

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K07975
 研究課題名(和文) 自己免疫性神経疾患における炎症細胞浸潤を誘導する血管内皮細胞膜抗原の網羅的同定

 研究課題名(英文) Identification of targeted membrane antigens of human brain microvascular endothelial cells in relapsing-remitting multiple sclerosis

 研究代表者
 竹下 幸男 (Yukio, Takeshita)

 山口大学・大学院医学系研究科・助教

 研究者番号：70749829
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 当科で樹立した温度感受性微小脳血管細胞株の炎症細胞浸潤を誘導する未治療発症時の再発寛解型MSの患者血清を選定し、IgGを抽出した。培養したHBMECの膜蛋白をBiotin化し、超遠心後に細胞膜分画を抽出した。選定したRRMS患者IgGおよび健常者のプールIgGを磁性ビーズに結合させた後に、抽出した膜蛋白に結合させ、免疫沈降法を行い質量分析解析により膜蛋白分子を約30種類同定した。その中で、BBB機能に關与する可能性のある分子Xを新たな標的分子とし、10名のRRMS患者血清中3名で同分子Xに対する自己抗体が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 今回、微小脳血管内皮細胞株の膜蛋白を抽出し、RRMS患者中の自己抗体で標識される膜蛋白分子を同定する方法を確立した。本手法により他の神経炎症性疾患における血管内皮細胞の標的膜蛋白分子の同定が可能となりうる。また、同定した分子群においてBBB調整機能を持つ標的分子Xは、複数のRRMS患者で自己抗体が検出され、RRMSの発症マーカーになるだけでなく、自己抗体が標的となる膜蛋白Xに作用することでBBBの炎症細胞浸潤を誘発し、RRMSの発症に關与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Sera from the patient of RRMS which can downregulate BBB function of HBMECs was selected. The membrane of HBMECs were biotinylated and its plasma membrane fraction was isolated by ultracentrifugation. The extracted membrane-protein were immunoprecipitated with IgG from the RRMS or normal subjects. After separating eluted proteins by SDS-PAGE, specific bands in the RRMS were determined by mass spectrometry.

We identified the 21 membrane-proteins as targeted auto-antigens in the RRMS. One of them was known to be relevant to BBB function. In 10 RRMS patients, three patients had the auto-antibody against this molecule.

We succeeded in construction of the method that allows us to efficiently investigate targeted antigens from plasma membrane fraction of HBMEC, using the biotinylation of HBMECs and the isolation of membrane fraction by ultracentrifugation. This identified antigen could be an immunological target molecule, contributing to the BBB breakdown in RRMS.

