

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590927

研究課題名（和文） 脱髄性神経疾患の新規自己抗原の解明

研究課題名（英文） Detection of new self-antigens of demyelinating nervous diseases

研究代表者

氏名（ローマ字）：森 雅裕（MASAHIRO MORI）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70345023

研究成果の概要：

慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーおよび多発性硬化症に関し臨床像をまとめるとともに、SEREX 法を用いて複数の患者血清・髄液を用い glioma 及び schwannoma のライブラリーから新規自己抗原を探索した。その結果、複数の候補蛋白をコードする遺伝子を得た。その遺伝子から蛋白精製までにいたったものもあり、おおむね順調に進展していると考えた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	500,000	0	500,000
平成19年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成20年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	870,000	4,270,000

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

キーワード：多発性硬化症、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、SEREX 法

1. 研究開始当初の背景

神経系の自己免疫疾患にはいくつかの疾患が知られているが、その中で脱髄が主たる病態であるものに多発性硬化症と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーが存在する。前者は中枢神経系の、後者は末梢神経系が病気の首座になるが、両者の合併例も存在し、病態

の一部は似通っている可能性が指摘されている。前者は最近、その一亜型（視神経脊髄型多発性硬化症）で水分子のチャンネルが標的抗原になっていることが示されたが、その他の亜型（通常型多発性硬化症）および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーはともに髄鞘蛋白が自己抗原となっている可能性が

指摘されているものの、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

期間内に通常型多発性硬化症と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーに関し、SEREX(serological analysis of cancer antigens by recombinant cDNA expression cloning)法を用いることにより新規自己抗原を同定することを目的とする。

1) 研究の方法

1. すでに入手済みの glioma cell の cDNA ライブラリーと保存してある多発性硬化症・慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー及び両者の合併症例の血清および髄液を反応させ、抗原抗体反応により、疾患特異的な抗原蛋白を S E R E X 法にて探し出す。

2. glioma cell から得られた cDNA ライブラリーをファージに組み込んだものを大腸菌に感染させ、IPTG 誘導することにより、cDNA 由来の蛋白が発現する。その蛋白をメンブレンに吸着させ、患者(ないし正常・疾患コントロール)の血清・髄液と抗原抗体反応を起こさせ、陽性のプラークのみピックアップし単離した上で、そのファージの DNA をシーケンスし、遺伝子配列を決定する。

3. その遺伝子配列から既知の蛋白とのホモロジー検索を行う。

4. 蛋白を精製する。

5. すでに入手済みの schwannoma cell line から cDNA ライブラリーを作成し、上記 2 ~ 4 を行う。

4. 研究成果

(1) 多発性硬化症患者176名、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー30名、多発性硬化症と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの合

併2名、正常コントロールおよび疾患コントロール各50名の血清・髄液を採取し凍結保存した。

(2) 多発性硬化症と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの合併症の頻度、臨床像や神経生理学的特徴についてまとめ、報告した。

(3) glioma の cell line から作った cDNA ライブラリーを用いて2名の通常型多発性硬化症、2名の慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー患者、2名の両者合併症患者からの血清で SEREX 法を施行し、通常型多発性硬化症患者血清から6個の、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー患者血清から4個の新規自己抗原の可能性のある蛋白をコードする遺伝子を得た。また、schwannoma の cell line から作った cDNA ライブラリーを用いて2名の通常型多発性硬化症、2名の慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー患者、2名の両者合併症患者からの血清で SEREX 法を施行し、1名の多発性硬化症患者から17個の、2名の慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー患者から4個の新規自己抗原の可能性のある蛋白をコードする遺伝子を得た。多発性硬化症から得られた遺伝子と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーから得られた遺伝子に共通のものはなかった。それらのうち1つに関しては蛋白の精製に成功した。多発性硬化症と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの合併例からは新規自己抗原の可能性のある蛋白をコードする遺伝子が得られなかった。

(4) 髄液を対象に SEREX 法を行う系を確立した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Hiwasa T, Shimada H, Kuboshima M, Shiratori T, Kagaya A, Nabeya Y, Sugano S, Ochiai T, Matsubara H,

Takiguchi M. Decrease in chemosensitivity against anticancer drugs by an esophageal squamous cell carcinoma SEREX antigen, AISEC. Int J Oncol. 34:641-8,2009. 査読あり

Misawa S, Kuwabara S, Mori M, Hayakawa S, Sawai S, Hattori T. Peripheral nerve demyelination in multiple sclerosis. Clin Neurophysiol. 119, 1829-33,2008. 査読あり

Hayakawa S, Mori M, Okuta A, Kamegawa A, Fujiyoshi Y, Yoshiyama Y, Mitsuoka K, Ishibashi K, Sasaki S, Hattori T, Kuwabara S. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. J Neuroimmunol. 196,181-7,2008. 査読あり

Kuwabara S. The blood-nerve barrier and sensory nerve conduction. Clin Neurophysiol. 118,1901-2,2007. 査読あり

早川省, 森雅裕, 吉山容正, 服部孝道, 桑原聡. 【アクアポリンと多発性硬化症】抗アクアポリン抗体陽性多発性硬化症患者の臨床的特徴 神経免疫学. 15:185-188,2007. 査読あり

Kuwabara S, Misawa S, Mori M, Tamura N, Kubota M, Hattori T. Long term prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a five year follow up of 38 cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 77,66-70,2006. 査読あり

Mori M, Kuwabara S, Nemoto Y, Tamura N, Hattori T. Concomitant

chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and myasthenia gravis following cytomegalovirus infection. J Neurol Sci. 240:103-6,2006. 査読あり

森雅裕, 桑原聡, 早川省, 金坂俊秀, 服部孝道. 千葉県における多発性硬化症患者の臨床像. 千葉医学雑誌. 82(6):305-311,2006. 査読あり

〔学会発表〕(計25件)

澤井撰(千葉大学 医学部神経内科), 梅村啓史, 森雅裕, 佐藤守, 小寺義男, 朝長毅, 野村文夫, 桑原聡. MALDI-TOF MS 法を用いた血清プロテオーム解析による多発性硬化症疾患活動性マーカーの網羅的探索. 第21回日本神経免疫学会学術集会. 2009.3.12-13. 大阪.

磯瀬沙希里, 三澤園子, 澁谷和幹, 澤井撰, 金井数明, 森雅裕, 桑原聡, 国分則人, 平田幸一. CIDP 電気診断における遠位複合筋活動電位持続時間の有用性. 第21回日本神経免疫学会学術集会. 2009.3.12-13. 大阪.

谷口順子, 森雅裕, 澤井撰, 三澤園子, 桑原聡. CIDP 患者血清はマウス DRG ニューロンの軸索伸展を阻害する. 第21回日本神経免疫学会学術集会. 2009.3.12-13. 大阪.

鵜沢顕之, 森雅裕, 早川省, 桑原聡. Neuromyelitis optica 患者血清中の抗 AQP1 抗体に関する検討.

第21回日本神経免疫学会学術集会. 2009.3.12-13. 大阪.

森雅裕, 早川省, 鵜沢顕之, 桑原聡. human AQP4 を抗原にした ELISA 法の樹立および rat AQP4 と human AQP4 の抗原性の差異. 第21回日本神経免疫学会

学術集会. 2009.3.12-13.大阪.
早川省, 森雅裕, 鶴沢顕之, 桑原聡. Neuromyelitis optica 患者髄液中のウイルス抗原と aquaporin-4 タンパクの関連性. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会. 2009.3.12-13.大阪.
三澤園子(千葉大学 大学院医学研究院神経内科), 森雅裕, 磯瀬沙希里, 澁谷和幹, 澤井撰, 桑原聡. 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの臨床病型と治療反応性. 第 19 回日本末梢神経学会学術集会. 2008.9.5-6.名古屋.
鶴沢顕之, 森雅裕, 早川省, 服部孝道, 桑原聡. 多発性硬化症患者アンケートからみた interferon 1a と 1b の比較検討. 第 26 回日本神経治療学会総会. 2008.6.26-27.横浜.
森雅裕, 早川省, 鶴沢顕之, 澤井撰, 服部孝道, 桑原聡. 血液浄化法による抗 aquaporin - 4 抗体除去に関する検討. 第 26 回日本神経治療学会総会. 2008.6.26-27.横浜.
鶴沢顕之, 森雅裕, 早川省, 服部孝道, 桑原聡. 多発性硬化症のインターフェロン -1b 治療に対する responder の臨床的特徴. 第 49 回日本神経学会総会. 2008.5.15-17.横浜.
早川省(千葉大学 医学研究院神経内科), 森雅裕, 日和佐隆樹, 滝口正樹, 服部孝道, 桑原聡. リコンビナント aquaporin-4 ペプチドの精製および ELISA 法への応用. 第 49 回日本神経学会総会. 2008.5.15-17.横浜.
森雅裕(千葉大学 医学部神経内科), 早川省, 鶴沢顕之, 服部孝道, 桑原聡. 抗アクアポリン陽性症候群の 4 症例. 第 49 回日本神経学会総会 2008.5.15-17.横浜.

三澤園子, 桑原聡, 澤井撰, 磯瀬沙希里, 森雅裕, 服部孝道. 炎症性末梢神経疾患 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの臨床的、電気生理学的病型と治療反応性. 第 20 回日本神経免疫学会総会. 2008.4.17-18.新潟.
森雅裕, 早川省, 鶴沢顕之, 澤井撰, 服部孝道, 桑原聡. 抗アクアポリン 4 抗体関連神経疾患の病態機序: 抗 aquaporin-4 抗体のサブクラスに関する検討. 第 20 回日本神経免疫学会総会. 2008.4.17-18.新潟.
早川省, 森雅裕, 日和佐隆樹, 瀧口正樹, 服部孝道, 桑原聡. 抗アクアポリン 4 抗体関連神経疾患の病態機序. リコンビナント aquaporin-4 蛋白を用いた抗 AQP4 抗体測定系に関する検討. 第 20 回日本神経免疫学会学術集会. 2008.4.17-18.新潟.
三澤園子, 桑原聡, 森雅裕, 早川省, 服部孝道. 多発性硬化症の脱髄性ニューロパチー合併頻度と治療. 第 25 回日本治療学会総会. 2007.6.21 -22.仙台.
森雅裕, 早川省, 吉山容正, 服部孝道, 桑原聡. ELISA による抗 aquaporin-4 抗体測定系の開発. 第 48 回日本神経学会総会. 2007.5.16-18.名古屋.
早川省, 森雅裕, 吉山容正, 服部孝道, 桑原聡. 抗 aquaporin4 抗体陽性多発性硬化症患者の臨床的特徴: 多発性硬化症における抗 aquaporin-4 抗体 ELISA 測定系の確率と陽性者の臨床像. 第 19 回日本神経免疫学会学術集会. 2007.4.12-13.金沢.
森雅裕, 鶴沢顕之, 早川省, 吉山容正, 服部孝道, 桑原聡. 日本人多発性硬化症のサブグループとインターフェロン治療反応性. 第 19 回日本神経免疫学会

- 学術集会 . 2007.4.12-13.金沢
三澤園子, 桑原聡, 森雅裕, 早川省,
澤井撰, 服部孝道 . 多発性硬化症にお
ける脱髄性ニューロパチーの合併頻度
と軸索特性の変化 . 第 19 回日本神経免
疫学会学術集会 . 2007.4.12-13.金沢 .
- 21 三澤園子, 桑原聡, 田村典子, 森雅裕,
早川省, 服部孝道 . 多発性硬化症患者は
末梢神経の脱髄病変を合併するか?
Supernormality を用いた検討 .
第 36 回日本臨床神経生理学会 .
2006.11.29-12.1. 横浜 .
- 22 早川省, 森雅裕, 鶴沢顕之, 金坂俊秀,
服部孝道, 桑原聡 . 日本人多発性硬化
症におけるオリゴクローナルバンドの
臨床的意義 . 第 47 回日本神経学会総会 .
2006.5.11-13.東京 .
- 23 森雅裕, 桑原聡, 田村典子, 鶴沢顕之,
三澤園子, 服部孝道 . AIDP と CIDP 間
でのリンパ球サブセットおよびケモカ
インレセプターの差異 . 第 47 回日本神経
学会総会 . 2006.5.11-13.東京 .
- 24 鶴沢顕之, 森雅裕, 早川省, 金坂俊秀,
服部孝道, 桑原聡 . 多発性硬化症にお
けるインターフェロン療法有効性の規
定因子 . 第 47 回日本神経学会総会 .
2006.5.11-13.東京 .

(2)研究分担者

服部 孝道 (TAKAMICHI HATTORI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 30114317

桑原 聡 (SATOSHI KUWABARA)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 70282481

日和佐 隆樹 (TAKAKI HIWASA)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 30260251

(3)連携研究者

桑原 聡 (SATOSHI KUWABARA)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 70282481

日和佐 隆樹 (TAKAKI HIWASA)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 30260251

早川 省 (SHOU HAYAKAWA)
千葉大学・医学部附属病院
研究者番号 : 60400959

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森 雅裕 (MASAHIRO MORI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 70345023