

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249048

研究課題名(和文) 網羅的自己抗体プロファイリング法に基づく免疫性神経疾患の病態解明と治療戦略の構築

研究課題名(英文) Elucidation of molecular basis and therapeutic strategy of immune-mediated neurological diseases based on comprehensive analysis of autoantibodies

研究代表者

辻 省次 (Tsuji, Shoji)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70150612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,000,000円、(間接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：生理的な構造を維持したタンパク(約19,000種類)を網羅的に搭載したプロテインアレイを用いて、paraneoplastic cerebellar degenerationの9症例、抗体介在脳炎9症例、急性自律神経ニューロパチー1例、抗体介在筋炎1例について、プロテインアレイを用いて、網羅的な自己抗体プロファイリング解析を実施した。それぞれの症例で、40-60ほどの抗原を認識する抗体の存在を確認され、6例でY0抗体(CDR2)を確認できた。同一血清が認識する抗原間で、共通するepitopeの存在は積極的に支持されず、それぞれの血清は異なる抗原epitopeを認識していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Employing active protein arrays containing recombinant proteins with preserved native structures, sera from 20 patients with paraneoplastic cerebellar degeneration, immune-mediated encephalitis, acute autonomic neuropathy, and immune-mediated myositis are subjected to comprehensive antigen screening. Forty to 60 antigens were recognized by the individual serum. Search for homologous regions among the antigens recognized by the same serum revealed that the epitopes are not shared among these antigens.

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：神経病態免疫学 プロテインアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性神経疾患や傍腫瘍性神経疾患の発症に、自己抗体が関与することは古くから知られている。しかしながら、最近になっても、新しい自己抗体が見出され続けている。例を挙げると、精巣腫瘍に伴って著明な錐体外路症候を示す疾患における抗 Ma2 抗体、卵巣奇形種に伴って発症する非ヘルペス性辺縁脳炎における抗 NR1/NR2 heteromer 抗体、“アジア型の多発性硬化症” (neuromyelitis optica) における抗アポリン 4 抗体など、新たな自己抗体の発見が続いている。従来 VGKC に対する抗体と考えられていた脳炎や ISAACS 症候群における抗体の真の標的分子が LGI1 であることが最近報告されている。

これまでの研究では、免疫組織学的観察、あるいは、Western blot 解析などによって、自己抗体の存在が示唆される場合に、その抗原の同定を試みるというものであった。2次元電気泳動などを行って、タンパクの同定を試みられているが、多大な労力を必要とし、非常に困難であった。また、Western blot 解析は、変性したタンパクに対する抗体活性を検出する方法であり、本来の生理的な立体構造をとったタンパクを認識する自己抗体の検出ができないという限界があった。

Western blot 解析でしばしば観察されるように、自己抗体が認識する抗原は複数存在することが多い。これまでは、特にシグナルの強いバンドにのみ着目することが多く、自己抗体のプロファイリングという視点で、網羅的な解析は行われていなかった。申請者らによるタンパクアレイを用いたこれまでの予備的検討からも、自己抗体は一種類でなく、認識する抗原の異なる複数の自己抗体の存在が確認できている。

上記の課題を解決するための最適な方法として、研究分担者の五島らによりヒト完全

長 cDNA リソースと小麦無細胞タンパク質合成系を活用することによって、これまでにない網羅性を持ち、生理的な立体構造をとったタンパクアレイの開発が進められており (Goshima et al. Nature Methods (2008)), 現在では約 19,000 種のタンパクを搭載している。このタンパクアレイを用いた予備的な検討で、Ma2 に対する自己抗体の高感度な検出ができること、さらに興味深いことに、自己抗体は 1 種類でなく、複数 (症例毎に、20-30 種類) 存在することを確認している。この方法を用いることにより、1. 自己抗体が認識する抗原分子の同定が直ちに実現すること、さらに、2. 複数存在する自己抗体を網羅的に検出することができる (自己抗体プロファイリング)。このように、それぞれの抗原タンパクを同定した上で、網羅的自己抗体プロファイリング法が実現することにより、免疫性神経疾患の病態解明が飛躍的に発展すると期待される。さらに、このような自己抗体プロファイリングに基づき、最適な治療戦略の構築が可能になると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、生理的な構造を維持したタンパク (約 19,000 種類) を網羅的に搭載したプロテインアレイを用いて、自己免疫性神経疾患、傍腫瘍性神経疾患について、その病態に関与する抗体群を体系的に、網羅的に明らかにする。その結果、これらの疾患の発症に関与する新規の自己抗体を全て明らかにする。これらの成果に基づき、自己免疫性神経疾患、傍腫瘍性神経疾患について、発症に関与する自己抗体プロファイリングを行い、そのプロファイルに基づき、症例毎に関与する病態機序を明らかにする。網羅的自己抗体プロファイリングに基づき、臨床試験として汎用性の高い新規プロテインアレイを構築し、これらの疾患

に対して、格段に感度、特異性の高い診断法を確立するとともに、自己抗体プロファイルに基づき最適な治療法を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、生理的な構造を維持したタンパク（約 19,000 種類）を網羅的に搭載したプロテインアレイを作成、自己抗体が介在することが考えられる、自己免疫性神経疾患、傍腫瘍性神経疾患について、血清が認識する自己抗体の抗原を網羅的に同定することを目的として解析を進めた。見出された抗原タンパクについては、相互の相同性について、どの程度共通のエピトープが存在するかどうかについても、独自のコンピュータプログラムを開発して、認識されているタンパクのアミノ酸配列間の相同性について、さまざまな条件を設定した解析を行った。同一血清が認識する抗原間の比較と、異なる血清が認識する抗原間の比較を行うことにより、同一血清が認識する抗原間で共有されるアミノ酸配列の数が、異なる血清が認識する抗原間に比して多いかどうかを指標として検討した。

### 4. 研究成果

抗体介在性の機序が作用していると考えられる免疫性神経疾患について、詳細な臨床的検討を行い、自己免疫性神経疾患、傍腫瘍性神経疾患の症例の蓄積を行い、これらの症例の中から、paraneoplastic cerebellar degeneration の 9 症例、抗体介在脳炎 9 症例、急性自律神経ニューロパチー 1 例、抗体介在筋炎 1 例を抽出して、これら 20 症例について、新型プロテインアレイ（アクティブプロテインアレイ）を用いて、網羅的な自己抗体プロファイリング解析を実施し、それぞれの症例で、40-60 ほどの抗原を認識する抗体の存在を確認さ

れ、6 例で Y0 抗体 (CDR2)を確認できた。同一の血清で認識される抗原間で、共通の epitope が存在するかどうかを検索したが、異なる血清で認識される抗原間の比較に対して、同一血清で認識される抗原間において共通の epitope が有意に高頻度に認識されるという現象は観察されなかった。すなわち、症例毎に認識される抗原が 1 種類ではなく、多数の抗原が、独立に認識されていることが示された。この結果は、特定の抗原を認識する自己抗体が自己免疫性神経疾患、傍腫瘍性神経疾患の発症を規定する、という従来の考えを改める必要があることを示した。

### 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 5 件)

Sawamura H, Yamamoto T, Ohtomo R, Bannai T, Wakakura M, Tsuji S. Anti-NMDA Receptor Encephalitis Associated With Transient Cerebral Dyschromatopsia, Prosopagnosia, and Lack of Stereopsis. J. Neuro-ophthalmol. 34:144-8. 2014

Kusunoki S. Autoantibodies in neuro-immunological diseases; relevance of fine specificity. Exp. Neurol. 250:219-20, 2013

Kuwahara M, Suzuki H, Samukawa M, Hamada Y, Takada K, Kusunoki S. Clinical features of CIDP with LM1-associated antibodies. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 84:573-5, 2013.

Tetsuka S, Tominaga K, Ohta E, Kuroiwa K, Sakashita E, Kasashima K, Hamamoto T, Namekawa M, Morita M, Natsui S, Morita T, Tanaka K, Takiyama Y, Nakano I, Endo H. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with an onconeural antibody against creatine kinase, brain-type. J. Neurol. Sci. 335:48-57, 2013.

Yamamoto T, Nakayama K, Hirano H, Tomonaga T, Ishihama Y, Yamada T, Kondo T, Koderu Y, Sato Y, Araki N, Mamitsuka H, Goshima N. Integrated view of the human chromosome X-centric proteome project. J. Proteome Res. 12:58-61, 2013.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

辻 省次 (TSUJI, Shoji)  
東京大学医学部附属病院・教授  
研究者番号：70150612

### (2) 研究分担者

五島 直輝 (GOSHIMA, Naoki)  
産業技術総合研究所・主任研究員  
研究者番号：70215482

楠 進 (KUSUNOKI, Susumu)  
近畿大学医学部・教授  
研究者番号：90195438

田中 恵子 (TANAKA, Keiko)  
金沢医科大学医学部・教授  
研究者番号：30217020

### (3) 連携研究者

清水 潤 (SHIMIZU, Jun)  
東京大学医学部附属病院・講師  
研究者番号：40260492