

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590993

研究課題名（和文）プロテオミクスによる筋無力症・筋炎特異的自己抗体の検索とバイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Identification of muscle specific autoantibodies for myasthenic syndromes and myositis by proteomic analysis

研究代表者

犬塚 貴 (INUZUKA TAKASHI)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50184734

研究成果の概要（和文）：

ラットの骨格筋蛋白を抗原とする二次元免疫プロット法と質量分析法を組み合わせたプロテオミクスの手法を用いて、筋炎の患者血清中に存在する特異的抗筋抗体の検索を行った。対象とした血清は、筋生検で確認された 10 例の特発性炎症性筋炎（多発性筋炎 7 例、壊死性筋炎 2 例、皮膚筋炎 1 例）、対照として筋強直性ジストロフィー 11 例、健常人 10 例であった。特発性炎症性筋炎 (IIM) の患者血清に有意に高頻度に反応する 7 スポットを検出し、LC-MS/MS 質量分析法により、これらから 2 つの新たな抗体認識抗原を同定した。myosin-binding protein (fast type) [MBP C] と pyruvate kinase isozyme M1/M2 [PK M1/M2] という筋特異的分子であり、前者は免疫グロブリンスーパーファミリーの一つで骨格筋や心筋の thick filament に存在し、後者は骨格筋に豊富に存在するフォスフェノールピルビン酸をピルビン酸に変換する酵素である。いずれも実験的自己免疫性筋炎を動物に惹起しうる抗原として報告されている。IIM における抗 MBP C 抗体は 9/10 で陽性、抗 PK M1/M2 抗体は 5/10 で陽性であった。抗体の病因的意義についての検討は今後の課題であるが、両抗体組み合わせた場合の IIM 診断感受性は 50%、特異性は 80% であり、多発性筋炎の診断については感受性は 71%、特異性は 92% であり、有力な診断バイオマーカーの候補となることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We identified two novel antibodies against muscle-specific components in sera of idiopathic inflammatory myopathies (IIMs) patients by proteomic analysis. These target antigens were myosin-binding protein C (MyBP C) and pyruvate kinase isozyme M1/M2 (PK M1/M2). MyBP C belongs to the immunoglobulin superfamily. PK catalyzes the conversion of phosphoenolpyruvate with regeneration of ATPs. Both molecules have been reported as possible myositogenic antigen for experimental autoimmune polymyositis.

The number of patients with the anti-MyBP C antibody was significantly higher among the IIM patients (9 of 10) than among the healthy control (1 of 10) and myotonic dystrophy (MyD) patients (5 of 11). The number of patients with the anti-PK M1/M2 antibody was significantly higher among the IIM patients (5 of 10) than among the healthy control (0 of 10) and myotonic dystrophy (MyD) patients (2 of 11). The sensitivity of this combination assay for diagnosis IIM was 50% and specificity was 80%. The sensitivity of this combination assay for diagnosis polymyositis was 71% and specificity was 92%. Therefore we propose that this combination assay is a candidate for further exploration as a diagnostic marker of IIM, particularly polymyositis.

To clarify the pathogenic roles of anti-MyBP C and PK M1/M2 antibodies in IIM, we must perform more experiments such as using animal models in which these antibodies are passively administered.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：プロテオミクス, 抗筋抗体, 炎症性筋炎, バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症の液性免疫の関与は明らかにされており、筋組織に対するさまざまな自己抗体の存在が報告されている。しかし抗体が見つからない症例も少なからず存在する。また多発性筋炎/皮膚筋炎では細胞性免疫機序が主体と考えられているが抗aminoacyl-tRNA合成酵素、抗Mi-2抗体などの自己抗体も報告されている。しかしこれらの検出率は低く、診断マーカーとしても、また病的意義についても、まだ充分にあきらかにされていない。

2. 研究の目的

我々は自己免疫性の筋無力症や筋炎の病態解明と新たな診断バイオマーカーと治療法の開発を目指している。本研究では液性免疫の観点から、患者の筋蛋白に対する疾患特異的な自己抗体の検出とその認識抗原を明らかにし、診断や病勢のマーカーを確立させる。

3. 研究の方法

ラットの骨格筋蛋白を抗原とする二次元免疫ブロット法と高感度のナノLC-MS/MS質量分析法を組み合わせたプロテオミクスの手法を用いて、筋炎の患者血清中に存在する特異的抗筋抗体の検索を行う。

対象とした血清は、筋生検で確認された10例の特発性炎症性筋炎（多発性筋炎7例、壊死性筋炎2例、皮膚筋炎1例）、対照として筋強直性ジストロフィー11例、健常人10例であった。

患者血清中に検出された抗体を用いて、免疫組織学的な検討と抗体スクリーニングのためのELISAシステムを確立し、自己抗体と病態との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

二次元免疫ブロット上、特発性炎症性筋

炎(IIM) 10例の血清に反応したスポットは337個で、筋強直性ジストロフィー11例の反応スポットは249個、健常人10例の反応スポットは257個であった。IIMに有意に高頻度に反応する7スポットを選び、LC-MS/MS質量分析法により、2つの新たな抗体認識抗原を同定した。myosin-binding protein(fast type) [MBP C]と pyruvate kinase isozyme M1/M2 [PK M1/M2]という筋特異的分子であり、前者は免疫グロブリンスーパーファミリーの一つで骨格筋や心筋の thick filament に存在し、後者は骨格筋に豊富に存在するフォスフェノールピルビン酸をピルビン酸に変換する酵素である。いずれも実験的自己免疫性筋炎を動物に惹起しうる抗原として報告されている。IIMにおける抗 MBP C 抗体は9/10で陽性、抗 PK M1/M2 抗体は5/10で陽性であった。両抗体を組み合わせた場合の IIM 診断感受性は50%、特異性は80%であり、多発性筋炎の診断については感受性は71%、特異性は92%であり、有力な診断バイオマーカーの候補となることを明らかにした。

これらの抗体陽性者と年齢、性、病型、CK値、その他の既知自己抗体、悪性腫瘍の有無とは明らかな関連は認められなかった。これらの抗体による免疫組織学的な検討と抗体スクリーニングのためのELISAシステムの確立については現在進行中である。

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12件)

- ① Sakurai T, Kimura A, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T : Identification of antibodies as biological markers in serum from multiple sclerosis patients by

- immunoproteomic approach. J Neuroimmunology (in press) 査読有
- ② Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T : Elevated anti-heat shock protein 60 antibody titer is related to white matter hyperintensities. Journal of stroke cerebrovascular disease, (in press) 査読有
- ③ Kimura A, Kanoh Y, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T : Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Neurology 74; 1372-1379, 2010 査読有
- ④ Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Tanaka R, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T : High prevalence of autoantibodies against phosphoglycerate mutase 1 in patients with autoimmune central nervous system diseases. J Neuroimmunology 219;105-108, 2010 査読有
- ⑤ Tanaka Y, Kimura K, Kawachi I, Inuzuka T : No relapse of neuromyelitis optica during drug-induced B-lymphopenia with hypogammaglobulinemia. Neurology. 75:1745-1747, 2010 査読有
- ⑥ 木村暁夫, 犬塚 貴: 膠原病に伴う神経・筋障害—診断と治療の進歩 膠原病における新たな抗神経抗体の検索. 日本内科学会雑誌 99;115-120, 2010 査読無
- ⑦ Kimura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Takahashi K, Takemura M, Saito K, Seishima M, Inuzuka T : Proteomic analysis of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus patient with white matter hyperintensities on brain MRI. Lupus 17:16-20, 2008 査読有
- ⑧ Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Nakajima H, Ichiyama T, Inuzuka T: Longitudinal analysis of cytokines and chemokines in the cerebrospinal fluid of a patient with neuro-Sweet disease presenting with recurrent encephalomyelitis. Internal Medicine 47:135-141, 2008 査読有
- ⑨ Hayashi Y, Kimura A, Kato S, Koumura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Sunden Y, Orba Y, Sawa H, Takahashi H, Inuzuka T: Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjögren syndrome. J Neurol Sci. 268:195-198, 2008 査読有
- ⑩ Hayashi Y, Sakurai T, Kimura A, Ikeda T, Matsuyama Z, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Hosoe H, Takahashi H, Inuzuka T: Selective cauda equine hypertrophy with idiopathic inflammation. Muscle Nerve 38: 1065-1069, 2008 査読有
- ⑪ 櫻井岳郎, 田中優司, 香村彰宏, 林 祐一, 木村暁夫, 保住 功, 米田 誠, 犬塚 貴: Creutzfeldt-Jakob病と類似の臨床経過を示したBasedow病と伴った橋本脳症の1例 BRAIN and NERVE 60:559-565, 2008 査読有
- ⑫ 鈴木真理子, 林祐一, 木村暁夫, 永澤守, 香村彰宏, 櫻井岳郎, 田中優司, 保住功, 犬塚貴: 介護従事者にみられた水痘脊髄炎 BRAIN and NERVE 60:79-83, 2008 査読有
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T : Anti-Endothelial Cell Antibodies in the Elderly with Extended White Matter Hyperintensity. American Academy of Neurology 63st Annual Meeting (2011. 4. 13, Honolulu, USA)
- ② 櫻井岳郎, 木村暁夫, 山田 恵, 香村彰宏, 林祐一, 田中優司, 保住功, 犬塚貴 : Stress 70 protein抗体の特異性に関する検討. 第51回日本神経学会総会. (2010. 5. 22 東京)
- ③ 木村暁夫, 櫻井岳郎, 山田 恵, 香村彰宏, 林 祐一, 田中優司, 保住 功, 犬塚 貴 : Motor-dominant CIDP患者の臨床的検討. 第51回日本神経学会総会. (2010. 5. 21 東京)
- ④ 木村暁夫, 櫻井岳郎, 山田 恵, 林祐一, 田中優司, 保住 功, 犬塚 貴 : 多発性硬化症患者における抗Phosphoglycerate mutase 1抗体の特異性に関する検討. 第21回日本神経免疫学会学術集会 (2009. 3. 13 大阪)

- ⑤ 櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴：プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体の検索。第21回日本神経免疫学会学術集会 (2009. 3. 13大阪)
- ⑥ Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Inuzuka T.: Identification of Antibodies Against Brain Antigen in Sera of Patients with Neuropsychiatric Systemic lupus erythematosus. American Academy of Neurology 61st Annual Meeting (2009. 4. 29, Seattle, USA)
- ⑦ 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴：抗Hsp60抗体と大脳白質病変に関する研究。第50回日本神経学会総会。(2009. 5. 20. 仙台)
- ⑧ 櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、林祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴：プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体の検索。第50回日本神経学会総会 (2009. 5. 22 仙台)
- ⑨ 櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、香村彰宏、林祐一、田中優司、保住功、犬塚貴；通常型多発性硬化症における抗第49回日本神経学会総会 (2008. 5. 16 横浜)
- ⑩ 木村暁夫、櫻井岳郎、山田恵、林祐一、田中優司、保住功、犬塚貴：CNSループス患者におけるプロテオミクス解析を用いた自己抗体認識抗原の同定。第49回日本神経学会総会 (2008. 5. 16 横浜)
- ⑪ 木村暁夫、櫻井岳郎、山田恵、林祐一、田中優司、保住功、犬塚貴：プロテオミクス解析を用いた中枢神経ループス特異的抗神経抗体の検索；第20回日本神経免疫学会学術集会 (2008. 4. 18 新潟)

[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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬塚 貴 (INUZUKA TAKASHI)
 岐阜大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：50184734

(2) 研究分担者

保住 功 (HOZUMI ISAO)
 岐阜大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：20242430

田中優司 (TANAKA YUJI)
 岐阜大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：70377654

木村 暁夫 (KIMURA AKIO)
 岐阜大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：00362161

(3) 連携研究者

無し