

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860698

研究課題名(和文) SEREX/CEREX法によるMS患者血清/髄液中、新規自己抗原の検索

研究課題名(英文) Identification of antigens recognized by serum and cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis patients using SEREX and CEREX.

研究代表者

武藤 真弓 (Muto, Mayumi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10623671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(MS)患者血清中の新規自己抗体の存在を明らかにするために、遺伝子ライブラリーを用いて網羅的に血清中IgGの標的抗原を探索するSEREX法を用いた検討を行った。MS患者血清から複数の自己抗原候補蛋白質が同定され、AlphaLISA法を用いて多数例での検討を行った結果、MS患者血清中の抗TLN1抗体はオリゴクローナルバンドやIgG indexと負の相関を認め、抗TLN1抗体がMSの病態において保護的な因子である事が示唆された。またSEREX法の血清の代わりに髄液を用いる「CEREX法」を開発し、MSのバイオマーカーとなり得る可能性のある複数の自己抗原候補蛋白質を同定した。

研究成果の概要(英文)：In the pathogenesis of multiple sclerosis (MS), B cell/antibody-related mechanisms have recently received attention. To investigate the role of autoantibody in MS, we performed SEREX which can identify autoantibody cyclopedically. We identified serum antibodies against cytoskeletal protein talin1, and the levels of whom were remarkably higher in 39 MS than 43 normal controls ($P < 0.01$) and 35 disease controls ($P = 0.06$), and in MS patients without oligoclonal bands than ones with them. Moreover, we found the negative-correlations between serum anti-talin1 antibody and IgG index in MS ($P = 0.03$). Anti-talin1 antibody exists in MS patients' sera, which may have some protective factor. In addition, we developed "CEREX" using cerebrospinal fluid instead of SEREX using sera, and identified several autoantigens which have a potential to be a biomarker of MS.

研究分野：神経内科

キーワード：多発性硬化症 SEREX法 発現クローニング AlphaLISA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)は中枢神経に炎症性脱髄性病変を生じ、通常再発と寛解を繰り返しながら障害が蓄積していく神経難病である。有病率は日本では10万人当たり7人程度だが欧米では100人を超す地域もあり、その病態の解明、治療法の開発は地球規模で希求されている。多発性硬化症の病態として、ウイルス抗原などで感作された活性化T細胞が脳血液関門を通過して脳内に浸潤し、神経軸索を覆う髄鞘を破壊して多発性硬化症病理の特徴である「脱髄」をきたす、という機構が考えられてきた。一方、近年、B細胞上に発現するCD20に対するモノクローナル抗体療法が多発性硬化症に極めて有効であることが明らかになり、B細胞/抗体系もその病態に深く関与することが改めて認識され、注目を集めているが、その標的抗原は明らかになっていない。

2. 研究の目的

遺伝子ライブラリーを用いて網羅的に血清中IgGの標的抗原を探索するSEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 法により、多発性硬化症患者血清中の新規自己抗体の存在を明らかにすることを目的とした。SEREX法は癌の診断マーカーの検索に利用されており、特定の細胞内にある遺伝子をほぼ網羅的に解析できる特徴を有し、未知の抗原検索において力を発揮する手法である。今回はさらに同法を応用し、血清の代わりに患者髄液を用いて行った。これはCEREX(CSF analysis of cancer antigens by recombinant cDNA expression cloning)法とも呼ぶべき、新規の方法である。

さらに、同定された遺伝子の自己抗原候補蛋白と多数の患者の血清・髄液中IgGとの反応を見るのに、今回、化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイを用いることとした。これは二つのビーズが近接したときのみ発する化学発光を捉える手法で、微量検体で高感度に測定できるシステムである。これらの手法を駆使し、MS患者血清・髄液の認識する新規自己抗原を検索した。

3. 研究の方法

(1): ヒトU-87 MG glioblastoma cell lineから作製したcDNAライブラリーを用い蛋白を発現させ、1名の再発寛解型多発性硬化症患者血清と反応させるSEREX法を施行した。(2)多発性硬化症患者血清と自己抗原候補タンパクとの反応を多数検体を用いて検証するため、recombinant cDNAを用いて組換えタンパクを発現、精製し、これらを抗原として多数の患者血清を用いてAlphaLISA法で抗体価を検討した。

(3)候補蛋白に対する抗体陽性患者の臨床的・検査上の特徴を解析した。

(4)SEREX法を応用し、我々が“CEREX (cerebrospinal fluid identification of antigens by recombinant expression cloning) 法”と命名した手法を、MS患者9名の急性期髄液を用いて行った。

(5)上記と同様に recombinant cDNA を用いて組換え蛋白を発現、精製し化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイで多数例での検討を行った。

