

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893006

研究課題名(和文)免疫性小脳失調における新規自己抗体の同定

研究課題名(英文)Identification of auto-antibody in cerebellar ataxia

研究代表者

矢口 裕章 (Yaguchi, Hiroaki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：00421975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で小脳失調患者血清はSez612の細胞外ドメインを認識した。またSez612は質量分析を用いた検討からADDと結合することがわかった。ADDはAMPA受容体の下流シグナル伝達の可能性が他論文で示唆されており、またSez612と同様のドメインを持つタンパク質群はグルタミン酸レセプターの補助サブユニットの可能性が報告されている。そのためSez612とGluR1との結合を検討したところ、細胞外ドメイン同士で直接結合することを発見した。さらに興味深いことに患者血清はこのリコンビナントタンパク同士の結合を阻害した。以上より、患者血清はAMPAからADDのシグナル経路を阻害する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The importance of central nervous system syndrome associated with neuronal surface antibodies has been increasing. We previously reported a new anti-neuronal antibody, anti-Sez612 antibody. Sez612 is highly expressed in the hippocampus and cerebellar cortex and is one of the type 1 membrane proteins. This study showed that the patient serum recognized the extracellular domain of Sez612 and that Sez612 protein bound to both ADD protein and GluR1 protein. These results indicated the molecular mechanism of Sez612 that modulates the function of AMPA receptors and the pathogenesis of anti-Sez612 antibodies in the patient through the inhibition of direct binding between Sez612 and GluR1.

研究分野：神経免疫学

キーワード：抗神経抗体 傍主要性症候群 小脳失調症

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は原因が多岐にわたり、遺伝性小脳失調・多系統萎縮症などの変性疾患から原因不明のものも多く存在する。また、近年変性疾患と感がられていた神経疾患の中に、免疫介在性疾患が含まれていることが多々報告され、その同定には複数の抗神経抗体が重要であることが注目されている。最近15年間で、視神経脊髄炎に対してのアクアポリン4 (AQP4) 抗体や、NMDA 受容体抗体脳炎における NMDA 受容体抗体脳炎や VGKC 抗体脳炎における VGKC 抗体などは、疾患概念の確立と治療法の進歩に大きく寄与している。これまで免疫療法をなされなかった疾患群に治療の機会が認められるようになった。これらの抗体の重要性は膜タンパク質に対する抗体である。膜タンパク質に抗体が結合し、シグナル伝達の異常や膜電位に変化を与える。そのため、抗体が直接的に病原性を呈すること可能性が報告されている。そのため、ステロイドパルス療法のみならず、大量ガンマグロブリン療法や血漿交換療法といった抗体そのものの機能を減ずる治療法の効果が報告されてきた。すなわち、近年において膜タンパクに対する抗神経抗体は診断だけではなく、治療においても重要な意味をもつのである。一方、小脳失調は抗神経抗体が関連する代表的な病型として知られているにも関わらず、その抗体同定研究があまり進んでいない分野である。小脳失調の責任抗体であり、膜タンパク質を抗原とするものは VGCC 抗体など少数である。そのため、我々は小脳失調症を多数経験する実臨床より、抗神経抗体からの小脳失調の分類を試みることが今後重要となるであろうと考えている。

## 2. 研究の目的

複数の神経内科医が関わり、臨床的に詳細に評価された小脳失調例で、かつ遺伝歴が明らかではなく、変性疾患としても非典型的である小脳失調症において自己抗体の同定を検討する。さらにはそれらの症例において、免疫学的機序が想定される原因不明の亜急性小脳失調の症例で自己抗体を検討する。また、その抗体の同定を試みることで、分子生物学的にその抗体がどのような機能を果たすかを検討とする。

## 3. 研究の方法

マウス (B6) の小脳と患者血清を用いた分子生物学的・生化学的解析を行った。ヒト血清

では非特異的バンドの出現も多数みられるため、条件検討を重ね非特異的バンドが見られにくい条件の検討を重ねた。そのうえで、手法としては免疫沈降法と質量分析計を用いた抗原タンパク同定を行った。マウス Sez612 DNA クローニングし、過剰発現系での実験を行った。さらには抗原タンパク質の機能解析を行うために、マウス小脳での Sez612 複合体形成タンパク質の同定を行った。さらには同定されたタンパク質間の結合を、HEK293T 細胞を用いた哺乳類細胞株内実験とリコンビナントタンパクを用いた直接結合実験を行った。最終的に血清を用いた結合阻害実験を試みた。

## 4. 研究成果

我々が本研究で数十例の血清を検討したところ、「網膜症を伴う小脳失調患者」の血清が特異的にマウス小脳のタンパク質を認識した。神経疾患における自己抗体に関しては、非特異的バンドの除外が重要であり、疾患特異性の証明が重要となる。自己抗体の同定方法には、免疫染色や二次元電気泳動など複数の方法が報告されている。我々は、非特異的バンドを極力除去するために、抗体同定方法として、血清を用いた免疫沈降法と質量分析計を用いた実験系を採択した。そしてその結果、我々は免疫沈降がこのような抗原候補タンパクを同定した。複数の候補タンパク質の中から、実際の抗原を同定することも重要となる。そのためさらに我々はその複数の候補タンパク質を分子生物学的手法を用いて、クローニングし、タグつきベクターへサブクローニングとした。そして複数の候補タンパク質を一つずつ HEK293T 細胞株に発現させた。その結果、我々は複数の抗原タンパク質候補から、本疾患での抗原タンパク質は seizure related 6 homolog like 2 (Sez612) タンパク質であることを同定した。その結果は後述の国内学会 (分子生物学会・神経免疫学会) で発表した。また論文発表として臨床神経学の国際誌である Journal of Neurology に採択された。またこれらの実験から、免疫沈降法にても抗原候補として非特異的タンパク質が複数含まれることと、抗原タンパクの同定の難しさを実感した。

さらに、自己抗体に関しては抗原タンパクの存在意味の検討が重要になる。既知の報告とバイオインフォマティクスの解析から、Sez612 タンパク質は型膜タンパク質であることがわかった。膜タンパク質に対する抗体は近年、病原性を呈する自己抗体として注目されている。自己抗体がその抗原に物理的にアクセスするためには、抗体が細胞外ドメインを認識するかどうかの検討が重要となる。そのため、我々は患者血清が Sez612 タンパク質の認識部位を検討した。その結果、

興味深いことに患者血清からの抗体は Sez612 の細胞外ドメインを認識することを発見した。以上より、患者の抗 Sez612 抗体は病原性を呈する可能性が考えられた。

Sez612 タンパク質は 型膜タンパク質であり、これまでグルタミン酸レセプターのような直接的にレセプターを形成するタンパク質としては報告されていない。また直接結合するタンパク質や他のタンパク質群と複合体形成するかも報告されていない。そのため我々はその機序をさらに解明するために、まず Sez612 との結合タンパク質群の検討を行った。マウス小脳と、Sez612 抗体を用いて、免疫沈降とし、その産物を質量分析計で解析をおこなった。その結果、Sez612 は質量分析計を用いた検討から adducin (ADD) ファミリータンパク質の ADD1 と ADD2 と結合することがわかった。Sez612 ファミリータンパク質群はグルタミン酸レセプターと結合するものが多く (Nakayama et al. Neuroscience Research)、さらに ADD タンパク質群の中で、ADD2 は中枢神経に特異的に発現し、そのノックアウトマウスで重篤な神経症状を呈することが報告されている。さらには近年、中枢神経系での重要なシグナル経路であるグルタミン酸レセプターの一つの AMPA 受容体からのシグナル伝達に重要な分子であることが報告されている (Vukojevic et al. EMBO J) ことから我々は、Sez612 が AMPA 受容体から ADD2 へのシグナル伝達に重要なタンパク質である可能性を想定した。Sez612 は前述のように 型膜タンパク質で細胞外ドメインに複数のタンパク結合ドメインを保持している。そのため Sez612 は AMPA 受容体と ADD がシグナル伝達を行う際に複合体形成する上で重要なタンパク質である可能性がある。以上から、自己抗体である抗 Sez612 抗体の病原性と意義を検討するために、Sez612・AMPA 受容体・ADD の複合体形成を検討した。ADD2 をクローニングし、タグ付きベクターへサブクローニングとした。HEK293T の哺乳類細胞株を使用した免疫沈降法で Sez612 と AMPA 受容体の結合と Sez612 と ADD2 の結合を確認した。興味深いことに ADD2 は AMPA 受容体とは結合しなかった。このことには、複合体形成に Sez612 が必須であることを意味している。さらには、タンパク質構造から Sez612 と AMPA 受容体の構造的に直接結合の可能性が考えられるため、昆虫細胞株を用いたリコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降法の実験系も行い、Sez612 と ADD が細胞外ドメイン同士で直接結合することを発見した。患者血清を用いた、結合阻害実験のためには、細胞外ドメインでの直接結合が重要と思われる、上記は重要な知見と思われた。以上より AMPA から ADD へのシグナル伝達系は Sez612 を介して行われる可能性が考えられた。

次には、我々は患者血清が病原性を呈するかどうかを検討した。興味深いことに患者血清はこのリコンビナントタンパク質同士の結

合を阻害した。以上より、我々は、患者血清により、Sez612 が AMPA 受容体と複合体を形成しにくくなり、その結果 AMPA 受容体と ADD の複合体形成が行えなくなることで、AMPA から ADD のシグナル経路が阻害される可能性を考えている。これまでの膜タンパク質に対する抗体の多くは、レセプター構成タンパク質そのものによるものであり、レセプター構成タンパク質と他のタンパク質の結合に重要なタンパク質に対する抗体という概念も重要であると思われる。これらの結果は下記学会で報告し、さらには現在論文投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- 1) Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Kano T, Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, Sasaki H. Identification of anti-Sez612 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. J Neurol. 査読有. 2014 Jan; 261(1):224-6. doi: 10.1007/s00415-013-7134-5.

[学会発表](計 3 件)

- 1) 2015 年 9 月 15 日-16 日  
第 27 回 日本神経免疫学会学術集会  
長良川国際会議場(岐阜県 岐阜市)  
演題名: 抗神経抗体抗原である Sez612 は AMPA 受容体と ADD の複合体を形成しシグナル伝達を促進する  
矢口裕章、高橋秀尚、矢部一郎、渡辺雅彦、畠山鎮次、佐々木秀直
- 2) 2014 年 9 月 4 日-6 日  
第 26 回 日本神経免疫学会学術集会  
金沢歌劇座(石川県 金沢市)  
演題名: 網膜症を伴う亜急性小脳失調症における自己抗体の同定とその機能解析  
矢口裕章、高橋秀尚、奥村文彦、加納崇裕、竹内朗子、堀内一宏、松本雅記、矢部一郎、畠山鎮次、佐々木秀直
- 3) 2013 年 12 月 3 日-6 日  
第 36 回 日本分子生物学会年会  
神戸ポートアイランド  
神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(兵庫県 神戸市)  
演題名: 網膜症を伴う亜急性小脳失調症

における自己抗体の同定とその機能解析  
矢口裕章、高橋秀尚、奥村文彦、加納崇  
裕、竹内朗子、堀内一宏、松本雅記、矢  
部一郎、畠山鎮次、佐々木秀直

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢口 裕章 (Yaguchi, Hiroaki)  
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・  
客員研究員

研究者番号： 00421975

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：