

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590992

研究課題名（和文） 多発性硬化症における大脳膜蛋白に対する新規自己抗体の検索とバイオマーカーの確立

研究課題名（英文） Identification of novel autoantibodies against cerebral cell surface membrane proteins as biological markers of multiple sclerosis

研究代表者

木村 暁夫 (KIMURA AKIO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00362161

研究成果の概要（和文）：二次元免疫プロットと質量分析の手法を用いて、多発性硬化症（MS）に特異的な自己抗体の認識抗原蛋白として、Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM 1)と mitochondrial heat shock protein 70 (mtHSP70) を同定した。これらのヒトリコンビナント蛋白を用いた一次元免疫プロットによりさらに対象患者を増やしその血清中に存在する、抗PGAM1抗体と抗mtHSP70抗体の検出を行った。結果、抗PGAM1抗体の陽性率は対象コントロール(24～32%)と比較してMS患者(81%)で有意に高かった ($p<0.05$)。一方、抗mtHSP70抗体の陽性率も、対象コントロール(20～30%)と比較してMS患者(68%)で有意に高かった($p<0.05$)。しかしいずれの自己抗体に関しても、陽性・陰性者間のMS患者の臨床症状、画像所見に有意な相違は認めなかった。一方、MSに対する更なる特異性の向上を目的として、抗PGAM1抗体と抗mtHSP70抗体が共に陽性となる率を検討した。結果、対象コントロール(0～16%)と比較してMS患者(57%)で有意に陽性率が高く($p<0.05$)、特異度も93%と高いものであった。今回、抗mtHSP70抗体と抗PGAM1抗体を組み合わせるによりMSに対する特異度が高まることから、同疾患の診断において極めて有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We identified the autoantibody against Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM 1) and mitochondrial heat shock protein 70 (mtHSP70) in serum from multiple sclerosis (MS) patients by immunoproteomic approach. We tested more samples by one-dimensional immunoblotting of human recombinant PGAM1 and mtHSP70. The prevalence of the anti-PGAM 1 antibody is significantly higher in serum from MS patients (81%) than in serum from other neurological diseases (ONDs) and healthy controls (HCs) (24~32%) ($p<0.05$). The prevalence of the anti-mtHSP70 antibody is also significantly higher in serum from MS patients (68%) than in serum from ONDs and HCs (20~30%) ($p<0.05$). We studied the clinical features and magnetic resonance imaging findings of MS patients with these antibodies. As a result, there were no significant differences between these antibodies-positive and -negative MS patients. Additionally, in our comprehensive analysis of the prevalence of both the anti-PGAM1 antibody and the anti-mtHSP70 antibody, the positivity rates of both these antibodies were significantly higher in serum from MS patients (57%) than in serum from patients with ONDs and HCs (0~16%) ($p<0.05$); moreover, the specificity of this combination assay was higher than that of the assay of only one antibody (57% sensitivity; 93% specificity). Results of our study suggest that the combination of both these antibodies is useful for a more specific diagnosis of MS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脳・神経、免疫学

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄型多発性硬化症患者でアストロサイトおよびクモ膜下腔・脳室壁を縁取る細胞に水チャンネル分子として広く発現するアクアポリン4に対する自己抗体が高率に陽性になることが報告された。また、多発性硬化症の液性免疫の関与は病理学的にも示唆されており、アクアポリン4以外にも中枢神経組織に対する自己抗体を有する症例が存在すると考えられた。

2. 研究の目的

申請者らが独自に確立した二次元免疫ブロット法と高感度ナノLC-MS/MS分析法を用い、神経難病の一つである多発性硬化症の病態解明と新たな治療法の開発を目指して、液性免疫の関与に着目し、患者の脳膜蛋白に対する疾患特異的な自己抗体の検出とその認識抗原蛋白の同定をこころみた。

3. 研究の方法

ラット脳膜ホモジネートを抗原とした二次元免疫ブロットにより多発性硬化症患者と健常者の血清中に存在する自己抗体を検出した。その後、多発性硬化症患者の血清中に有意に存在する自己抗体の認識抗原蛋白をLC-MS/MSを用いて同定した。同定した抗原蛋白のヒトリコンビナントを用いてさらに多数例において自己抗体の検出を試みその特異性を検討した。

4. 研究成果

二次元免疫ブロットと質量分析の手法を用いて、多発性硬化症 (MS) に特異的な自己抗体の検出とその認識抗原蛋白の同定をこころみた。スクリーニングとして12名の健常者と12名のMS患者の血清中の自己抗体を検出した。MS患者の血清中に有意に多く存在する自己抗体の認識抗原蛋白として、Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM 1) と mitochondrial heat shock protein 70を同定した。これらのヒトリコンビナント蛋白を用いて一次元免疫ブロットによりさらに対象患者を増やしその血清中に存在する、抗PGAM1抗体と抗mtHSP70抗体の検出を行った。対象はPoserの診断基準によるclinically definite MS患者25名、Parkinson病患者21名、多発性脳梗塞患者19名、感染性髄膜炎患者20名、健常者 (HCs) 27名とした。結果、抗PGAM1抗体の陽性率は対象コントロール(24~32%)と比較してMS患者(81%)で有意に高かった ($p<0.05$)。一方、抗mtHSP70抗体の陽性率も、

対象コントロール(20~30%)と比較してMS患者(68%)で有意に高かった ($p<0.05$)。MS患者内における抗PGAM1抗体ならびに抗mtHSP70抗体の陽性・陰性者間で臨床所見 (EDSS, 再発回数, 罹病期間)、画像所見 (頭蓋内病変の個数, 大脳萎縮, 視神経・脳幹・小脳・脊髄病変の有無) に違いがあるか検討した。結果、いずれも抗体陽性・陰性者間における統計学的な有意差は認めなかった。次に、MSに対する更なる特異性の向上を目的として、抗PGAM1抗体と抗mtHSP70抗体が共に陽性となる率を検討した。結果、対象コントロール (0~16%)と比較してMS患者(57%)で有意に陽性率が高く ($p<0.05$)、特異度も93%と高いものであった。mtHSP70はHeat shock protein 70 (HSP70) familyのひとつで、ミトコンドリア内に局在し、主にシャペロン蛋白として働く。MSの病態におけるmtHSP70に対する自己抗体の役割は明らかでないが、MSの活動性病変でmtHSP70の発現が亢進しているという報告や、MS患者の髄液中でHSP70 familyに対する自己抗体が上昇しており疾患活動性と相関するという報告があることから、mtHSP70あるいは抗mtHSP70抗体がMSの病態において何らかの役割を担っていると推察した。PGAM1は解糖系酵素のひとつで、cytosolに局在し、脳や肝臓などに存在し、肝臓においては抗PGAM1抗体と自己免疫性肝炎との関連性を指摘した報告がある。今回、抗mtHSP70抗体と抗PGAM1抗体を組み合わせることによりMSに対する特異度が高まることから、同疾患の診断において極めて有用であると考えられた。

本研究では当初、脳膜蛋白に対する自己抗体の検出をこころみたが、結果は cytosol およびミトコンドリアに局在する蛋白を認識する自己抗体であった。より病態と密接に関連する自己抗体を同定するためにも今後の課題として、膜蛋白を認識抗原とする自己抗体を同定する必要があり、従来我々が行ってきた二次元免疫ブロット法の改良もしくは免疫沈降法などの新たな手法を用いる必要があると考えられた。

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13件)

1. Sakurai T, Kimura A, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T: Identification of antibodies as biological markers in serum from multiple sclerosis

- patients by immunoproteomic approach. J Neuroimmunol. In press. (査読有)
2. Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T: Elevated anti-heat shock protein 60 antibody titer is related to white matter hyperintensities. J Stroke Cerebrovasc Dis. In press. (査読有)
 3. Kimura A, Kanoh Y, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T: Antibodies in Patients With Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. Neurology. 74, 1372-1379, 2010 (査読有)
 4. Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Tanaka R, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T: High prevalence of autoantibodies against phosphoglycerate mutase 1 in patients with autoimmune central nervous system diseases. J Neuroimmunol. 219, 105-108, 2010 (査読有)
 5. Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Yoshino H, Yuasa T, Inuzuka T: Motor-dominant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. J Neurol. 257, 621-629, 2010 (査読有)
 6. Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J: Antibodies to the GABA_B receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterization of the antigen. Lancet Neurol. 9, 67-76, 2010 (査読有)
 7. Hayashi Y, Kimura A, Watanabe M, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T: Serial monitoring of basal metabolic rate for therapeutic evaluation in an Issacs' syndrome patient with chronic fluctuating symptoms. Internal medicine. 49, 475-477, 2010 (査読有)
 8. 櫻井岳郎, 田中優司, 木村暁夫, 保住功, 犬塚貴: 胃腸炎後に発症した抗GQ1b抗体陽性の小脳失調症を伴わない急性一側性外転神経麻痺の1例. 神経内科. 71, 514-516, 2009 (査読有)
 9. 櫻井岳郎, 田中優司, 香村彰宏, 林 祐一, 木村暁夫, 保住功, 米田 誠, 犬塚貴: Creutzfeldt-Jakob病と類似の臨床経過を示した Basedow病と伴った橋本脳症の1例. BRAIN and NERVE. 60, 559-565, 2008 (査読有)
 10. Hayashi Y, Kimura A, Kato S, Koumura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Sunden Y, Orba Y, Sawa H, Takahashi H, Inuzuka T: Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjögren syndrome. J Neurol Sci. 268, 195-198, 2008 (査読有)
 11. Kimura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Takahashi K, Takemura M, Saito K, Seishima M, Inuzuka T: Proteomic analysis of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus patient with white matter hyperintensities on brain MRI. Lupus. 17, 16-20, 2008 (査読有)
 12. Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Nakajima H, Ichiyama T, Inuzuka T: Longitudinal analysis of cytokines and chemokines in the cerebrospinal fluid of a patient with neuro-Sweet disease presenting with recurrent encephal meningitis. Internal Medicine. 47, 135-141, 2008 (査読有)
 13. Hayashi Y, Sakurai T, Kimura A, Ikeda T, Matsuyama Z, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Hosoe H, Takahashi H, Inuzuka T: Selective cauda equine hypertrophy with idiopathic inflammation. Muscle Nerve. 38, 1065-1069, 2008 (査読有)
- [学会発表] (計 1 1 件)
1. Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T: Anti-Endothelial Cell Antibodies in the Elderly with Extended White Matter Hyperintensity. American Academy of Neurology 63rd Annual Meeting (2011.4.13, Honolulu, USA)
 2. 櫻井岳郎, 木村暁夫, 山田 恵, 香村彰宏, 林 祐一, 田中優司, 保住功, 犬塚貴: Stress 70 protein抗体の特異性に関する検討. 第51回日本神経学会総会. (2010.5.22 東京)
 3. 木村暁夫, 櫻井岳郎, 山田 恵, 香村彰宏, 林 祐一, 田中優司, 保住功, 犬塚貴: Motor-dominant CIDP患者の臨床的検討. 第5

- 1回日本神経学会総会. (2010.5.21 東京)
4. 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴: 多発性硬化症患者における抗 Phosphoglycerate mutase 1抗体の特異性に関する検討. 第21回日本神経免疫学会学術集会 (2009.3.13 大阪)
 5. 櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴: プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体の検索. 第21回日本神経免疫学会学術集会(2009.3.13大阪)
 6. Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T: Identification of Antibodies Against Brain Antigen in Sera of Patients with Neuropsychiatric Systemic lupus erythematosus. American Academy of Neurology 61st Annual Meeting (2009.4.29, Seattle, USA)
 7. 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴: 抗 Hsp60抗体と大脳白質病変に関する研究. 第50回日本神経学会総会. (2009.5.20. 仙台)
 8. 櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴: プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体の検索. 第50回日本神経学会総会 (2009.5.22 仙台)
 9. 櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、香村彰宏、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴: 通常型多発性硬化症における抗第49回日本神経学会総会 (2008.5.16 横浜)
 10. 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴: CNS ループス患者におけるプロテオミクス解析を用いた自己抗体認識抗原の同定. 第49回日本神経学会総会 (2008.5.16 横浜)
 11. 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴: プロテオミクス解析を用いた中枢神経ループス特異的抗神経抗体の検索; 第20回日本神経免疫学会学術集会 (2008.4.18 新

潟)
 [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:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 暁夫 (KIMURA AKIO)
 岐阜大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 00362161

(2)研究分担者

犬塚 貴 (INUZUKA TAKASHI)
 岐阜大学・医学系研究科・教授
 研究者番号: 50184734

保住 功 (HOZUMI ISAO)
 岐阜大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号: 20242430

田中優司 (TANAKA YUJI)
 岐阜大学・医学系研究科・助教
 研究者番号: 70377654

(3)連携研究者

()

研究者番号: