

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19475

研究課題名(和文) プロテオーム解析を用いた慢性炎症性脱髄性多発神経炎の免疫標的分子の同定と病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the immune target molecules in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy by proteomic analysis.

研究代表者

別府 美奈子 (BEPPU, MINAKO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70623669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は慢性進行性または再発性の経過を特徴とする末梢神経疾患である。本研究では、CIDPを病型別に分類しプロテオーム解析を用いCIDPの自己抗体の標的抗原を探索した。ブタの馬尾から抽出した蛋白質を二次元電気泳動で展開し、患者血清を1次抗体としたウェスタンブロットを行い自己抗体が認識する蛋白質を探索した。その結果、CIDP患者血清中のIgGの抗原候補として vinculinという分子を同定した。合成蛋白質を用いたウェスタンブロット法により多検体で検証した結果、抗 vinculin抗体はTypical CIDP症例のみで見られ、CIDPの病態に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) is an autoimmune disorder of peripheral nervous system. Current hypothesis is that humoral immune factors contribute to the autoimmune mechanisms. The aim of this study was to identify the immunological target antigens in subgroups of CIDP by proteomic-based approach. Target molecules of autoantibodies in the patient's sera were investigated among extracted proteins from pig cauda equine by agarose 2-DE and immunoblotting. The candidate molecules were validated by immunoblotting, immunohistochemistry and immunocytochemistry. We found that some patients with CIDP had anti-vinculin autoantibodies. Vinculin exists ubiquitously and plays a key role in the cell adhesion. Our results suggested that vinculin could be a possible immunological target of autoantibodies in a few patients with typical CIDP.

研究分野：神経内科学

キーワード：慢性炎症性脱髄性多発神経炎 プロテオミクス解析 自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は自己免疫機序により末梢神経に脱髄を生じ、筋力低下や感覚障害をきたす疾患である。慢性進行や再発・寛解の経過が特徴であり、重度な身体機能障害に陥ることが少なくない。CIDPの予後は良好であるとは言えず、病態機序の解明と新規治療法の開発は急務である。CIDPの病態については、治療として血漿交換が有効であることや、組織学的に有髄神経線維に抗体や補体の沈着が見られることから、液性免疫が関与している可能性が示唆されている。これまでに行われてきた免疫標的分子の探索研究では、P0蛋白質などのミエリン蛋白質やランビエ絞輪を構成する蛋白質を候補として研究がされてきたが、現時点で免疫標的分子は全く不明である。

CIDPは複数の異なった病態を含む症候群であると考えられており、European Federation of Neurological Societies / Peripheral Nerve SocietyによるCIDP診断基準では、典型的CIDPと非典型的CIDPに分類することが提唱されている。我々はこれまでに、CIDPの各サブグループごとの電気生理学的特徴を明らかにし、またサイトカインプロファイルの違いを示してきた。このことからCIDPの各サブグループにおいて、免疫標的分子が異なることが予想される。しかし、これまでの研究ではCIDPをサブグループに分けて分子病態を解析した研究報告は少なく、本研究ではCIDPをサブグループに分けて研究を行うことにより、病態解明につながることを期待される。

蛋白質同定の手法には大きく分けて2つあり、電気泳動で分離した蛋白質を質量分析計で一つずつ同定していく手法と、サンプル中にある蛋白質を質量分析計で一度に分析するショットガン法に大別される。

電気泳動による手法は、細胞株や組織から抽出した蛋白質を2次元電気泳動で展開・分離し、PVDF膜に転写後、患者血清中IgGを一次抗体としたウエスタンブロットを行う。患者血清と反応した部位に対応するゲル上のスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化でゲルから蛋白質を抽出し、質量分析計で蛋白質を同定する。血中の抗体と抗原の反応を、ウエスタンブロットで直接見て解析するので、同定された蛋白質が標的抗原であるという結果に信頼性が高いが、多検体の検索には時間がかかる。

ショットガン解析を用いた手法は、免疫沈降法を組み合わせた手法で、培養細胞そのものに血清を反応させてから、抗体ビーズを用いて免疫沈降法を行い、患者血清IgGと反応して得られた抗原蛋白質をショットガン解析するものである。本法では細胞株に直接血清を添加していることから、血清中の抗体は細胞外表面の分子と結合しており、標的抗原の局在を加味した解析が可能となる。また、ショットガン解析はハイスループトに多検体の解析が可能である。

2つの方法を用いることでそれぞれの手法の欠点を補い、CIDPの抗体標的分子の探索が可能となる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、プロテオーム解析技術を用いて、CIDP患者血清中のIgGが免疫反応する分子を、培養細胞株や神経組織から抽出した蛋白質中から探索し、有力な抗原候補として複数の蛋白質を同定した。本研究はその成果を発展させ病態に関与する新規エピトープを明らかにし、CIDPの診断・治療のバイオマーカーを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CIDP患者血清IgGの標的抗原の探索

電気泳動を用いた解析による標的抗原探索

ブタ馬尾から抽出した蛋白質を2次元電気泳動で展開・分離し、PVDF膜に転写後、患者血清中IgGを一次抗体としたウェスタンブロットを行った。患者血清と反応した部位に対応するゲル上のスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化でゲルから蛋白質を抽出し、質量分析計で蛋白質を同定した。

免疫沈降法を用いた標的抗原探索

schwannoma細胞株を2種類の質量の異なる安定同位体標識されたアミノ酸を含む培地で培養し、細胞に含まれる蛋白質を標識する。2種類の異なる標識をした細胞の一方に患者血清、もう一方に正常対照の血清を反応させ、免疫沈降法を行い、回収したサンプルを合わせて質量分析計で解析する。

プロテインアレイを用いた標的抗原探索

バイオインフォマティクスのデータベースを使用して、神経組織の細胞膜に局在する蛋白質を選択し、それらを抗原としてプロテインアレイに搭載した。

(2)多症例の検体で抗原候補蛋白質に対する免疫反応があるかを確認

抗原候補となった蛋白質について、CIDP患者33症例と正常・疾患対照の血清で多検体の検証を行った。合成蛋白質を

SDS-PAGEで電気泳動しPVDF膜に転写した後、一次抗体に患者血清を用いてウェスタンブロット法を行った。

(3)標的蛋白質の局在に関する免疫組織学的検討

上述の方法で同定された候補蛋白質について、マウス坐骨神経を用いて、免疫組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) 電気泳動を用いた解析による標的抗原探索

まず患者血清7例について電気泳動を用いた解析をおこなったところ、4つの抗原候補蛋白質が同定された。そのうちデータベース上、plasma membraneに局在があるとされるvinculinを候補とした。次にvinculinの合成蛋白質を用いたウェスタンブロットを行ったところ、CIDP33例中4例で反応がみられ、正常対照26例、疾患対照21例では反応はみられず、vinculinに対する自己抗体はCIDPに特異的なものと考えられた。さらに、抗vinculin抗体陽性の血清を用いて免疫染色を行った。マウスの坐骨神経を用いた免疫染色では、患者血清はミエリンシースに沿って強く反応しており、vinculinも同じ局在であった。一方、正常対照では、ほとんど反応がみられなかった。

(2) 免疫沈降法を用いた標的抗原探索

schwannoma細胞株をSILAC試薬でラベリングし、解析の準備を行った。

(3) プロテインアレイを用いた標的抗原探索

データベース上、神経組織に発現のある1755個の蛋白質を搭載したプロテインアレイを作成し、Typical CIDP 10例、MADSAM 4例、正常対照 4例の血清を用いて解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Beppu M, Sawai S, Satoh M, Mori M, Kazami T, Misawa S, Shibuya K, Ishibashi M, Sogawa K, Kado S, Kodera Y, Nomura F, Kuwabara S. Autoantibodies against vinculin in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol.* 2015 Oct 15;287:9-15. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.07.012. Epub 2015 Jul 29. (査読あり)

〔学会発表〕（計 2 件）

Beppu M, Sawai S, Satoh S, Mori M,
Kazami T, Misawa S, Shibuya K,
Ishibashi M, Sogawa K, Ishige T, Koder
Y, Nomura F, Kuwabara S.

Autoantibodies to vinculin in patients with
chronic inflammatory demyelinating
polyneuropathy. 第 56 回日本神経学会学術
大会 2015 年 5 月 21 日朱鷺メッセ（新潟
県新潟市）

別府美奈子 澤井撰 三澤園子 森雅裕
伊藤彰一 曾川一幸 西村基 松下一之
野村文夫 桑原聡

平山病における血清サイトカインプロファ
イル解析

Serum cytokine and chemokine profiles
in patients with juvenile muscular
atrophy of distal upper extremity
(Hirayama disease). 第 57 回日本神経学会
学術大会 2017 年 5 月 20 日神戸コンベン
ションセンター（兵庫県神戸市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

別府 美奈子 (Beppu, Minako)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70623669