(6)候補蛋白に対する抗体陽性患者の臨床的・検査上の特徴を解析した。

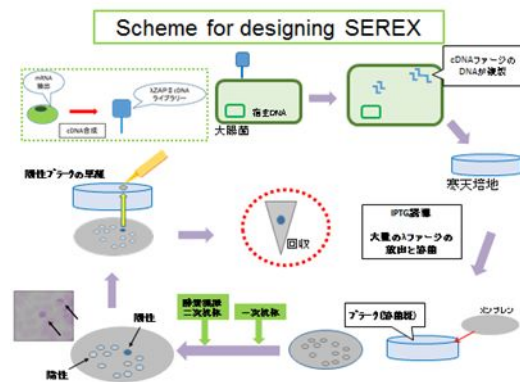
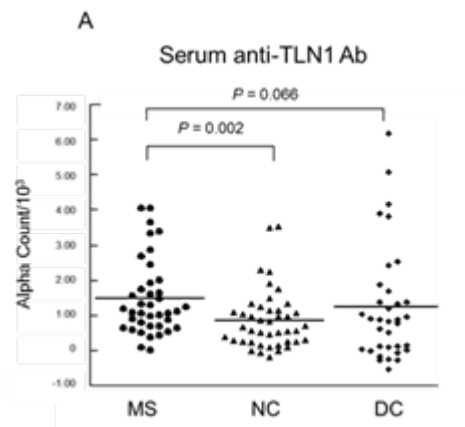


図: Scheme for designing SEREX

4. 研究成果

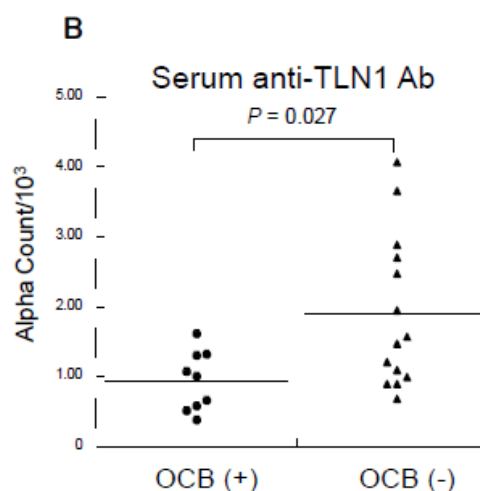
(1)自己抗原タンパク候補として、Homo sapiens talin 1 (TLN1)を含む3つの蛋白が同定された。

(2)抗TLN1抗体価は、健常対照群と比較してMS群で有意に高値であった(図A: MS vs NC; $P=0.002$)。



(3)抗TLN1抗体価はOCB陽性群に比べてOCB陰性群で有意に高値であった(図B: $P=0.027$)。さらに抗TLN1抗体価はIgG index高値群に比べて低値群で高値($P=0.026$)であり、またIgG indexと抗体価には負の相関を認めた。これらの結果は中枢でのモノクローナルな抗体産生の抑制を示唆し、これはT/B細胞の脳血液関門通過の抑制、中枢でのB細胞系の活性化の抑制が原因として考えられる。よって抗TLN1抗体はMS病態において保護的に作用していることが想定された。さらに抗TLN1

抗体の経時的変化をみると、抗 TLN1 抗体価は寛解期より急性期に高く ($P=0.051$)、かつ再発直後ではなく数日後にピークとなっており、抗 TLN1 抗体が再発後に保護の因子として産生される機序を想定した。



今回同定された talin1 はリンパ球に発現する接着因子である VLA-4 や LFA-1 に働きかけて、脳血管内皮細胞に存する受容体との接着 (adhesion) を促進する働きがある。また LFA-1 は、リンパ球の接着だけでなく、中枢への移入 (migration) に関与しており、さらに MS のモデルマウスである EAE の病理において、LFA-1 が脳炎誘発性 T 細胞の表面に存在しており、LFA-1 の関与が確認されている。この点から MS 血清中の抗 Talin1 抗体の働きについて、

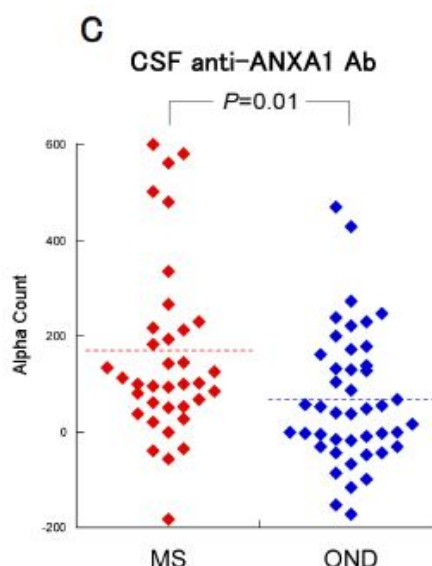
リンパ球の VLA-4 や LFA-1 を介した内皮細胞への接着 (adhesion) を阻害して、中枢へ移行するのを抑制する作用、また、

