞抗体を検出

(抗体反応スポット数の検討)

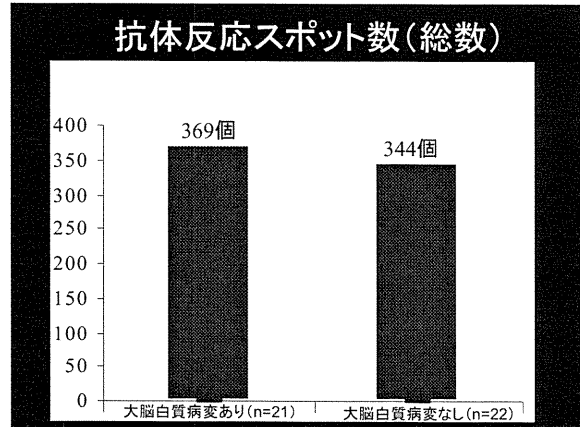
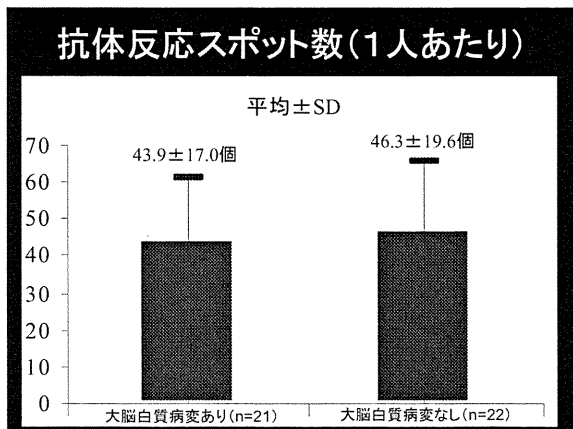
二次元免疫ブロットにより対象者の血清を用いて抗血管内皮細胞抗体を検出した。二次元免疫ブロットの実際を図2に示した。

図2) 二次元免疫ブロットの実際



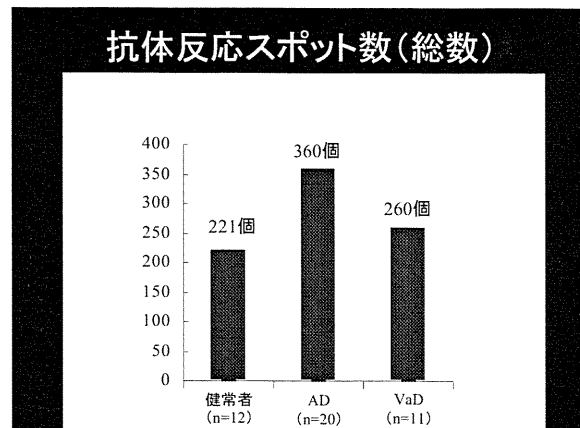
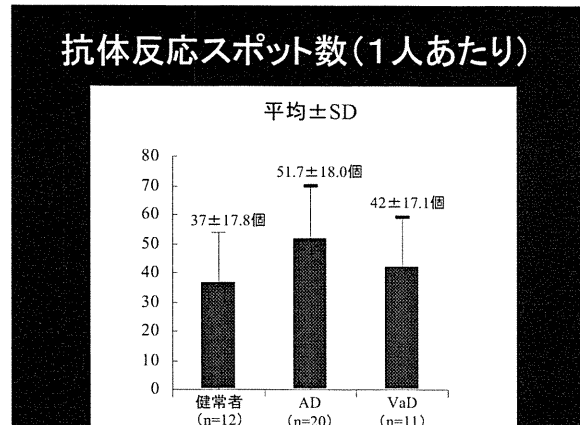
各対象患者・健常者群の抗体反応スポット数(1人あたりと総数)を検討した

① 広範な大脳白質病変の有無での検討 (60歳以上)



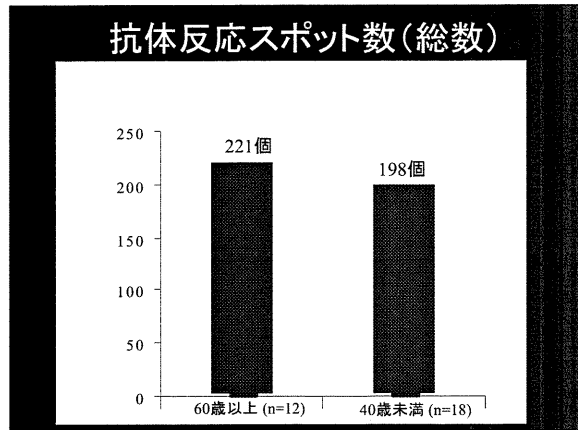
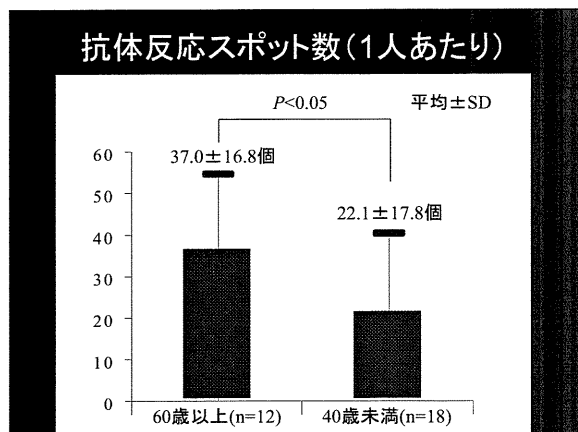
- 広範な大脳白質病変の有無で、一人あたりおよび総数のいずれの抗体反応スポット数に相違はみられなかった。

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

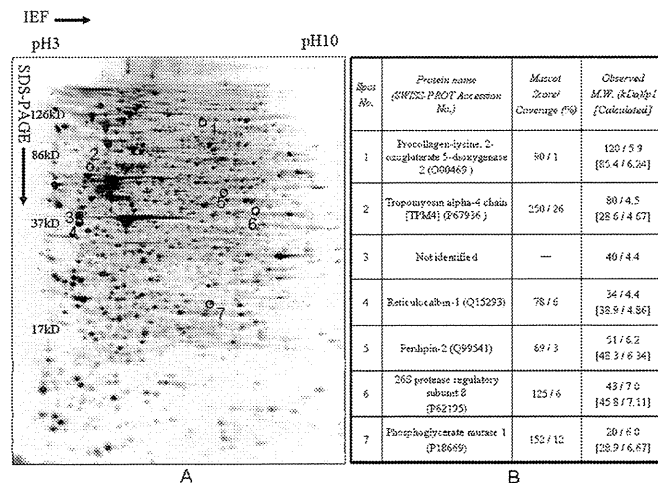


- 年齢別では 60 歳以上の対象者は 40 歳未満の対象者と比較し有意に一人当たりの抗体反応スポット数が多かった。一方総数では相違はみられなかった。

2) 特異的抗血管内皮細胞抗体の抽出と抗体認識抗原蛋白の同定

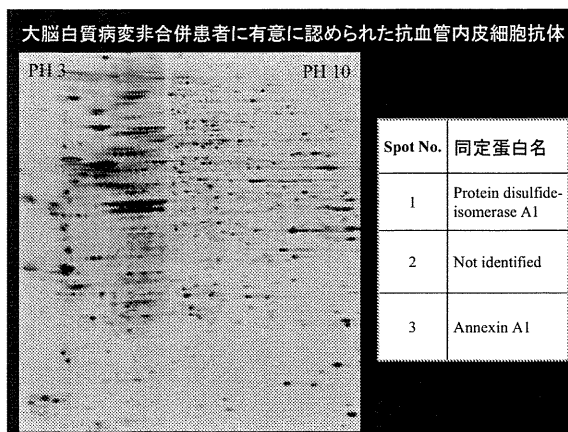
- スクリーニング検査の結果、広範な大脳白質病変合併群ないし非合併群それぞれに特異的な抗血管内皮細胞抗体を抽出し、その認識抗原蛋白を同定した。