研究分野：神経免疫

キーワード：血液脳関門 多発性硬化症 炎症細胞浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

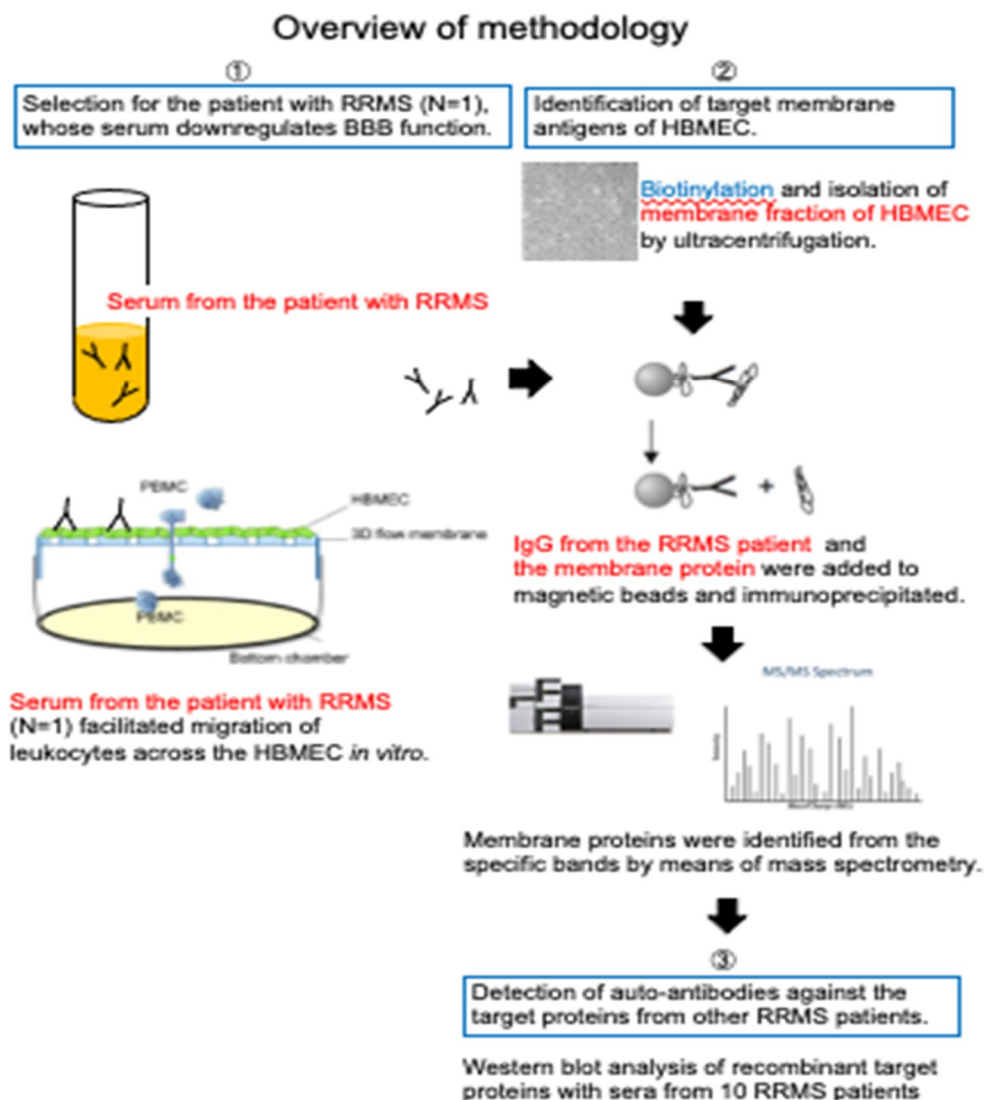
多発性硬化症(MS)は、血液脳関門(BBB)の破綻によって自己反応性病的リンパ球が中枢神経内に浸潤することが主病態とされている。様々な液性因子によって、血液脳関門が破綻することが発症の起点と考えられているが、これまでMSの液性因子による炎症細胞浸潤によるBBB破綻のメカニズムは不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では、再発寛解型多発性硬化症(RRMS)患者において、BBBの破綻を誘発する微小脳血管内皮細胞の膜蛋白に対する自己抗体の検出し、その標的膜蛋白分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

当科で樹立した温度感受性微小脳血管細胞株の炎症細胞浸潤を誘導する未治療発症時の再発寛解型MSの患者血清を選定し、IgGを抽出した。培養したHBMECの膜蛋白をBiotin化し、超遠心後に細胞膜分画を抽出した。選定したRRMS患者IgGおよび健常者のプールIgGを磁性ビーズに結合させた後に、抽出した膜蛋白に結合させ、免疫沈降法を行った。沈降物を、質量分析解析により分子を同定した。



4. 研究成果

RRMS患者由来IgGが特異的に認識する膜蛋白分子を約30種類同定した。その中で、BBB機能に参与する可能性のある分子X,Yを新たな標的分子とし、10名のRRMS患者血清中の標的分子X,Yに対する自己抗体の有無を検討したところ、3名で同分子X,Yに対する自己抗体が検出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹下幸男、藤川晋、清水文崇、古賀道明、神田隆
2. 発表標題 Identification of targeted membrane antigens of human brain microvascular endothelial cells in relapsing-remitting multiple sclerosis
3. 学会等名 日本神経免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukio Takeshita, Susumu Fujikawa, Tomohiro Makino, Masato Hoshino, Takeshi Hanada, Makoto Masumura, Hideaki Nishihara, Toshihiko Maeda, Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Michiaki Koga, Takashi Kanda
2. 発表標題 Identification of targeted membrane antigens of human brain microvascular endothelial cells in relapsing-remitting multiple sclerosis
3. 学会等名 World Congress of Neurology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------