

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790833

研究課題名(和文) プロテオーム解析を用いた脱髄型ギラン・バレー症候群の新規標的分子の探索

研究課題名(英文) Searching for the immune target of acute inflammatory demyelinating polyneuropathy by using proteomic analysis.

研究代表者

澤井 摂 (SAWAI SETSU)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10400962

研究成果の概要(和文)：プロテオーム解析の手法で、脱髄型ギラン・バレー症候群の免疫標的分子を探索した。標的分子は、シュワン細胞外層表面にあると予想されるため、シュワノーマ細胞株から蛋白質を抽出し、2次元電気泳動法で展開した後、ウエスタン・ブロット法にて患者血清中 IgG が反応する蛋白質を検出し、質量分析計で解析した。その結果、3つの蛋白質が標的分子候補として挙がり、患者血清中にそれらの蛋白質に対する自己抗体の存在を認めた。

研究成果の概要(英文)：By using proteomic analysis, we searched for the immune target of Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy (AIDP). The target was considered to be the protein on the surface of the Schwann cell. We extract proteins from Schwannoma cell line, and we searched for the protein which reacted with the antibody (IgG) of the patients by 2 dimensional electrophoresis and western blotting. The proteins were identified with mass spectrometer. In the result, 3 proteins were thought to be the possible targets, and we found the autoantibodies against these proteins in the sera of the patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：神経病態免疫学・ギラン・バレー症候群

## 1. 研究開始当初の背景

ギラン・バレー症候群 (GBS) は单相性の疾患であるが、極期には、20-30%の患者において呼吸筋麻痺のために人工呼吸器が必要となる重篤な症状を呈する。急性期治療とし

てプラズマフェレーシスや免疫グロブリン大量療法が行われるが、それらの治療法を施行しても死亡率は約5%であり、20%の患者は半年後に独立歩行が出来ないのが現状である。

こうしたことから、急性期の診断マーカーや新規治療法の開発が必要とされ、そのためには病態機序の解明が不可欠である。

GBSは二大病型に分けられており、一つは末梢神経の脱髄が主病変である脱髄型で、もう一つは軸索障害が主病変である軸索型である。このうち、脱髄型については標的分子、病態機序は明らかにされていないが、これまでの知見からシュワン細胞外層表面に発現する分子が自己免疫の標的分子であると予想されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、脱髄型 GBS 患者血清中の抗体が認識するシュワン細胞外表面の蛋白をプロテオーム解析の手法で検討し、自己免疫のターゲットを同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 培養したシュワノーマ細胞株(YST-1)を蛋白質抽出液中で超音波破碎し、抗原蛋白質を得る。
- (2) 可溶化した蛋白質の分離を、アガロース二次元電気泳動法を用いて行う。
- (3) ウェスタン・ブロッティング法を用いて、血清中 IgG が認識するスポットを検出する。泳動後のゲルを PVDF 膜へ転写し、一次抗体にはヒト血清を用い、二次抗体は HRP 標識抗体を用いて ECL により検出する。血清は脱髄型 GBS、正常対照のそれぞれ 5 症例を用いる。
- (4) ウェスタン・ブロッティング法により PVDF 膜上で得られた画像と、転写する前のゲル画像を比較し、対応する抗原蛋白のスポットをゲル上で確認する。そのスポットを切り出し、ゲル内酵素消化（トリプシン消化）を行って、質量分析計(LTQ: Thermo Scientific 社製)で同定する。
- (5) 合成蛋白質を用い、同定した蛋白に対する自己抗体が実際に存在するかを患者血清中に確認する。

## 4. 研究成果

- (1) 脱髄型 GBS 5 症例の検討で、血清中の IgG が認識するスポットを計 78 個認めた。この 78 個のスポットに対応する蛋白質を、質量分析計で解析し、全部で 431 個の蛋白質を同定した。
- (2) 標的分子はシュワン細胞外表面の蛋白質

との予想されることから、これらの蛋白質のうち、局在が細胞表面であるものを文献的に検討し、3 つの蛋白質を標的分子の候補として選択した。

- (3) 3 つの標的分子候補の合成蛋白質を用い、これらを SDS-PAGE で展開して、血清中 IgG を一次抗体としたウェスタン・ブロット法を行い、これらの蛋白質に対する抗体の存在を確認した。その結果、探索に用いた 5 症例中に、3 つの合成蛋白質それぞれに対しての抗体を持っている症例の存在を認めた。
- (4) 本研究でこれら 3 つの蛋白質が、脱髄型ギラン・バレー症候群の標的分子蛋白質である可能性が示唆された。
- (5) 今後は、ELISA やドット・ブロットを用いて、抗体の存在を多検体で検証し、また、抗原蛋白質でラットを免疫することで疾患モデル動物の作成を行い、抗原蛋白質の病態における関連を検証する。

## 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 8 件)

- ① Sawai S, Misawa S, Kanai K, Iose S, Shibuya K, Noto Y, Fujimaki Y, Sekiguchi Y, Nasu S, Nomura F, Kuwabara S. Altered axonal excitability properties in juvenile muscular atrophy of distal upper extremity (Hirayama disease). Clin Neurophysiol. 2011;122(1):205-9. 査読あり
- ② Noto Y, Shibuya K, Sato Y, Kanai K, Misawa S, Sawai S, Mori M, Uchiyama T, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Kasai T, Tokuda T, Nakagawa M, Kuwabara S. Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: Specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. Amyotroph Lateral Scler. 2011;12(2):140-3. 査読あり
- ③ Sawai S, Umemura H, Mori M, Satoh M, Hayakawa S, Kodera Y, Tomonaga T, Kuwabara S, Nomura F. Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: proteomic analysis. J Neuroimmunol. 2010 25;218(1-2):112-5. 査読あり
- ④ Sawai S, Misawa S, Kobayashi M, Kanai K, Iose S, Shibuya K, Sekiguchi Y, Nasu S,

- Noto Y, Fujimaki Y, Koga S, Ohtani R, Kuwabara S. Multifocal conduction blocks in sarcoid peripheral neuropathy. Intern Med. 2010;49(5):471-4. 査読あり
- ⑤ Misawa S, Hayakawa S, Himuro K, Sawai S, Akaogi Y, Ito S, Kuwabara S. Spinal myoclonus in the periscapular muscles after mastectomy assessed by FDG-PET. Clin Neurol Neurosurg. 2010;112(6):527-9. 査読あり
- ⑥ Taniguchi J, Sawai S, Mori M, Kubo T, Kanai K, Misawa S, Iose S, Yamashita T, Kuwabara S. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy sera inhibit axonal growth of mouse dorsal root ganglion neurons by activation of Rho-kinase. Ann Neurol. 2009;66(5):694-7. 査読あり
- ⑦ Iose S, Kuwabara S, Kokubun N, Sato Y, Mori M, Shibuya K, Sekiguchi Y, Nasu S, Fujimaki Y, Noto Y, Sawai S, Kanai K, Hirata K, Misawa S; Tokyo Metropolitan Neuromuscular Electrodagnosis Study Group. Utility of the distal compound muscle action potential duration for diagnosis of demyelinating neuropathies. J Peripher Nerv Syst. 2009;14(3):151-8. 査読あり
- ⑧ Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, Kaneko S. Physicochemical property changes of amino acid residues that accompany missense mutations in SCN1A affect epilepsy phenotype severity. J Med Genet. 2009;46(10):671-9. 査読あり
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 曾川一幸、MALDI Bio Typer™ を用いたプロテオミクスによる微生物迅速同定法の評価、日本臨床検査自動化学会 42 回大会、2010 年 10 月 9 日、神戸国際会議場
- ② 西村 基、C 型慢性肝障害においては、線維化につれ血中中性脂肪プロファイルは変化する、第 57 回日本臨床検査医学会学術集会、2010 年 9 月 10 日、京王プラザホテル
- ③ 松下一之、新規腫瘍マーカーとしての c-myc 遺伝子転写抑制因子 FIR に対する血清中自己抗体検出の試み、第 57 回日本臨床検査医学会学術集会、2010 年 9 月 10 日、京王プラザホテル
- ④ 澤井 撰、遺伝性神経筋疾患の発症前診断における遺伝カウンセリング — 千葉大病院における 20 例の検討 —、第 17 回日本遺伝子診療学会大会、2010 年 8 月 7 日、三重県医師会館
- ⑤ 宇津野恵美、千葉大学病院遺伝子診療部における脊髄小脳変性症の遺伝カウンセリング ～ 遺伝カウンセリング記録と遺伝学的検査結果の検討 ～、第 17 回日本遺伝子診療学会大会、2010 年 8 月 7 日、三重県医師会館
- ⑥ 澤井 撰、Crow-Fukase 症候群における血清 free light chain 測定の意義、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 22 日、東京国際フォーラム
- ⑦ 金井数明、POEMS 症候群患者血清におけるサイトカインプロファイル解析、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 22 日、東京国際フォーラム
- ⑧ 澤井 撰、千葉大学病院における神経筋疾患の発症前診断に対する遺伝カウンセリング、第 34 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、2010 年 4 月 29 日、東京女子医科大学、弥生記念講堂
- ⑨ Nomura F, Measurement of serum 5.9 kDa fragment of fibrinogen  $\alpha$  chain (FIB 5.9) by MALDI-TOF MS with stable-isotope labeled standard in patients with liver diseases.、MSACL 2010、2010 年 2 月 8 日、San Diego, CA
- ⑩ 澤井 撰、MALDI-TOF MS を用いたプロテオーム解析による多発性硬化症における疾患活動性マーカーの探索、第 41 回日本臨床検査自動化学会大会、2009 年 10 月 10 日、パシフィコ横浜
- ⑪ 澤井 撰、プロテオーム解析による多発性硬化症、視神経脊髄炎(NMO)の血清再発マーカー探索、第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 22 日、仙台国際センター
- [産業財産権]
- 取得状況 (計 1 件)
- 名称：多発性硬化症または NMO の検査マーカーの測定方法
- 発明者：澤井撰、梅村啓史、森雅裕、桑原聡、野村文夫、清川巖、三浦俊英、小島良、片山勝博
- 権利者：国立大学法人 千葉大学 外 1 名

種類：特許  
番号：特許公開 2010-7178  
取得年月日：2010年4月2日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤井 摂 (SAWAI SETSU)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：10400962