

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07815

研究課題名（和文）脱髄型ギラン・バレー症候群の新規標的分子の探索と分子相同性による発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidating the pathogenesis of demyelinating type of Guillain Barre syndrome.

研究代表者

澤井 摂 (Sawai, Setsu)

千葉大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10400962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、サイトメガロウイルス（CMV）感染後の脱髄型ギラン・バレー症候群（GBS）の免疫標的分子がmoesinであることを明らかにして、病態を解明することを目的とした。GBS多検体を用いた解析では、抗moesin抗体はCMV感染以外の脱髄型GBSでも陽性となり、脱髄型GBSに共通の病態が示唆された。ペプチドアレイを用いたmoesinアミノ酸配列における免疫標的部位の探索では、2つの候補ペプチドがみつき、データベース解析でCMVとの分子相同性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GBSの死亡率は約5%で、20%の患者は半年後に独立歩行ができない。このような現状から病態機序の解明が必要とされる。本研究によって得られた抗moesin抗体は脱髄型GBSの診断マーカーになる可能性があり、またmoesinは分子標的治療の新規治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify that moesin is a target molecule for cytomegalovirus (CMV)-related Guillain-Barre syndrome (GBS). In an analysis using GBS multiple samples, anti-moesin antibodies also tested positive for demyelinating GBS other than CMV infection, suggesting a common pathology for demyelinating GBS. In the search for immune target sites in the moesin amino acid sequence using peptide array, two candidate peptides were found, and database analysis suggested molecular homology with CMV.

研究分野：神経免疫学

キーワード：ギラン・バレー症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ギラン・バレー症候群 (GBS) は感染症後に急性運動麻痺をきたす自己免疫性末梢神経障害である。死亡率は約 5% で、20% の患者は半年後に独立歩行ができない。このような現状から病態機序の解明と急性期の診断マーカーの開発が必要とされる。

GBS は末梢神経の軸索が主病変である軸索型と、髄鞘が主病変である脱髄型の二大病型に分けられる。このうち軸索型は、キャンピロバクターなどの細菌表面上の構造と末梢神経軸索上のガングリオシドとの構造が似ていることで起こる、分子相同性による交叉免疫によって発症する病態機序がほぼ確立されている。一方、脱髄型の標的分子はこれまで不明であった。

Schwann 細胞膜に発現する蛋白質が標的分子として有望であるという知見から、我々はこれまでに、プロテオーム解析により、サイトメガロウイルス (CMV) 感染後の脱髄型 GBS 患者の血中に、moesin に対する自己抗体の存在を示した。

2. 研究の目的

本研究は脱髄型 GBS の病態機序を解明のため、これまでの研究成果を推進し、CMV 感染後の脱髄型 GBS について moesin が免疫標的分子であることを明らかにすることを目的とする。

本研究によって moesin が免疫標的分子であることが明らかにされれば、脱髄型 GBS の診断マーカーの開発と、分子標的治療による新規治療法開発につながる可能性がある。

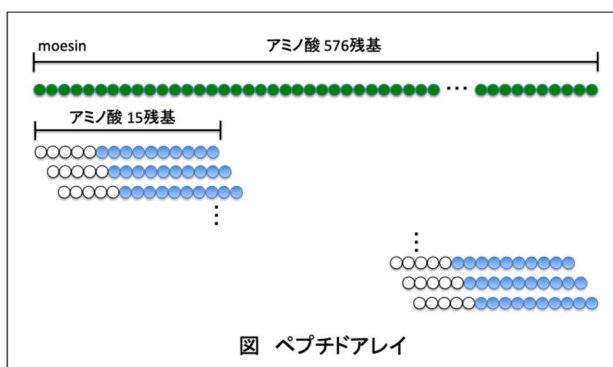
3. 研究の方法

(1) GBS 患者の多検体を用い、CMV 感染後の GBS における抗 moesin 抗体の存在の検証を行った。検証は GBS 55 例、正常対照 22 例の血清を用いて、合成 moesin 蛋白質を用いたウエスタンブロット法により行った。GBS 55 例中 21 例が抗ガングリオシド抗体 (抗 GM1 抗体) 陽性であり軸索型 GBS と考えられた。抗ガングリオシド抗体陰性の 34 例中 3 例が CMV IgM 陽性であり CMV 感染後 GBS と考えられた。

抗 moesin 抗体の解析には、合成 moesin 蛋白質 100ng を用いて、まず SDS-PAGE で電気泳動を行い、患者血清を一次抗体、抗ヒト IgG 抗体を二次抗体としたウエスタンブロットを行い、得られたバンドをデンシトメトリーで定量化し解析した。

(2) 抗 moesin 抗体陽性の GBS 患者血清を用い、患者血清中の抗 moesin 抗体が認識する moesin のアミノ酸配列上のエピトープを解析した。

解析にはペプチドアレイ (PEPperPRINT) を用い、重複配列のある 15 残基ずつに分割した合成ペプチドに対する反応を解析することで、結合配列を絞り込みエピトープ配列を決定することとした。



(3) さらに、同定した結合配列が真のエピトープであるか判定するために、同定した結合配列の合成ペプチドを作製し、そのペプチドにビオチン標識してストレプトアビジンプレートに固相化することで ELISA の作製を試みた。

4. 研究成果

(1) GBS 患者の多検体を用いた抗 moesin 抗体の解析結果は、正常対照の結果から平均 + 2SD (標準偏差) をカットオフ値に設定し評価した。その結果、GBS 55 例中 7 例 (12.7%) で陽性であり、また、正常対照 22 例中 2 例 (9.1%) で陽性であった。GBS 症例のうち抗ガングリオシド抗体陽性 21 例では 1 例のみ陽性で、抗ガングリオシド抗体陰性 34 例では 7 例が陽性だった。CMV IgM 抗体陽性の 3 例中 2 例は抗 moesin 抗体が陽性であったが、1 例は陰性であった。

GBS 患者の多検体を用いた抗 moesin 抗体の解析結果では、CMV 感染以外の脱髄型 GBS でも抗 moesin 抗体が存在していることが分かり、CMV 以外の感染症でも共通の病態が示唆された。病原体の情報は明らかではなかった。

(2) 抗 moesin 抗体が陽性であった CMV IgM 陽性 GBS の 3 例について、moesin ペプチドアレイを用いた解析を行った。3 症例全てにみられる共通のエピトープはなかったが、2 症例ずつに共通する 2 つの候補ペプチドが同定された。2 つの候補ペプチドは CMV の抗原蛋白質とのデータベースサーチで一部に共通するアミノ酸配列を認め、標的分子としても矛盾はない結果であった。

(3) 3 検体のペプチドアレイ解析により、免疫標的配列の候補として得られた 2 つのアミノ酸配列についてペプチドを合成し、ELISA を作製し解析した。1 つのペプチドについては測定系の構築が困難だった。もう一方のペプチドの結果は moesin 合成蛋白質を用いたウエスタンブロット法とほぼ似た結果であったため、現時点では、これが病態に関わる真のエピトープかは明らかでなかった。

GBS の多検体を用いて解析したが、対象とした CMV 感染後の GBS 症例が 3 例と少なかったため、十分な解析ができなかった。今後は同様の手法により症例数を増やして解析することで、真のエピトープの発見につながると考えられる。真のエピトープを同定することで、診断キットの開発につながるだけでなく、エピトープの配列で作製した合成ペプチドを動物に免疫することで疾患モデルの作製が可能となり、病態の解明に近づくとと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sawai Setsu, Mori Masahiro, Makino Takahiro, Nakano Yoshikazu, Kuwabara Satoshi, Kamitsukasa Ikuo	4. 巻 23
2. 論文標題 Severe orthostatic hypotension associated with lesions of the area postrema in neuromyelitis optica spectrum disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ensci.2021.100335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shibuya Kazumoto, Misawa Sonoko, Uzawa Akiyuki, Sawai Setsu, Tsuneyama Atsuko, Suzuki Yo-Ichi, Suichi Tomoki, Kojima Yuta, Nakamura Keigo, Kano Hiroki, Prado Mario, Kuwabara Satoshi	4. 巻 91
2. 論文標題 Split hand and motor axonal hyperexcitability in spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1189 ~ 1194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jnnp-2020-324026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibuya Kazumoto, Sawai Setsu, Sugiyama Atsuhiko, Koide Mizuho, Nishiyama Ayumi, Aoki Masashi, Kuwabara Satoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Facial onset amyotrophic lateral sclerosis with K3E variant in the Cu/Zn superoxide dismutase gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration	6. 最初と最後の頁 144 ~ 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21678421.2020.1797092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kakinuma S, Beppu M, Sawai S, Nakayama A, Hirano S, Yamanaka Y, Yamamoto T, Masafumi C, Aisahaer X, Aersilan A, Gao Y, Sato K, Sakae I, Ishige T, Nishimura M, Matsushita K, Satoh M, Nomura F, Kuwabara S, Tanaka T	4. 巻 19
2. 論文標題 Monoamine oxidase B rs1799836 G allele polymorphism is a risk factor for early development of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ensci.2020.100239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Atsushi, Jitsuishi Tatsuya, Hozumi Takashi, Iwanami Jun, Kitajo Keiko, Yamaguchi Hiroo, Mori Yasutake, Mogi Masaki, Sawai Setsu	4. 巻 13
2. 論文標題 Temporal expression profiling of DAMPs-related genes revealed the biphasic post-ischemic inflammation in the experimental stroke model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00598-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Fumitaka, Oishi Mariko, Sawai Setsu, Beppu Minako, Misawa Sonoko, Matsui Naoko, Miyashiro Ai, Maeda Toshihiko, Takeshita Yukio, Nishihara Hideaki, Sano Yasuteru, Sato Ryota, Kaji Ryuji, Kuwabara Satoshi, Kanda Takashi	4. 巻 90
2. 論文標題 Increased IP-10 production by blood-nerve barrier in multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy and multifocal motor neuropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 444 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2018-319270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishige Takayuki, Itoga Sakae, Kawasaki Kenji, Utsuno Emi, Beppu Minako, Sawai Setsu, Nishimura Motoi, Ichikawa Tomohiko, Nomura Fumio, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 495
2. 論文標題 Evaluation of analytical factors associated with targeted MEFV gene sequencing using long-range PCR/massively parallel sequencing of whole blood DNA for molecular diagnosis of Familial Mediterranean fever	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 562 ~ 569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2019.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishige Takayuki, Itoga Sakae, Kawasaki Kenji, Sawai Setsu, Nishimura Motoi, Nomura Fumio, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 587
2. 論文標題 Multiplex PCR and multicolor probes melting for the simultaneous detection of five UGT1A1 variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2019.113448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤井撰、宇津野恵美、石毛崇之、川崎健治、松下一之
2. 発表標題 遺伝性脊髄小脳変性症のat riskである未発症血縁者に対する遺伝学的検査
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤井撰、牧野隆宏、森雅裕、桑原聡、上司郁男
2. 発表標題 起立性低血圧により意識消失を繰り返した視神経脊髄炎の一例
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤井撰
2. 発表標題 Fabry病の酵素補充療法と今後の治療の展望
3. 学会等名 第73回日本自律神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤井 撰、石毛崇之、北村浩一、糸賀栄、松下一之
2. 発表標題 大量並列シーケンシングを用いたウィルソン病原因遺伝子ATP7Bの遺伝学的検査の確立
3. 学会等名 日本神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤井 撰、石毛 崇之、北村 浩一、糸賀 栄、松下一之
2. 発表標題 大量並列シーケンシングによるウィルソン病原因遺伝子ATP7B の遺伝学的検査
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤井 撰、宇津野恵美、別府美奈子、石毛崇之、松下一之
2. 発表標題 遺伝性神経筋疾患のat riskである未発症血縁者に対する遺伝学的検査
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 守 (Sato MAMORU) (20401002)	千葉大学・医学部附属病院・特任准教授 (12501)	
研究分担者	桑原 聡 (Kuwabara Satoshi) (70282481)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	森 雅裕 (Mori Masahiro) (70345023)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------