

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790976

研究課題名（和文）プロテオミクスによる脱髄型ギラン・バレー症候群の新規標的分子の同定

研究課題名（英文）Identification of immune target for acute inflammatory demyelinating polyneuropathy by 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、Schwann 細胞外層表面にあると予想されるため、Schwannoma 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、疾患 22 症例中 7 症例で自己抗体陽性となる抗原候補蛋白質を認めた。この自己抗体は、正常対照や軸索型ギラン・バレー症候群ではほとんどみられず、疾患特異的な可能性が示唆された。

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. Among 22 patients, 7 had autoantibody for this protein, but normal controls and patients with axonal type of GBS rarely had. It may suggest this protein is specific immune target of AIDP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：ギラン・バレー症候群・プロテオーム解析・神経免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

ギラン・バレー症候群 (GBS) は単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。

GBS は軸索型と脱髄型の二大病型に分けられる。これまでの研究で、軸索型は、キャンピロバクターを始めとする細菌表面上の構造と末梢神経軸索上のガングリオンドとの構造が類似しているため、「分子相同性による交叉免疫」による発症機序がほぼ確立されている。

脱髄型 GBS ではこれまで多くのミエリン構成蛋白質が標的分子として検討されたが、いずれも否定的な結果に終わっており、標的

子や病態機序は不明である。

Hafer-Macko らは脱髄型 GBS 症例の剖検所見で、Schwann 細胞の外層に沿って補体の沈着を認め、患者血清中の抗体が Schwann 細胞外層表面の標的分子に結合することで補体を活性化し、ミエリンの小胞性分解を引き起こし、マクロファージが集簇して障害されたミエリンを除去する、というメカニズムを推測した。すなわち、Schwann 細胞膜上に発現する蛋白質が標的分子として有望であると予想される。

## 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 Schwann 細胞外表面の蛋白質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した。

## 3. 研究の方法

(1) Schwannoma 細胞株 (YST-1) より抽出した蛋白質を 2 次元電気泳動で分離し、PVDF メンブレンに転写して、患者血清を 1 次抗体、抗ヒト IgG 抗体を 2 次抗体としたウエスタン・ブロットにより、脱髄型 GBS 患者血清中 IgG と反応する蛋白質を探索した。

(2) 血清が反応した蛋白質を同定するため、血清 IgG と反応がみられた箇所をゲルより切り出し、ゲル内トリプシン消化を行い、得られた抽出物を質量分析計 (LTQ XL, Thermo Scientific) で解析した。

(3) 同定した蛋白質に対する自己抗体の存在を多検体で検証するため、その合成蛋白質を用いて、脱髄型 GBS (N=22)、軸索型 GBS (N=18)、正常対照 (N=46) について、血清を 1 次抗体、抗ヒト IgG 抗体を 2 次抗体としてウエスタン・ブロットを行った。

(4) 同定した蛋白質の Schwannoma 細胞株における局在を蛍光免疫染色で評価した。

## 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 (図 1、2)。

1次抗体:患者血清  
2次抗体:抗ヒトIgG



図1. ウエスタンブロット

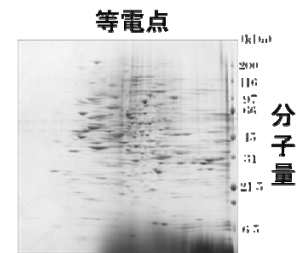
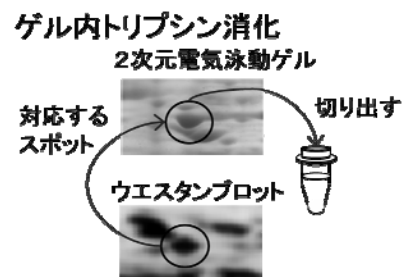


図2. 2次元電気泳動

(2) この 78 個のスポットに対応するゲル上の箇所を切り出し、ゲル内トリプシン消化を行い、得られた抽出物を質量分析計 (LTQ XL, Thermo Scientific) で解析し (図 3)、蛋白質データベース (SwissProt) 検索により、全部で 431 個の蛋白質を同定した。



蛋白質同定



LTQ XL (Thermo scientific)

図3

(3) 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。

(4) 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、脱髄型 GBS 22 症例中 7 症例で抗体陽性となる蛋白質を認めた。正常対照や軸索型 GBS ではほとんど認めないことから、脱髄型 GBS の病態に特異的に関連することが示唆された。

(5) Schwannoma 細胞の蛍光免疫染色で、患者血清が抗原候補蛋白質の存在部位を認識することを確認し (図 4)、その局在から髄鞘化に関連することが示唆された。

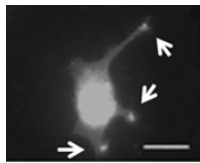


図4

## 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 5 件)

(1) Ishige T, Sawai S, Itoga S, Sato K, Utsuno E, Beppu M, Kanai K, Nishimura M, Matsushita K, Kuwabara S, Nomura F. Pentanucleotide repeat-primed PCR for genetic diagnosis of spinocerebellar ataxia type 31. *J Hum Genet.* 2012 Dec;57(12):807-8. 査読あり  
doi: 10.1038/jhg.2012.112.

(2) Kanai K, Sawai S, Sogawa K, Mori M, Misawa S, Shibuya K, Iose S, Fujimaki Y, Noto Y, Sekiguchi Y, Nasu S, Nakaseko C, Takano S, Yoshitomi H, Miyazaki M, Nomura F, Kuwabara S. Markedly upregulated serum interleukin-12 as a novel biomarker in POEMS syndrome. *Neurology.* 2012 Aug

7;79(6):575-82. 査読あり

doi: 10.1212/WNL.0b013e318263c42b.

(3) Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Koderu Y, Matsushita K, Nomura F. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics.* 2012 Jul;12(13):2190-202. 査読あり  
doi: 10.1002/pmic.201100655.

(4) 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 Mar;12(2):140-3. 査読あり  
doi: 10.3109/17482968.2010.541263.

(5) 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 Jan;122(1):205-9. 査読あり  
doi: 10.1016/j.clinph.2010.06.015.

[学会発表] (計 10 件)

① Setsu Sawai, Moesin is a possible target molecule in cytomegalovirus-related Guillain-Barre syndrome, 11th International Congress of Neuroimmunology, 2012 年 11 月 5 日, Boston (USA)

② 澤井 撰、千葉大学病院における脊髄小脳変性症の遺伝学的検査と遺伝カウンセリング、日本人類遺伝学会 第 57 回大会、2012 年 10 月 27 日、京王プラザホテル

③ 澤井 撰、Repeat-primed PCR法を用いた脊髄小脳失調症 31 型の遺伝学的臨床検査、第 53 回日本神経学会学術大会、2012 年 05 月 22 日、東京国際フォーラム

④ 別府 美奈子、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーにおける血清サイトカインプロファイル解析、第 53 回日本神経学会学術大会、2012 年 05 月 22 日、東京国際フォーラム

⑤ 西村 基、血清からの Apolipoprotein E

isoform タイピング、日本臨床検査自動化学会第 43 回大会、2011 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜

⑥石毛 崇之、千葉大学病院における脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) 遺伝学的検査の現状、日本臨床検査自動化学会第 43 回大会、2011 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜

⑦山本 はるな、血中 BJP 型モノクローナル蛋白検出法の比較検討、日本臨床検査自動化学会第 43 回大会、2011 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜

⑧澤井 撰、POEMS 症候群における血清 free light chain 測定の意義、日本臨床検査自動化学会第 43 回大会、2011 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜

⑨佐藤 謙一、Triplet repeat primed PCR (TP-PCR) 法を用いた異常伸長 Triplet repeat の簡便・迅速な検出、日本臨床検査自動化学会第 43 回大会、2011 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜

⑩澤井 撰、Crow-Fukase 症候群における血管新生因子 (VEGF, bFGF, HGF) の動態、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年 5 月 20 日、名古屋国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤井 撰 (SAWAI SETSU)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10400962