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



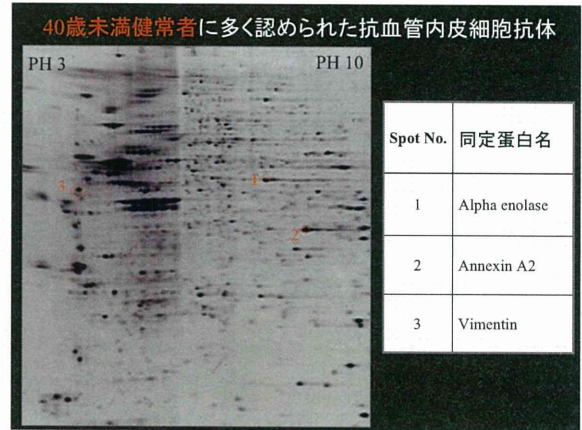
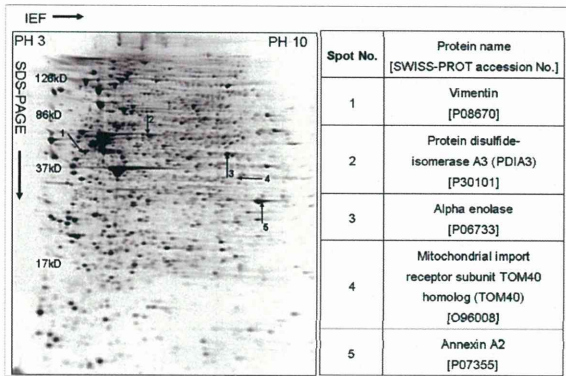
同定した上記 6 つの自己抗体のうち抗 TPM4 抗体の陽性率が 大脳白質病変非合併群で 2% であるのに対し、合併群で 43% と最も高率であった。

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



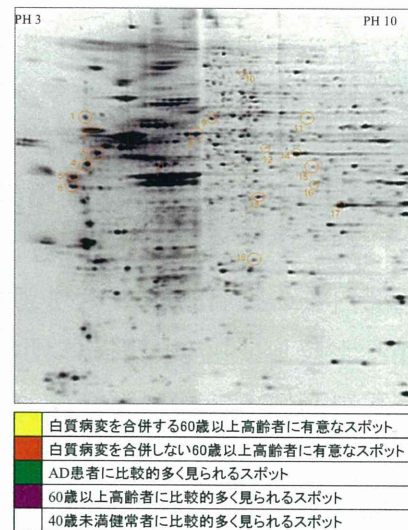
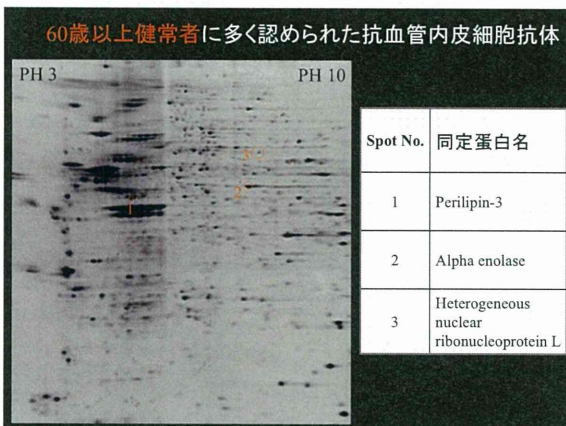
- アルツハイマー型認知症患者、60 歳以上健常者、40 歳未満健常者に比較的多く認められた抗体反応スポットを抽出し、その認識抗原蛋白を同定した。

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



以上①～⑤の質量分析結果のまとめ

④60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



⑤40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

| 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 |

合計 15 種類の認識抗原蛋白を同定した。

3) 抗 TPM4 抗体と癒合する大脳深部

白質病変の関連性の検討

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うち、最も高率に認められた、抗Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4)抗体の特異性につき検討した。まずELISA解析により対象112名の抗TPM4抗体価を測定した。健常者、アルツハイマー型認知症患者、脳血管性認知症患者の3群間における抗TPM4抗体価の検討では、アルツハイマー型認知症と脳血管性認知症患者では健常者に比較すると抗体価が高値の症例が多くみられたが統計学的に有意差はみとめなかった。一方、抗TPM4抗体価と癒合する大脳深部白質病変との関連性を検討した結果、大脳深部白質の癒合性病変合併患者は非合併者と比較して抗TPM4抗体価の平均値が有意に高値であることが確認された(図3)。

さらに、抗TPM4抗体と大脳深部白質の癒合性病変との関連性を明らかにするために、その他の因子(性別・年齢・高血圧/糖尿病/高脂血症の合併)と合わせ単変量および多変量解析を行った。その際、健常者27名の抗TPM4抗体価の平均+2SD値(0.78 OD units)をcut off値として、それより上の値を統計解析上の抗体陽性者と定義した。単変量解析の結果、癒合する大脳深部白質病変と有意に関連する因子は、年齢・高血圧の合併、抗TPM4抗体陽性であった。次にこの3つの因子に関して多変量解析を施行した。結果、年齢と抗TPM4抗体陽性は、癒合する大脳深部白質病変の出現に有意に関連する

因子であることが確認された(表3)。図3)疾患別および大脳深部白質癒合性病変の有無による抗TPM4抗体価の分布

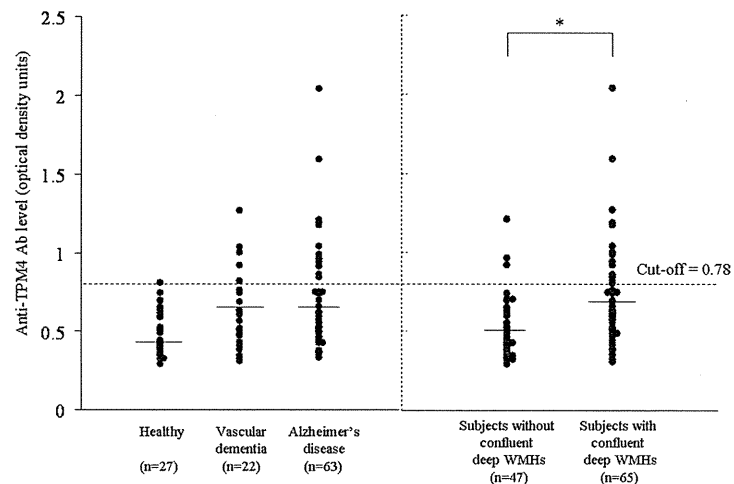


表3) 単変量・多変量解析による大脳深部白質の癒合性病変の出現と各因子との関連性の検討*

| 変数 | 大脳深部白質癒合性病変 | | | | | |
|-----------|-------------|---------|---------|--------|------|--------|
| | 無し | 有り | P 値 | β | P 値 | |
| 年齢 | < 73 y | 28 (68) | 13 (32) | <0.001 | 0.36 | <0.001 |
| | ≥ 73 y | 19 (27) | 52 (73) | | | |
| 性別 | 男性 | 21 (41) | 30 (59) | NS | | |
| | 女性 | 26 (43) | 35 (57) | | | |
| 抗 TPM4 抗体 | 陰性 | 44 (47) | 50 (53) | <0.05 | 0.24 | <0.05 |
| | 陽性¶ | 3 (17) | 15 (83) | | | |
| 高血圧 | 無し | 30 (53) | 27 (47) | <0.05 | 0.15 | NS |
| | 有 | 17 (31) | 38 (69) | | | |
| 糖尿病 | 無し | 33 (40) | 50 (60) | NS | | |
| | 有 | 14 (48) | 15 (52) | | | |
| 高脂血症 | 無し | 32 (46) | 37 (54) | NS | | |
| | 有 | 15 (35) | 28 (65) | | | |

* データは人数(%)

太字イタリックは $P < 0.05$

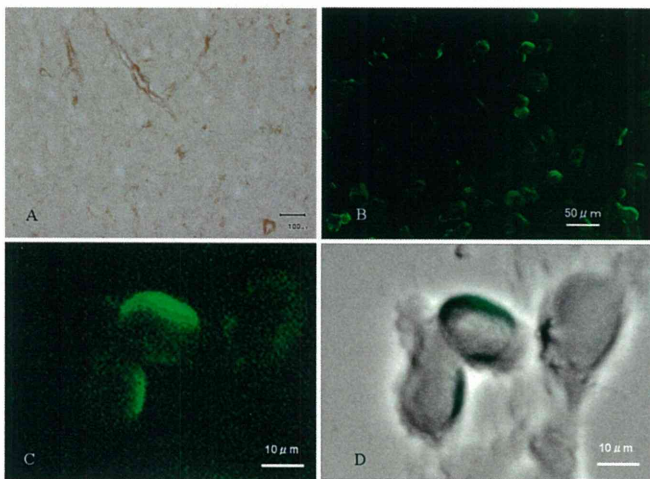
¶ 健常者 27 名の抗 TPM4 抗体価の平均+2SD 値 (0.78 OD units) を cut off 値として、それより上を統計解析上の抗 TPM4 抗体陽性と定義

4) ラット大脳およびヒト大脳微小血管内皮細胞を用いた免疫組織学的検討

ラット大脳凍結切片に対して行った免疫組織学的検討では、抗ラット TPM4 ポリクローナル抗体は、大脳小血管に対して選択的に染色性を示した (図 4 A)。

一方、非浸透下で行ったヒト大脳微小血管内皮培養細胞を用いた免疫染色では、抗ヒト TPM4 モノクローナル抗体は、血管内皮細胞の膜表面に対して反応性を認めた (図 4 B~D)

図 4) 大脳微小血管内皮細胞膜表面における TPM4 の発現



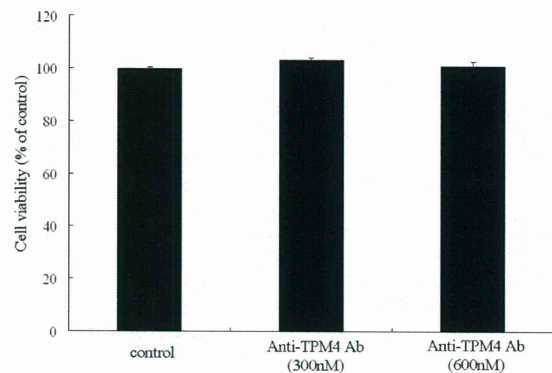
5) 抗 TPM4 抗体の機能解析

5-1) 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 モノクローナル抗体を 300nM, 600nM の濃度で添加し 24 時間 incubation 後、CCK8 を用い生細胞数を計測した。対照は抗体を加えず medium のみ添加したものとした。結果、対照と比較して抗 TPM4 モノクローナル抗体を添加した場合、cell

viability に有意な変化は認められなかった (図 5)。

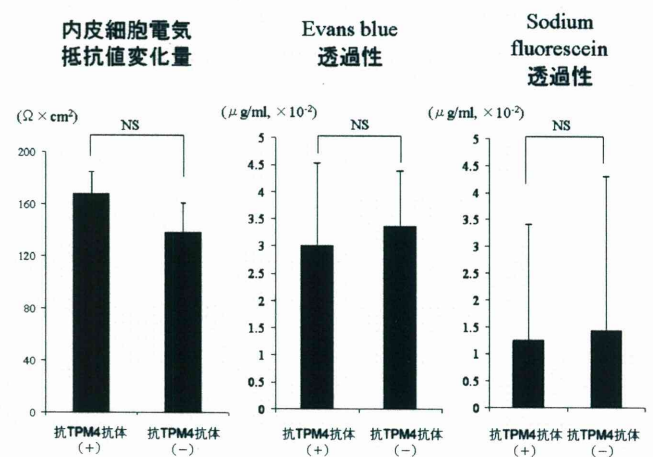
図 5) CCK-8 を用いたヒト大脳微小血管内皮細胞障害性試験



5-2) BBB モデルを用いた血管透過性試験

市販の BBB モデルに medium で 16 倍に希釈したウサギ抗ラット TPM4 ポリクローナル抗体血清を添加し、添加前後における BBB の電気抵抗値の変化量、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 (図 6)。

図 6) BBB モデルを用いた血管透過性試験



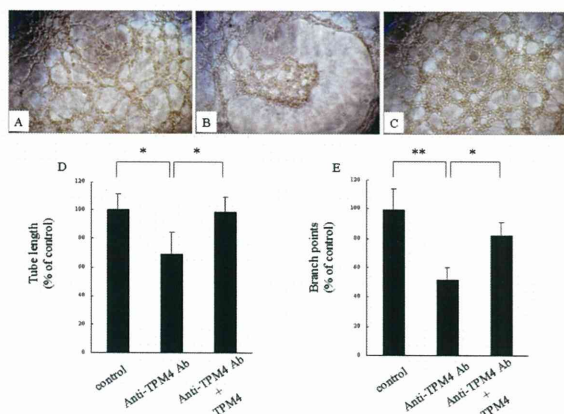
5-3) Endothelial tube formation assay

を用いた血管新生阻害試験

- 抗ヒトTPM4モノクローナル抗体による血管新生阻害

抗TPM4モノクローナル抗体を添加することにより血管新生は著しく阻害された。一方、コントロール（メEDIUMのみ添加）では、管腔形成は正常になされた。抗体添加時の管腔の全長および枝分かれの数は、ともにコントロールと比較して有意に減少した。このモノクローナル抗体による血管新生阻害作用は、抗体添加前にヒトTPM4リコンビナント蛋白を加えることにより改善がみられた（図7）。

図7) ヒトTPM4モノクローナル抗体による血管新生阻害

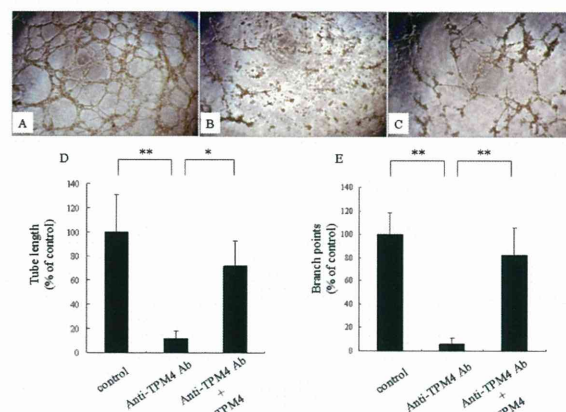


A: コントロール, B: 抗TPM4モノクローナル抗体添加, C: 吸収試験

- 抗TPM4抗体高値患者IgGによる血管新生阻害

抗TPM4モノクローナル抗体添加時と同様に抗TPM4抗体高値患者IgGを添加することにより血管新生は著しく阻害された。またその血管新生阻害作用は、吸収試験により消失した（図8）。

図8) 抗TPM4抗体高値患者IgGによる血管新生阻害



A: コントロール, B: 抗TPM4抗体高値患者IgG添加, C: 吸収試験

6) アルツハイマー型認知症に関連する抗血管抗細胞抗体の特異性の検討

大脳白質病変と密接に関連する抗血管内皮細胞抗体のスクリーニングの過程でアルツハイマー型認知症患者に比較的多く存在する5つの自己抗体を同定した(2-③)。これら自己抗体の認識抗原蛋白はVimentin, Protein disulfide-isomerase A3 (PDI A3), Alpha enolase, Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog (Tom40), Annexin A2であった。これら自己抗体のさらなる特異性の検証のため、対象者数を増やし二次元免疫ブロットにより、これら自己抗体の検出をこころみた(表4)。

5つの自己抗体の中、抗Tom40抗体のみがアルツハイマー型認知症患者において、対照患者ならびに神経疾患非合併者と比較し有意に抗体陽性率が高値であった(図9)。

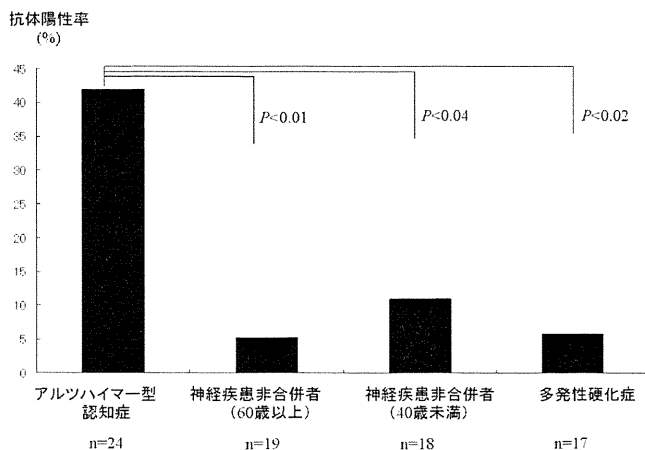
表 4) アルツハイマー型認知症患者の血清中に多く存在する抗血管内皮細胞抗体の対象群別陽性者数

| 抗原蛋白名 | 抗体陽性者数 AD (%) | 抗体陽性者数 神経疾患 非合併者 (≥60 y) (%) | P value |
|---------------|---------------|------------------------------|---------|
| Vimentin | 15 (75) | 6 (50) | 0.145 |
| PDI-A3 | 9 (45) | 2 (17) | 0.104 |
| Alpha enolase | 16 (80) | 8 (67) | 0.332 |
| TOM 40 | 10 (42) | 1 (5.3) | <0.001 |
| Annexin A2 | 13 (65) | 6 (50) | 0.32 |

| 抗原蛋白名 | 抗体陽性者数 AD (%) | 抗体陽性者数 神経疾患 非合併者 (<40 y) (%) | P value |
|---------------|---------------|------------------------------|---------|
| Vimentin | 15 (75) | 5 (28) | <0.01 |
| PDI-A3 | 9 (45) | 4 (22) | 0.128 |
| Alpha enolase | 16 (80) | 10 (56) | 0.204 |
| TOM 40 | 10 (42) | 2 (11) | <0.04 |
| Annexin A2 | 13 (65) | 6 (33) | 0.051 |

| 抗原蛋白名 | 陽性者数 AD (%) | 抗体陽性者数 多発性硬化症 患者 (%) | P value |
|---------------|-------------|----------------------|---------|
| Vimentin | 15 (75) | 5 (31) | <0.02 |
| PDI-A3 | 9 (45) | 4 (25) | 0.128 |
| Alpha enolase | 16 (80) | 8 (50) | 0.52 |
| TOM 40 | 10 (42) | 1 (5.9) | <0.02 |
| Annexin A2 | 13 (65) | 2 (13) | <0.02 |

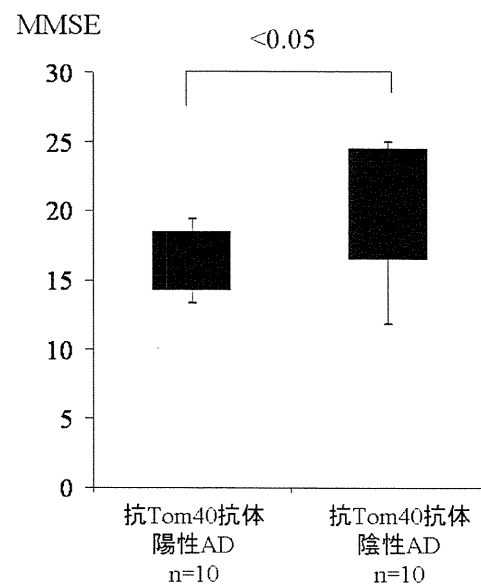
図 9) 対象群別抗Tom40抗体陽性率



7) アルツハイマー型認知症患者における認知機能障害と抗 Tom40 抗体との関連性の検討

抗 Tom40 抗体陽性のアルツハイマー型認知症患者と抗体陰性のアルツハイマー型認知症患者の認知機能を Mini-Mental Scale Examination を用いて評価し、比較検討した。結果、抗 Tom40 抗体陽性のアルツハイマー型認知症患者は抗体陰性のアルツハイマー型認知症患者と比較し有意に MMSE の点数が低い結果となった (図 9)。

図 9) 抗Tom40抗体とMMSE



【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。
- III. 上記の6種類の自己抗体の中、抗TPM4抗体において、その抗体価と大脳深部白質の癒合性病変の出現に有意な相関性を認めた。
- IV. 免疫染色による検討により、TPM4の大脳微小血管内皮細胞膜表面の発現を確認した。
- V. 抗TPM4抗体価が高値（健常者平均+2SD）であることは、大脳深部白質の癒合性病変の出現に関連する独立した因子であることを確認した。
- VI. *in vitro*の実験系において、抗TPM4抗体のヒト大脳微小血管内皮細胞の *viability* やBBBの透過性への影響は確認されなかった。
- VII. Endothelial tube formation assayによる血管新生阻害試験において、抗TPM4モノクローナル抗体および抗TPM4抗体高値患者血清中IgGは、ヒト大脳微小血管内皮細胞の血管新生を阻害した。
- VIII. 健常者の血清中に多く存在する6種類の抗血管内皮細胞抗体を同定した。
- IX. 60歳以上の大脳白質病変非合併患者・健常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。
- X. アルツハイマー型認知症患者の血清中に多く存在する5種類の抗血管内皮細胞抗体を同定した。
- XI. 上記の5種類の自己抗体の中、抗Tom40抗体に関しては、抗体陽性のアルツハイマー型認知症患者において陰性のアルツハイマー型認知症患者と比較し、有意にMMSEの点数が低い結果となった。

D. 考察

今回の検討により、多数の認知症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こりやすく、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。本研究では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中、最も多く認められた抗 Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4) 抗体の病的意義の検討を行った。はじめに ELISA 解析を行い、抗体価と大脳白質病変との関連性につき検討した。その結果、大脳深部白質における癒合性病変の出現と抗 TPM4 抗体価には有意な

相関性が認められた。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。具体的には、Cell counting kit (CCK8) を用いた血管内皮細胞障害性試験、BBB kit を用いた血管透過性試験、tube formation assay を用いた血管新生阻害試験を行った。結果、CCK8 を用いた細胞障害性試験と 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変化はみられなかった。一方、tube formation assay を用いた血管新生阻害試験では、抗 TPM4 モノクローナル抗体および抗 TPM4 抗体高値の患者血清 IgG によりヒト大脳微小血管内皮細胞の血管新生が阻害されことを確認した。

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、今回の免疫組織学的検討の結果、ヒト大脳微小血管内皮細胞膜表面にも発現することが確認された。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 抗体に関しては、これまでに自己免疫疾患である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 tropomyosin 抗体が存在し、疾患との関連性が指摘されている (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、tropomyosin 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、もう一つの仮説としては、組織障害に伴い二次的に抗体が産生された可能性である。

tropomyosin 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、FGF-2 の刺激を介して、細胞膜表面に発現することが報告されている (Guan X et al., Thromb Haemost. 2004) 。広範な大脳白質病変を合併する高齢者においては、

慢性的な脳低還流などによって、FGF-2 の産生亢進がおこり、大脳微小血管内皮細胞膜表面における TPM4 の発現誘導が生じ、その結果として抗 TPM4 抗体が産生される可能性も想定された。一方、膜表面に発現した tropomyosin は、high molecular weight kininogen (HKa) や endostatin などの様々な抗血管新生分子の receptor となることが報告されている (Zhang JC et al., PNAS 2002; Donate F et al., Current Cancer Drug Targets 2004) 。これら抗血管新生分子は、通常の血管新生において必要な血清中の survival factor と tropomyosin との結合を阻害することによりその効果を発揮する可能性が指摘されている。これらの報告と今回我々が行った in vitro での血管新生阻害試験の結果から抗 TPM4 抗体の病的意義に関する仮説として、抗 TPM4 抗体は、増殖期の大脳微小血管内皮細胞に対し、膜表面に発現した TPM4 と結合することにより、survival factor との結合を阻害し、血管新生阻害作用を及ぼし大脳白質病変の進展に関与している可能性を想定した (図 9)。

過去の報告では、大脳深部白質の癒合性高信号病変を有する高齢者ならびにアルツハイマー型認知症患者において MRI 上みられる白質病変部位のみならず、その他の画像上、正常と見られる部位を含めて大脳微小血管の広範な消失が起こっていることが病理学的に確認されている (Brown et al., J Neurol. Sci. 2007) 。これは、単に大脳低還流のみが原因とは考えにくく、何らかの血管新生阻害因子の存在も想定される。今回、我々の研究

では、有意差はみられなかったが、健常者と比較し、脳血管性認知症患者およびアルツハイマー型認知症患者において抗TPM4抗体価が高値となる傾向がみられた。広範な大脳深部白質病変を有する高齢者およびアルツハイマー型認知症患者においては抗TPM4抗体が大脳微小血管の消失をもたらす原因の一つとなっている可能性もあり、今後、抗TPM4抗体の血管新生阻害作用に関して、*in vivo*においてその効果を確認する必要があると考えられる。また、その他の神経疾患を含めたさらに多数例での抗TPM4抗体の測定と大脳白質病変との関連性を検討する必要もあると考えられる。これらの検討により、抗TPM4抗体の、大脳白質病変との関連性が確立したものとすれば、大脳白質病変の血清バイオマーカーとなり、抗体価が高値の症例に対して、抗免疫療法などによる大脳白質病変の進展予防、ひいては認知症や寝たきりの予防につながる可能性も考慮される。

今回、抗TPM4抗体以外にも広範な大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。現在までに、このうちのprocollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2), reticulocalbin-1, phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1)に対

する自己抗体につきELISA解析を行ったが、抗体価と大脳白質病変の程度に相関性は見られなかった。今後、残りのPirilipin 2と26S protease regulatory subunit 8につきELISA解析を行う予定である。

一方、本研究において、60歳以上の大脳白質病変非合併患者・健常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。これらの自己抗体が血管内皮細胞に保護的に作用している可能性もあり、今後さらなる検討が必要と考えられた。

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