

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008 年度
 課題番号：19790619
 研究課題名（和文） 抗中性糖脂質抗体の神経疾患における作用の解明と診断マーカーの確立
 研究課題名（英文） Clarification of action in diseases of the nervous system of anti-neutral glycolipid antibody and the diagnosis marker's establishment
 研究代表者 三原 貴照（MIHARA TAKATERU）
 藤田保健衛生大学・医学部・講師
 研究者番号：20449458

研究成果の概要：

抗中性糖脂質抗体が脳脊髄根末梢神経炎患者において、その病態に関わっていることが想定されたため、多くの神経疾患におけるスクリーニング方法の開発が必要となった。そのためミニプロティアンマルチスクリーンを用いる一次スクリーニング法を開発し、一度に 20 名までの検体で抗酸性・抗中性糖脂質抗体が検出できるようになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：GlcCer、GalCer、自己抗体、NHLE、Trk、ミニプロティアンマルチスクリーン

1. 研究開始当初の背景

(1) 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (non-herpetic acute limbic encephalitis; NHL E) は亜急性に発症する記憶障害、記銘力低下、てんかん、幻視、睡眠障害などを臨床的特徴とし、ウイルス学的検索においても herpes

simplex virus (HSV)のpolymerase chain reaction (PCR)が陰性で、MRI上の病変が側頭葉内側 海馬、扁桃体などに限局した症候群として見出された (臨床神経、1994)。これらの中には免疫機序が関与した新しいサブ

グループを形成する疾患群が存在するのではないかと考えられ、グルタミン酸受容体 (GluR) に対する抗体や、voltage-gated potassium channel (VGKC)抗体、NMDA抗体 (NR1/2ヘテロマー) などが血清、あるいは髄液から検出される一群があることが広く知られてきている。

(2) 我々のグループは上記以外に、酸性糖脂質と同様に細胞膜上にありシグナル伝達分子の受容体型チロシンキナーゼやG-タンパク、

コレステロール、糖脂質などが局在する特殊構造物である脂質ラフト上に存在するもう一つの主要な糖脂質であり、酸性糖脂質合成の原料となる中性糖脂質に対する抗体の検出を試みた。その結果、再発性多発軟骨炎（RP）に辺縁系脳炎（LE）を合併する複数の症例において全く新規抗体である抗中性糖脂質抗体を発見し報告した。（T Mihara et al. FEBS Lett, 2006）. この抗体はグルコシルセラミド（GlcCer）またはガラクトシルセラミド（GalCer）あるいは両者を認識し、他の中性糖脂質は認識しなかった。われわれが発見したこの抗中性糖脂質抗体は文献上全く新規のもので、抗体の詳細な性状と陽性となる疾患における病因論的意義の解明が待たれる。同抗体陽性となる疾患として同定した症例がNHLE様症状を呈したことから今後NHLEの症例についてもextensiveな研究が望まれる。

2. 研究の目的

以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) NHLE に抗中性糖脂質抗体は関連するのか？

NHLEの患者血清（当科および関連施設で患者の同意もと採取された）を用い、GlcCer、GalCerを抗原として抗中性糖脂質抗体の有無のスクリーニングを行い、その陽性率を求める。また、患者の症状の消長と抗体価の変動を比較する。

(2) 抗中性糖脂質抗体が及ぼす神経細胞生物学的影響とシグナル伝達系への作用の実態を明らかにする

抗中性糖脂質抗体が症状発現に一義的に関与するのであれば神経細胞培養系でその効果を観察出来る可能性が高く、患者血清・髄液を培養系に添加して細胞生物学的に観察する。さらに、培養細胞系を用いてシグナル伝達分子への影響を生化学的・分子生物学的に解明する

(3) 如何に抗中性糖脂質抗体がされたのかその機序を明らかにする

これまでに本来生理的な分子であっても過剰にその分子が生体内に存在する場合その分子に対して抗体産生が生じることがGM2-gangliosidosisのモデルマウスの実験系より明らかになっている。本研究では、患者血清あるいは髄液より全脂質抽出を行い中性糖脂質が正常対照試料より増加していないか

検討する。さらに、剖検脳を用いて、大脳辺縁系が他の脳部位と其中性糖脂質組成が異なるか否かの検証を通じて抗体産生の機序解明に迫りたい。

3. 研究の方法

(1) NHLE に抗中性糖脂質抗体は関連するのか？

本患者血清を用いて抗中性糖脂質抗体のスクリーニングを行う。このため純粋なGlcCer（理化研平林義雄博士より供与）とGalCer（名古屋大学古川鋼一教授より供与）に対する反応性を調べる。具体的には、薄層プレート上に合成GlcCer、GalCerの各種中性糖脂質を塗布し、展開（展開液 クロロホルム:メタノール:蒸留水 = 110:40:6）後、熱転写装置（ATTO社製サーマルプロッター）でP膜に熱及び圧力でこれら糖脂質を転写。この膜を自己免疫的機序が想定される非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者血清を使用して免疫染色を行い陽性バンドの検出を試みる。さらに陽性となった血清を用いて、患者の臨床経過中に採取された他の時期の血清も同様に調べ、臨床経過と抗体価の間に正の相関があるのか否かを明らかにする。我々の予備的検討では、明白な正の相関を示すことが想定されており、この抗体の存在がepiphenomenonを見ているのではないと考えられている。

(2) 抗中性糖脂質抗体が及ぼす神経細胞生物学的影響とシグナル伝達系への作用の実態を明らかにする。

抗中性糖脂質抗体陽性血清を用いて細胞生物学的影響を形態学的に位相差顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて明らかにする。この実験には、自家製のTrk neurotrophin 受容体を高発現するstable transfectantであるPTrk細胞を用いる（Glycoconj.2000）。共焦点レーザー顕微鏡を用いる観察には、種々のシグナル伝達分子に対する抗体を1次抗体として使用しシグナル伝達分子への患者血清の影響を可視化すべく試みる。さらに、神経細胞においては大変重要な役割をもつTrk神経栄養因子受容体機能に及ぼす影響をTrkのNGFによるチロシン自己リン酸化反応に対する影響を観察することから明らかにする。さらに、Trkを始点とする細胞内キナーゼカスケードに位置するキナーゼの活性化状態も併せ明らかに

する。さらに PCTrk 細胞を予め 24 穴ディッシュに培養し、無血清培地に培地交換後患者血清を種々の希釈倍率で添加し、一定時間培養後 NGF 50ng/ml になるように添加し、患者血清の NGF による神経突起伸張反応に及ぼす影響を形態学的に観察すると共に、同細胞からの neurofilament の発現を抗 neurofilament M 抗体を用いてイムノプロット法で調べる。さらに、これら中性糖脂質抗体が PC trk 細胞の脂質代謝に及ぼす影響を明らかにするために、同細胞を【3H】-palmitic acid で whole cell labeling を行い、そこから脂質を描出し型のごとく中性画分と酸性画分(ガングリオシド画分)に分離し、高機能薄層プレート上に添加後、薄層クロマトグラフィで展開し、各々 anisaldehyde, resorcinol 各試薬で染色すると共に、autoradiography で各バンドの放射活性を定量し、患者血清の培養細胞系への影響を解明する。

(3) 如何に抗中性糖脂質抗体が産生されたのかその機序を明らかにする

これまでに本来生理学的な分子であっても過剰にその分子が生体内に存在する場合その分子に対して抗体産生が生じることが GM2-gangliosidosis のモデルマウスの実験系より明らかになっている。つまり、過剰の糖脂質は免疫原性を持ち得ることを示している。したがって、患者血清あるいは髄液より全脂質抽出を行い中性糖脂質が正常対照試料より増加していないか検討する。さらに、剖検脳を用いて、大脳辺縁系が脳の脳部位とその中性糖脂質組成が異なるか否かの検証を脳組織部位特異的に行い、脂質パターンの相違を検討することにより本疾患がなぜ辺縁系でならねばならないのかとの問いに対する解答をしたいと考える。さらに、より直接的にこの抗中性糖脂質抗体の病態形成に果たす役割を明らかにするため、マウスに抗原となる GlcCer あるいは GalCer を腹腔内投与をし抗体産生を促す。また、そのマウスの表現型を明らかにする。

(4) 抗中性糖脂質抗体の存在が細胞内外での情報伝達に如何なる影響を与えるかをラフト構造という観点から見つめ直す。

前述のように、この膜脂質ラフトには種々のシグナル伝達分子が局在して存在し、共存する脂質、特に中性糖脂質との間に濃厚なクロストークが存在していることが知られている。したがって、この中性糖脂質に患者抗