リンパ球が LFA-1 を介して血管内皮細胞を通り、中枢へ移入 (migration) するのを阻害する作用、をもつことが考えられた。

また MS の disease modified therapy である Natalizumab は、ヒト 4 インテグリンサブユニットに対するヒト化モノクローナル抗体であり、接着因子 VLA-4 と脳血管内皮細胞に発現する VCAM-1 の結合を介した活性化 T 細胞の脳血液関門通過を阻害するのが主な作用と考えられている。MS における再発抑制効果は非常に強く、また、これまでに OCB 陽性患者がナタリズマブ使用後に OCB 陰転化すること、IgG index 低下をきたす作用などが報告されている。今回の検討では抗 TLN1 抗体は OCB 陰性群や IgG index 低値群で高いという結果であり、この事からも、抗 TLN1 抗体が natalizumab と同様に、T/B 細胞の脳内侵入を阻止する可能性が想定された。

(4.5) SEREX 法により annexin (ANXA1) を含む複数の蛋白が同定され、7 つが精製に至った。髄液抗 ANXA1 抗体価は疾患対照群と比較して MS 群で有意に高かった (図 C: $P=0.007$)。

また、血清抗 ANXA1 抗体価も健常対照群と比較して MS 群で有意に高かった ($P < 0.001$)。



(6) 髄液抗 ANXA1 抗体価は髄液蛋白と有意な相関がみられ ($P=0.002$)、年齢とも相関する傾向があった ($P=0.07$)。また OCB 陽性群は陰性群と比較し、抗 ANXA1 抗体の髄液抗体価が高値となる傾向がみられた ($P=0.08$)。Annexin はカルシウムおよびリン脂質に結合するタンパク質ファミリーであり、小胞輸送やエンドサイトーシス、エキソサイトーシスなどに関与すると報告されている。特に ANXA1 は中枢神経系組織での発現が従来知られており、さらにマクロファージやリンパ球などで特に多く発現すること、MS や EAE の脱髄病変においても高発現していることなどが報告されている。髄液・血清中の抗 ANXA1 抗体は疾患マーカーの候補であり、また ANXA1 が MS 病態においてなんらかの役割を果たしている可能性があるかと想定された。

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)

Muto M, Mori M, Sato Y, Uzawa A, Masuda S, Uchida T, Kuwabara S. Current symptomatology in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur J Neurol*. 2015; 22(2):299-304. (IF: 3.852)(査読あり)

Uzawa A, Mori M, Muto M, Uchida T, Masuda H, Masuda S, Kuwabara S. Benign neuromyelitis optica is rare in Japanese patients. *Mult Scler*. 2014 Dec 5. [Epub ahead of print] (IF: 4.863) (査読あり)

Masuda S, Mori M, Arai K, Uzawa A, Muto M, Uchida T, Masuda H, Kuwabara S. Epstein-Barr virus persistence and reactivation in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Nov 28.

[Epub ahead of print] (IF: 5.58) (査読あり)

Uzawa A, Mori M, Sawai S, Masuda S, Muto M, Uchida T, Ito S, Nomura F, Kuwabara S. Cerebrospinal fluid interleukin-6 and glial fibrillary acidic protein levels are increased during initial neuromyelitis optica attacks. Clin Chim Acta. 2013 Jun 5;421:181-3. (IF: 2.748) (査読あり)

Uzawa A, Mori M, Masuda S, Muto M, Kuwabara S. CSF high-mobility group box 1 is associated with intrathecal inflammation and astrocytic damage in neuromyelitis optica. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013 May;84(5):517-22. (IF: 5.58) (査読あり)

Uzawa A, Mori M, Taniguchi J, Masuda S, Muto M, Kuwabara S. Anti-high mobility group box1 monoclonal antibody ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Exp Immunol. 2013 Apr;172(1):37-43. (IF: 3.278) (査読あり)

Muto M, Mori M, Sato Y, Uzawa A, Masuda S, Kuwabara S. Seasonality of multiple sclerosis and neuromyelitis optica exacerbations in Japan. Mult Scler. 2013 Mar;19(3):378-9. (IF: 4.863) (査読あり)

Uzawa A, Mori M, Muto M, Masuda S, Kuwabara S. When is neuromyelitis optica diagnosed after disease onset? J Neurol. 2012 Aug;259(8):1600-5. (IF: 3.841) (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

武藤真弓、鶴沢顕之、増田冴子、内田智彦、榊田大生、森雅裕、桑原 聡. 多発性硬化症と視神経脊髄炎において特徴的な臨床徴候の比較. 第 26 回日本神経免疫学会、金沢歌劇座(石川県金沢市)2014 年 9 月 5 日.

武藤真弓、鶴沢顕之、増田冴子、内田智彦、榊田大生、森雅裕、桑原 聡. 多発性硬化症に特徴的とされてきた神経症候の多くは視神経脊髄炎でより高頻度に認められる. 第 55 回日本神経学会学術大会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)2014 年 5 月 22 日.

Masahiro Mori, Mayumi Muto, Takaki Hiwasa, Akiyuki Uzawa, Saeko Masuda, Tomohiko Uchida, Hiroki Masuda, Satoshi Kuwabara. Identification of novel candidate autoantigens in multiple sclerosis by expression cloning. The XXI World Congress of Neurology. 24 September 2013 Reed Messe Wien GmbH Congress Center Vienna, Austria.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 真弓 (MUTO, Mayumi)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：10623671

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：