

機関番号：32607

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591175

研究課題名 (和文) 中枢神経ループスにおける抗神経細胞抗体の解析

研究課題名 (英文) Analysis of anti-neuronal antibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

研究代表者

廣畑 俊成 (HIROHATA SHUNSEI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90189895

研究成果の概要 (和文) : 本研究においては、まず、ループス精神病における抗グルタミン酸レセプター (NR2) 抗体の役割について検討した。その結果、ループス精神病においては他群に比し髄液中の抗 NR2 抗体が上昇しており、これが病態に深く関与するものと考えられた。次に、中枢神経ループス患者の血清中の抗神経細胞抗体の認識する抗原解析をプロテオミクスの手法を用いて行った。その結果、ミトコンドリア酵素タンパク質や核酸結合タンパク質などのタンパク質が抗神経細胞抗体の対応抗原の候補として同定された。最後に、抗神経細胞抗体の 1 つである抗リボソーム P 抗体は末梢血単球の IL-12 産生を増強することにより Th1 型の免疫反応を誘導することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : In the current studies, we first demonstrated that cerebrospinal fluid anti-NR2 levels were significantly higher in patients with lupus psychosis than in control groups, suggesting that anti-NR2 antibodies might play a pivotal role in the pathogenesis of lupus psychosis. Using a proteomics approach, we next picked up several antigens, including peroxiredoxin-4, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1, splicing factor arginine/serine-rich 3, and histone H2A type 1, as candidates for the autoantigens of anti-neuronal antibodies. Finally, we disclosed that that anti-ribosomal P antibodies induced Th1 responses by upregulating the production of IL-12 by activated monocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：1. 中枢神経ループス 2. ループス精神病 3. 神経芽細胞腫細胞 4. 抗神経細胞抗体 5. エピトープ 6. プロテオミクス 7. ミトコンドリア酵素タンパク質 8. 核酸結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身性エリテマトーデス (SLE) に伴う中枢神経病変 (中枢神経ループス) は、SLE の難治性病態でありながらその病因・病態はおろか診断法・活動性の評価法も不明で治療を著しく困難にしている。

(2) 一方、SLE では自己抗体の発現が疾患の hall mark となっている。中枢神経ループスでは髄液中の抗神経細胞抗体が特異的に上昇し、疾患活動性をよく反映することが、1981年に Bluestein らによって報告されたが、その後の追試では一定した見解が得られていなかった。しかし、申請者自身が新たに確立した抗核抗体の混入を排除した特異的な測定法により髄液中の抗神経細胞抗体と中枢神経ループスの関係が改めて裏付けられた。しかし、その対応抗原 (エピトープ) は未だ十分解明されていない。

2. 研究の目的

本研究においては、全身性エリテマトーデス (SLE) の難治性病態の 1 つである中枢神経ループスの病態形成上重要な役割を果たすと考えられる抗神経細胞抗体の認識するエピトープの解析と、各々のエピトープに対する抗体が神経細胞の機能に如何なる影響を及ぼすかを解析することを目的とする。さらに、神経細胞表面の種々のエピトープに対する抗体と特定の精神神経症状との間に相関がないかについても検討を行うことで、新たな診断法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経ループス患者 (1999年の ACR 分類により Diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes 及び Neurologic syndromes と診断されたもの)、及び対照群としては非炎症性神経疾患と神経 Behçet 患者から得られた髄液と血清中の抗グルタミン酸レセプター抗体測定を行い比較検討する。グルタミン酸レセプターの主要抗原決定基のペプチド配列は 2001年に Diamond らのグループにより報告されたものを用いる (DWEYSVWLSN: Nat Med 7: 1189-1193, 2001)。ペプチドは合成し、それをヒト血清アルブミン (HSA) にグルタルアルデヒド法で結合し、これを抗原としてマイクロタイタープレートに固相化し、酵素抗体法にて抗グルタミン酸レセプター抗体の濃度を測定する。

(2) 中枢神経ループスの患者の血清について、抗神経細胞抗体が陽性であるものをスクリーニングする。この陽性血清より IgG を精製し、SK-N-MC 細胞と HL-60 細胞 (対照) の抽出物を用いて、ウェスタンブロット (一次元 SDS-PAGE、二次元 SDS-PAGE) を行う。患者 IgG が SK-N-MC 細胞抽出物とのみ反応したバンドおよびスポットを切り出し、マスマスペクトロメトリーにて質量分析を行うとともに、アミノ酸分析も行い、蛋白質の同定を試みる。

(3) 抗グルタミン酸レセプター抗体および抗体リボソーム P 抗体が生体内で存在する濃度において、神経細胞の機能に対して及ぼす影響について検討することにより、その中枢神経ループスの病態形成において果たす意義を明らかにする。

- a. 抗グルタミン酸レセプター抗体・抗リボソーム P 抗体の精製は、これら抗体の陽性の血清・髄液よりまずプロテイン G-セファロースカラムで IgG を精製した後、HSA (ヒトアルブミン) -グルタミン酸レセプターペプチド複合体、精製リボソーム P0 蛋白を結合したカラムを用いてアフィニティー精製を行う。
- b. 種々の細胞を用いて、抗グルタミン酸レセプター抗体及び抗リボソーム P 抗体が *in vitro* での神経細胞機能に及ぼす影響の検討を行う。

4. 研究成果

(1) ループス精神病における抗グルタミン酸レセプター (NR2) 抗体の役割について、グルタミン酸レセプターの主要抗原決定基の合成ペプチド (DWEYSVWLSN) をヒト血清アルブミンに結合したものを抗原とする ELISA 法にて検討した。この検討に用いた抗原でアフィニティー精製した抗体はヒト神経芽細胞腫細胞 SKNMC と反応したことから、抗神経細胞抗体であることが確認された。ELISA を行った結果、ループス精神病患者 38 例においては髄液中抗 NR2 抗体が、非 SLE の対照群患者 20 例および局所神経症状のみを示す Focal 型神経症状を示す SLE 患者 18 例と比較して、有意に上昇していた (図 1)。しかし血清中の抗 NR2 抗体はこれら 3 群の間では有意差がなかった。以上の結果より、ループス精神病においては、髄液中の抗 NR2 抗体の上昇が病態に深く関与するものと考えられた。

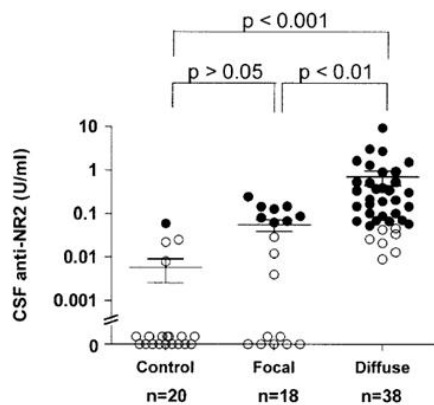


図1 ループス精神病における髄液抗NR2抗体の上昇

Control: 非SLE, Focal: 局所神経徴候のSLE, Diffuse: ループス精神病

(2) 患者の血清よりアフィニティー精製した抗NR2抗体と抗リボソームP抗体がSKNMCに対していかなる影響を及ぼすかについて検討した。しかし、検討した範囲では、このいずれの抗体もSKNMCの増殖には有意な影響を及ぼさなかった。抗NR2抗体はマウスの脳の神経細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。今後、神経細胞の種類を変更して検討してゆく必要がある。

(3) 抗神経細胞抗体の新たなエピトープを解明する手始めとして、パラフォルムアルデヒドで固定したSKNMCを用いて抗神経細胞抗体を精製した。この精製した抗神経細胞抗体は一次元のウェスタンブロットにおいてSKNMC由来のいくつかの蛋白と反応することが確認されている。そこで、抗神経細胞抗体がいかなるエピトープを認識するかについてプロテオミクスの手段を用いて検討を行った。具体的には、ヒト神経芽細胞腫SK-N-MC細胞から抽出したタンパク質を2次元電気泳動し、複数の中枢神経ループス患者血清を混合したものを使用してウェスタンブロットを行い、中枢神経症状のないSLE患者血清と反応を比較検討した。その結果、健常人血清でも反応を示したスポットを除いて全体で数十個の自己抗原スポットを検出した。中枢神経ループス群のみで見られるスポット、両群ともに認められるスポット、中枢神経症状のないSLE群のみで認められるスポットなど多様であった。これらのスポットからタンパク質を抽出し質量分析を行った結果、中枢神

経ループスのみで認められたスポットとしては、ミトコンドリア酵素タンパク質や核酸結合タンパク質などが同定された(Peroxiredoxin-4, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1, splicing factor arginine/serine-rich 3, and histone H2A type 1)。これらのタンパク質は抗神経細胞抗体の対応抗原の候補である。また、神経細胞より抽出したタンパク質をSDS-PAGEで展開し、IgG値を補正した患者血清と髄液でウェスタンブロットを行った結果、髄液でより強い反応が認められる抗原タンパク質も存在した。

(4) 抗グルタミン酸レセプター(NR2)抗体とCNSループスの諸症状との関係について、症例を増やして解析を行った。その結果、抗NR2抗体は従来の報告どおりCNSループスの中でループス精神病患者の髄液中で上昇していることが裏付けられた。さらに、横断性脊髄炎を示す患者2名の血清・髄液中で抗NR2抗体が上昇していることが明らかになった。また、抗グルタミン酸レセプター(NR1)抗体についても、ループス精神病患者1名の髄液で陽性になることが明らかになった。今後、これらの点について明らかにしてゆく必要がある。

(5) これまで髄液中のIL-6がCNSループスで上昇していることが明らかになっている。我々は、髄液中のIL-8について検討を行った。その結果、髄液中IL-8はやはりCNSループスにおいて上昇しており、髄液IL-6と相関を示した。従って、髄液IL-6とIL-8は共通の機序によって上昇している可能性が示唆された。これまでの結果より、IL-8もIL-6と同様にその産生細胞としては神経細胞である可能性が考えられる。今後、抗神経細胞抗体の中にこれらのサイトカイン産生を増強するものがないか検討する必要がある。

(6) 最後に、抗神経細胞抗体の1つである抗リボソームP抗体が免疫反応に及ぼす影響を検討した。抗リボソームP抗体は健常人末梢血単核球のIFN- γ 産生を上昇させた(図2)。このIFN- γ 産生の上昇は抗IL-12モノクローナル抗体の添加により抑制された。さらに、抗リボソームP抗体は末梢血単核球によるIL-12産生を増強した。以上より、抗リボソームP抗体は末梢血単核球のIL-12産生を増強することによりTh1型の免疫反応を誘導することが示唆された。今後は、このTh1型反応が如何にして中枢神経病変の発症に関わるのかについて検討してゆく必要がある。

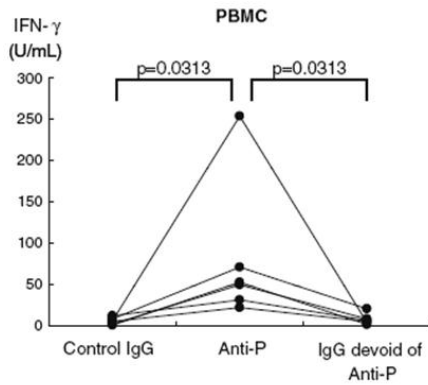


図2 抗リボソームP抗体は健常人末梢血単核球のIFN- γ 産生を増強する

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10件)

- ① Nagai T, Yanagida T, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody induces Th1 responses by enhancing the production of IL-12 in activated monocytes. Mod Rheumatol, 査読有, 21:57-62, 2010.
- ② Iizuka N, Okamoto K, Matsushita R, Kimura M, Nagai K, Arito M, Kurokawa MS, Masuko K, Suematsu N, Hirohata S, Kato T. Identification of autoantigens specific for systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. Lupus, 査読有, 19:717-726, 2010.
- ③ 廣畑俊成: CNS ループスに関する自己抗体は何か. 分子リウマチ治療, 査読無, 3: 21-25, 2010.
- ④ 廣畑俊成: Editorial 膠原病に伴う神経・筋障害. 日内会誌, 査読無, 99:1751-1753, 2010.
- ⑤ 廣畑俊成: 全身性エリテマトーデスの長期管理. 日本医事新報, 査読無, 4421: 44-47, 2009.
- ⑥ 廣畑俊成: 大脳白質をめぐって—画像と最新の知見 炎症 神経 Behcet 病. CNS ループス. CLINICAL NEUROSCIENCE, 査読無, 27: 1284-1286, 2009.
- ⑦ Hirohata S, Shibuya H, Tejima S. Suppressing influences of IFN- α on IL-17 expression in human CD4+ T cells. Clin Immunol, 査読有, 134: 340-344, 2009.

- ⑧ Hirohata S, Kanai Y, Mitsuo A, Tokano Y, Hashimoto H. NPSLE Research Subcommittee. Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. Clin Rheumatol, 査読有, 28: 1319-1323, 2009.
- ⑨ Kimura M, Aramaki K, Hirohata S et al. Reversible focal neurological deficits in systemic lupus erythematosus: Report of 2 cases and review of the literature. J Neurol Sci, 査読有, 272:71-76, 2008.
- ⑩ Arinuma Y, Yanagida T, Hirohata S: Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, 査読有, 58:1130-1135, 2008.

[学会発表] (計5件)

- ① Tanaka S, Hoshi K, Tanaka J, Wada T, Matsui T, Nagai T, Okada J, Hirohata S. Determination of the accurate incidence of pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis, mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus by prospective study for 3 years. 74th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Atlanta, USA. 2010, 11, 10.
- ② Iizuka N, Okamoto K, Matsushita R, Arito M, Nagai K, Kurokawa MS, Suematsu N, Masuko K, Hirohata S, Kato T. Proteomic analysis of autoantigens in SLE patients with CNS involvement. 73rd Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Philadelphia, USA. 2009, 10, 19.
- ③ Tanaka S, Wada T, Matsushita R, Hirohata S. Improvement in long-term prognosis of pulmonary arterial hypertension in patients with connective tissue diseases, including systemic sclerosis, mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. 73rd Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Philadelphia, USA. 2009, 10, 18.
- ④ 廣畑俊成. 膠原病の病態解明と治療最前線 5. 膠原病と生物学的製剤. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田市. 2009, 10, 30.
- ⑤ Hirohata S, Yanagida T. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 with diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. EULAR 2008, Paris, France. 2008, 6, 12.

〔図書〕(計2件)

- ① 廣畑俊成, 法研, 膠原病 全身性エリテマトーデス, 2010、2655-2657.
- ② 廣畑俊成, 最新医学社, 全身性エリテマトーデスの病態生理, 2010、48-57.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣畑 俊成 (HIROHATA SHUNSEI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：90189895

(2) 研究分担者

永井 立夫 (NAGAI TATSUO)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：60365947

和田 達彦 (WADA TATSUHIKO)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：60383585

遠藤 平仁 (ENDO HIRAHITO)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：20213598

松井 俊通 (MATSUI TOSHIMICHI)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：20348519

橋本 篤 (HASHIMOTO ATSUSHI)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：50327376

(3) 連携研究者

加藤 智弘 (KATO TOMOHIRO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：80233807