体が結合すれば何らかの影響がラフト内のシグナル伝達分子に及ぶ可能性が想定される。この点を明らかにするために、培養神経細胞株 (PCTrk) に患者血清・髄液を各々作用させ、型のごとく蔗糖密度勾配超遠心法によりラフト画分を調整する。このラフト画分内の種々のタンパクおよび脂質を無処理の細胞群と比較検討する。この検討には、プロテオミクス的手法を用い現有する二次元電気泳動装置により蛋白を分離後様々なシグナル伝達分子に対する抗体でブルーブし、抗体陰性の試料や正常人からのそれを用いた場合について比較検討する。こうした実験を通じ、この新規抗体の性状と疾患における病因論的意義の解明をして行きたいと考える。

4. 研究成果

細胞膜脂質ラフトに存在しシグナル伝達に大きく影響する Trk 神経栄養因子 (NGF) 受容体を介したシグナル伝達系への作用の実態を検討した。Trk を高発現する stable transfectant である PCTrk 細胞を用い、抗体陽性患者血清 (×500) を 30 分作用させ細胞を cold PBS で集めた。その後 TritonX+TNE buffer を加えて homogenize し蔗糖密度勾配超遠心 (18K, 18時間) を行った。各 fraction (1ml) に分画し各フラクションをイムノプロットした。結果、ラフト画分に存在する Trk の量は蔗糖密度勾配法を用いた分画後の免疫染色で減少していたことから、抗中性糖脂質抗体により細胞膜上の Trk が活性化されて細胞内により多く internalize されると考えられた。次に、whole cell を用いた検討では MAPK, Akt などのセリン・スレオニンキナーゼのリン酸化を促進しており、同時に細胞内にチロシンおよびセリン・スレオニン残基の蛋白リン酸化反応も惹起した。これらの結果は、本抗体は細胞膜上に存在する抗原に対して作用する際、同時に細胞内外のシグナリングを司る細胞膜脂質ラフトにも作用して細胞内に新たなシグナルを惹起させる可能性を示唆していると考えられた。この結果を第 48 回日本神経学会総会において発表した。

また、抗中性糖脂質抗体のスクリーニングを各種神経疾患において行った。結果、脳脊髄根末梢神経炎患者の治療前血清において抗体陽性であり、治療後は消失していることが判明した。この結果を第 12 回日本神経感染症学会総会で発表した。

脳脊髄根末梢神経炎患者で本抗体の関与を報告し、予想以上に各種神経疾患でその病態に影響があるのではないかと考えられたことから、まず多数の神経疾患例でスクリーニングをする方法の開発を試みた。

これまでの薄層クロマトグラフィーサーマルプロット法は検出に時間がかかり、また一度に検索できる検体は2例までに限られていることが問題であった。そこで、一度に多数患者の検索を行えるように改善を試みた。TLCプレートに各種中性糖脂質、酸性糖脂質をアプライし、サーマルプロット法を用いてPVDFメンブレンに転写する。そのメンブレンをミニプロティアンマルチスクリーン(バイオ・ラッド)を用いて密閉し、各レーンに200~500倍に希釈した患者血清・髄液を500 μ L注入して反応させ、さらに二次抗体として抗ヒトIgG抗体を用いて発光させる。この方法により一度に20例検索することができるようになった。この方法で陽性となった患者血清・髄液では従来の方法であるサーマルプロット法で再確認した。この成果を第21回日本神経免疫学会学術集会で報告し、反響があった。

今後は、現在の自己免疫介在性の神経疾患、特に脳炎全般、多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、脊髄炎、ギラン・バレー症候群を広くスクリーニングし、一元的・包括的に本抗体が関与している病態を検討したい。本抗体の関与が病因論の一つになる可能性が想定され、新規病態・疾病概念の樹立につながる可能性が想定される。また本抗体の作用機序のさらなる解明を進めたい

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)

武藤多津郎、三原貴照 最近の話題 2. 抗糖脂質抗体 日本内科学会雑誌 査読無 97巻、2008年、84-90頁

[学会発表](計3件)

三原貴照 神経免疫疾患患者に対する抗糖脂質抗体スクリーニング法開発の試み 第21回日本神経免疫学会学術集会 平成21年3月12日 大阪国際会議場

三原貴照 抗GM1抗体陽性急性小脳失調症の1例 第13回日本神経感染症学会総会 平成20年10月11日 日本大学会館

三原貴照 抗中性糖脂質抗体の関与が疑われた脳脊髄根末梢神経炎患者の検討 第49回日本神経学会総会 平成20年5月17日 パシフィコ横浜

[図書](計1件)

H.Hara, T.Miharaら、New Research on Auto-antibodies、NOVA Publishers、2008、13頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

三原 貴照 (MIHARA TAKATERU)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：20449458

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし