

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790835

研究課題名（和文）傍腫瘍性神経症候群に伴う抗神経細胞抗体の高感度検出法の検討

研究課題名（英文）High-Sensitive Detection System for Paraneoplastic Anti-Neuronal Antibodies

研究代表者

古和 久朋（KOWA HISATOMO）

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60396728

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍に伴い各種神経障害を来す傍腫瘍性神経症候群を的確に診断し，早期の治療を開始するために，その病態に関連する抗神経細胞抗体の検出系を確立することが重要である．本研究では，蛋白細胞生化学と免疫組織化学を組み合わせることで検出力を高めることが分かった．一方初代神経細胞を対象とした免疫細胞化学では，抗神経細胞抗体が病態を引き起こすメカニズムの解明に有用な手段である可能性が示唆された．

研究成果の概要（英文）：Paraneoplastic neurological disorders (PNDs) are caused by, or associated with, an underlying neoplasm. It is believed that most are caused by an immune response against onconeural antigens. It is important to detect these antibodies against neurons and/or glial cells for the diagnosis of PNDs.

To establish high-sensitive detection system for paraneoplastic anti-neuronal antibodies, patients clinically diagnosed as PNDs were examined using dot-blot kit, immunohistochemistry (IHC) on frozen mouse brain sections, Western blot analysis of wild-type mouse brain homogenate and immunocytochemistry (ICC) on primary culture of mouse fetus brains. The combination of IHC and Western blot analysis is the high-sensitive tool to detect anti-neuronal antibodies. ICC is supposed to be useful for detecting how antibodies work to cause PNDs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経内科，神経病理

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：傍腫瘍性神経症候群，抗神経細胞抗体，免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

傍腫瘍性神経症候群（PNS）は悪性腫瘍患者に合併する神経障害のうち，腫瘍の転移や化学療法，放射線療法に伴うもの，栄養障害などの原因がなく，自己免疫的機序によると

考えられる一群である．PNSは悪性腫瘍全体の1%前後に生じる比較的まれな病態と考えられてきたが，自己抗体の検出方法の進歩やその概念が広く認知されるようになった現在，多彩な神経症状を生じることが知られ

るようになった。抗体が検出されない場合も多く、実際の頻度はより高いと考えられ、日常臨床で PNS を理解することはきわめて重要になってきている。

従来 PNS として知られてきた典型例は、1) 急性に小脳失調が進行する中高年女性で、血清・髄液中に小脳プルキンエ細胞に結合する自己抗体 (Yo 抗体) が検出され、ほどなく婦人科系臓器悪性腫瘍が検出される亜急性小脳変性症、2) 亜急性感覚性運動失調型ニューロパチーを呈し、神経細胞の核に反応する自己抗体 (Hu 抗体) が検出される肺小細胞癌の一群、3) Lamber-Eaton 筋無力症群を呈し電位依存性カルシウムチャンネルに対する抗体を伴い肺小細胞癌を有する群、4) 消化器癌などを有する高齢男性に多い皮膚筋炎、などが代表的と考えられてきた (Graus F et al. JNNP 2004)。しかしながら、中枢神経・末梢神経にわたる広汎かつ多彩な神経症候を呈する例、運動ニューロン病様の筋萎縮が呼吸不全を呈する例など一見神経変性疾患と鑑別困難な臨床経過を示す症例なども報告されてきており、PNS の診断は難しくなっている。

また神経症候と自己抗体および腫瘍原発巣との関連も必ずしも一定でない。PNS の 60% 以上で神経症状発現時には悪性腫瘍の存在が捉えられず、数ヶ月から数年を経て初めて明らかになる例、あるいは剖検で初めて小さな腫瘍が発見される例もあり、神経疾患の日常診療上、本症は頻りに鑑別疾患の対象に上げられるものである。また本症の診断は背景に潜む悪性腫瘍の検索に目を向けさせ、腫瘍早期診断・早期治療に結びつくものであることから、PNS との診断を確定することは大変重要である。

PNS 診断には前述した Hu, Yo などの各種自己抗体の検出がきわめて重要である。我々

は、現在 Milenia biotec 社の Onkoneuronal Antigen-antibody 同定キット、およびラット脳の 4%PFA 固定のパラフィン切片を用いて各種自己抗体の検出を進めており、具体的には前立腺癌に伴う抗 Ma-2 抗体陽性例などを発見、報告している (Matsumoto et al. Mov Disorder 2007)。これらの方法により既知の抗神経細胞抗体は比較的容易に同定可能だが、新規抗体の可能性やチャネルなどの膜蛋白への適用は困難である。

従って、PNS を診断するために高感度の抗神経細胞抗体をスクリーニングするための系を確立することは極めて重要である。

2. 研究の目的

マウス脳切片への免疫組織化学および初代神経細胞系への免疫細胞化学を駆使して、PNS 患者に出現する抗神経細胞抗体の高感度スクリーニング系を確立することを目標とする。未知の抗神経細胞抗体の存在が疑われるケースについてはその抗原蛋白の同定も目標とする。

3. 研究の方法

本研究の対象となる血清および髄液は東京大学医学部附属病院神経内科に暗号化され保管され研究使用に同意を得られたものである。すでにキットを用いたスクリーニングは終了したもので、既知の抗神経細胞抗体の存在が確認されたもの、臨床的に PNS が強く疑われるが、既知の抗神経細胞抗体の同定に到っていないものの、いずれもが含まれている。

本研究で用いた各種抗神経細胞抗体同定のための方法は次の 4 種類である。

・ドットブロット法

ドイツ Alpco Diagnostics 社製の Human Anti-Onconeural Antigen Dot Blot Kit を用いて同社のプロトコールに従い各種抗体 (Hu, Yo, Ri, Ma1, Ma2, amphiphysin, CPMP5,

recoverin) を測定した。

- ・免疫組織化学 (IHC)

4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した 12 週齢マウス脳を摘出後即座に瞬間凍結し、クライオスタットで矢状断に薄切した凍結切片に対して、400 倍に希釈した血清を一晩室温下で反応させ、型のごとく ABC 法により DAB で発色した。

- ・ウェスタンブロット法

マウス大脳および小脳を 1%NP40, 0.5%deoxycholate 入りトリス緩衝溶液でホモジネートしたものを SDS-PAGE の後ウェスタンブロットした。血清は 100 倍希釈で使用した。

- ・免疫細胞化学 (ICC)

妊娠 16 日マウスより胎児をとりだしその大脳皮質からプライマリーカルチャーサンプルを用意した。2〜3 週間インキュベーターの中で維持したのち、培養液中に最終濃度が 500 倍希釈になるよう血清を加え 1 時間反応させた。続いて、細胞を 4%PFA で固定し、さらに 0.1% TritonX-100 加 PBS で 2 次抗体の浸透性を確保した後、Alexa488 結合抗ヒト IgG 抗体を反応させた。親水性封入剤で封入後、蛍光顕微鏡下で観察した。

未知の抗神経細胞抗体の抗原同定は、マウス初代神経培養細胞、マウス胎児脳およびマウス成人脳をホモジネートして、Tris 可溶画分、Triton 可溶画分および Triton 不溶画分、SDS-Page の後 Western Blot によりバンドの同定を試みる。その後患者血清を用いた抗体カラムを作成し、陽性バンドと判断した蛋白の精製を行った。

4. 研究成果

本研究では、臨床的に PNS を疑われた 30 例の血清について検討した。その結果、23 例

でいずれかの方法で陽性所見を認め、同 18 例で 2 種類以上の方法で陽性所見が得られた。

ドットブロット法で陽性だった 13 例中、3 例ではウェスタンブロット法で対応するバンドが確認されず、このような例はドットブロット偽陽性例とした。残り 10 例の内訳は、Hu 抗体 3 例、Ma2 抗体 4 例、Yo 抗体 2 例、CRMP5 抗体 2 例、Amphyphisin 抗体 2 例

(複数の抗体陽性例 3 例が含まれる) 出会った。

IHC ではドットブロット陰性例の約半数で何らかの染色パターンがみられ、ウェスタンブロット法でもなんらかのバンドをみとめ未知の抗体の存在が示唆されたものは、計 4 例であった。

初代神経培養系を用いた細胞免疫染色では多くのケースで (非特異的な) グリア細胞表面へのヒト IgG の沈着が見られたが、疾患対照群でも 9 例中 4 例で沈着が確認され、特異度が低く、スクリーニングには不適と考えた。一方で、Hu 抗体陽性 3 例中、感覚優位のニューロパチーを来した Hu 陽性 2 例のみで神経細胞体内および核内に陽性所見が観察された。これは Hu 抗体が何らかの方法で細胞内に取り込まれたことを示唆する所見であり、Hu 抗体陽性全例がそうならなかったことを考え合わせると、同じ抗体が陽性でも症状がことなる原因解明につながる所見と考えた。

陽性コントロールは 1 例のみであるが、本研究に用いたいずれの方法でも、各種抗受容体抗体が検出されておらず、別の方法でのスクリーニングが必要である。

未知の抗体の存在が示唆された 4 例のうち 1 例について患者血清を用いた抗体カラムを作成し、ある程度の精製レベルのバンドを得ることに成功したが、そのアミノ酸配列の解析は今後の課題である。

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1件)

① Hida A, Kowa H, Iwata A et al. Aceruloplasminemia in a Japanese woman with a novel mutation of CP gene: clinical presentations and analysis of genetic and molecular pathogenesis. J Neurol Sci., 査読有, Vol. 298, 2010, 136-139.

[学会発表] (計4件)

① 古和久朋, 岩田淳, 清水潤, 辻省次. 抗神経細胞抗体スクリーニングの至適化. 第50回日本神経学会総会, 2009年5月20日.

② 古和久朋, 岩田淳, 清水潤, 辻省次. 抗神経細胞抗体のスクリーニング系に関する検討. 第51回日本神経学会総会, 2010年5月21日.

③ Kowa H, Iwata A, Shimizu J, Tsuji S. High-Sensitive Detection System for Paraneoplastic Anti-Neuronal Antibodies. 61st AAN Annual Meeting, 2009年4月27日

④ Kowa H, Hida A, Iwata A et al. Novel mutation of CP genes inhibits its secretion and causes aceruloplasminemia. 62nd AAN Annual Meeting, 2010年4月13日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古和 久朋 (KOWA HISATOMO)

神戸大学・医学部附属病院神経内科・講師
研究者番号: 60396728

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし