

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790620

研究課題名 (和文) 自己免疫性ニューロパチーの新規標的分子同定と疾患モデル樹立

研究課題名 (英文) Identification of new target molecule in autoimmune-mediated polyneuropathy and establishment of a disease model

研究代表者

船越 慶 (FUNAKOSHI KEI)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：50406188

研究成果の概要 (和文)：

抗糖脂質抗体検索を依頼された IgM M タンパクを伴うニューロパチー患者血清 46 例を対象として、ELISA で、IgM 抗 GD1b、抗 SGPG 抗体を測定した。ヒト脳を抗原とし、ウェスタンブロットで IgM が認識するタンパク質を探索した。抗 GD1b 抗体は 5 例、抗 SGPG 抗体は 30 例で陽性であった。抗 SGPG 抗体陽性例中 18 例が、抗 MAG 抗体も陽性であった。抗 GD1b、抗 SGPG 抗体陰性 13 例のうち 4 例で、40kDa のバンドが検出できた。IgM M タンパクが認識する、MAG 以外のタンパク質を発見した。IgM M タンパクを伴うニューロパチーと各疾患対照群との間で抗体価に有意差 ($p < 0.001$) が認められた。IgM M タンパクを伴うニューロパチーに特異的な自己抗体の標的分子であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed 46 serum samples from neuropathy patients with IgM M protein for anti-glycolipid antibody testing. Serum IgM antibodies against GD1b and SGPG were measured by ELISA. We searched for a new IgM antibody to human brain protein by Western blot. Five were positive for anti-GD1b IgM antibody and 30 for anti-SGPG. Among 13 negative for anti-GD1b and anti-SGPG IgM antibody, 4 were positive for 40 kDa protein. This antibody more frequently was detected in neuropathy patients with IgM M protein than in each neurological disease control. We suggest that the 40kDa protein could be a target molecule for specific autoantibody in neuropathy with IgM M protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：免疫性ニューロパチー 自己抗体 標的分子

1. 研究開始当初の背景

慢性に発症・進展したり，再発・寛解を繰り返す

返したりする、難治性の免疫性ニューロパチーとして、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、IgM M タンパクを伴うニューロパチーなどが含まれる。後者の標的分子として、myelin-associated glycoprotein (MAG) /sulphated glucuronyl paragloboside (SGPG)、GD1bをはじめとするb系列ガングリオシドが同定されているが、多くの場合不明である。有効な治療方法も開発されていない。したがって、発症機序を分子レベルで解明し、その知見に基づいた新規治療法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

IgM M タンパクを伴うニューロパチーの発症機序を分子レベルで解明することを目的として、IgM M タンパクが認識するMAG/SGPG、GD1b以外の新規の分子を探索した。

3. 研究の方法

抗糖脂質抗体検索を依頼されたIgM M タンパクを伴うニューロパチー患者血清46例を対象とした。ELISAで、IgM抗GD1b、抗SGPG抗体を測定した。ヒト脳を抗原とし、ウェスタンブロット、二次元電気泳動およびPVDF膜転写後の銀染色、質量分析でIgMが認識するタンパク質を探索した。

4. 研究成果

(1)抗GD1b抗体は5例、抗SGPG抗体は30例で陽性であった。抗SGPG抗体陽性例中18例が、抗MAG抗体も陽性であった。抗GD1b、抗SGPG抗体陰性13例のうち4例で、40kDaのバンドが検出できた。慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、多発性硬化症では各々50例中1例のみ陽性、急性運動軸索性ニューロパチー、急性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、重症筋無力症、健常対照では各々50例中陽性例はなかった。IgM M タンパクを伴うニューロパチーと各疾患群との間で抗体価

に有意差 ($p < 0.001$) が認められた。IgM M タンパクが認識する、MAG以外のタンパク質Xを発見した。IgM M タンパクを伴うニューロパチーに特異的な自己抗体の標的分子であることが示唆された。また、ヒト脳を抗原とし、ウェスタンブロットでIgGが認識するタンパク質を探索したところ、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー18例中2例に、29kDaのバンドが検出できた。

(2)自己抗体がタンパクXの糖鎖構造を抗原決定基として認識しているか否かを調べるために、N-グリカネース処理を行い、ウェスタンブロットで反応性の有無をみたところ、N-グリコシド結合型糖鎖を有さないタンパク質であることが確認された。ウェスタンブロットの結果より、タンパクXが、ヒト脳から抽出したタンパクの細胞質画分に多く存在すると考えられた。等電点電気泳動後にSDS電気泳動を行い、PVDF膜に転写し、コロイド化銀染色を行った。脱色後にウェスタンブロットを行い、銀染色とウェスタンブロットで染まった各々のスポットを対比させ、タンパクXのスポットに相当する部位をゲルより切り出した。質量分析でタンパクXの同定を試みたところ、GFAPが同定された。質量分析の結果は夾雑物としてのGFAPを拾ってきたと思われた。非還元系のSDS電気泳動を行なったあと、患者血清を用いてウェスタンブロットを行なったが、XのバンドはGFAPのバンドに重なっていた。GFAPを発現していないヒト末梢神経よりタンパクを抽出し、ウェスタンブロットを行ったが、患者血清は反応しなかった。ラット末梢神経でも同様の結果が得られた。

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9件)

- ① Galassi G, Girolami F, Nobile-Orazio E, Funakoshi K, Ariatti A, Odaka M, Acute hand weakness as a regional variant of Guillain-Barré syndrome, *European Journal of Neurology*, 査読有, 16巻, 2009, e49.
- ② 高村一敏, 吉持厳信, 荒竹トシ子, 中尾 紘一, 矢澤省吾, 船越 慶
ヘリコプター搬送で救命できた
Guillain-Barré 症候群の1例
地域医学, 査読有, 23巻, 2009, 782-786
- ③ 竹下ちひろ, 山中 岳, 菅波佑介, 鈴木一徳, 小穴信吾, 河島尚志, 宮島 祐, 船越 慶, 星加明徳
ロタウイルス感染が先行した
Guillain-Barré 症候群の1女児例
日本小児科学会誌, 査読有, 113巻, 2009, 1572-1575
- ④ Funakoshi K, Kuwabara S, Odaka M, Hirata K, Yuki N, Clinical predictors of mechanical ventilation in Fisher/Guillain-Barré overlap syndrome, *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 査読有, 80巻, 2009, 60-64
- ⑤ 佐藤育子, 佐藤徹雄, 小野雅典, 桶澤圭介, 柿坂庸介, 船越 慶, 萩野谷和裕
筋痛を主訴に非典型的な経過をたどりギラン・バレー症候群亜型と考えられた1例
小児科臨床, 査読有, 62巻, 2009, 115-118
- ⑥ Phongsisay V, Susuki K, Matsuno K, Yamahashi T, Okamoto S, Funakoshi K, Hirata K, Shinoda M, Yuki N, Complement inhibitor prevents disruption of sodium channel clusters in a rabbit model of Guillain-Barré syndrome, *Journal of Neuroimmunology*, 査読有, 205巻, 2008, 101-104
- ⑦ Wada Y, Yanagihara C, Nishimura Y, Funakoshi K, Odaka M, Delirium in two patients with Bickerstaff's brainstem encephalitis, *Journal of the Neurological Sciences*, 査読有, 269巻, 2008, 101-104
- ⑧ 井上博之, 古閑紀雄, 石田春彦, 船越 慶, 丹生健一
蝶形骨洞炎の先行感染が示唆された Fisher 症候群

日本耳鼻咽喉科学会報, 査読有, 111巻, 2008, 628-631

- ⑨ 西田浩, 黒田友基, 脇田賢治, 船越 慶, 小鷹昌明
重症 Guillain-Barré 症候群に対する免疫グロブリン大量静注・ステロイド併用療法の検討
神経内科, 査読有, 69巻, 2008, 95-98

〔学会発表〕(計3件)

- ① Funakoshi K, Ito M, Koike S, Hirata K, Yuki N,
Relationship of anti-glycolipid complex antibodies with clinical phenotypes in anti-GQ1b IgG antibody syndrome, *Peripheral Nerve Society*, 2009.7.6, Würzburg, Germany
- ② 船越 慶, 平田幸一, 結城伸泰, 抗GQ1b抗体症候群における抗糖脂質複合体抗体の陽性率の検討, 第50回日本神経学会総会, 2009.5.20, 仙台
- ③ 船越 慶, 増渕美由紀, 谷中千秋, 平田幸一, 結城伸泰, IgM Mタンパクを伴うニューロパチーにおける新規の標的分子探索, 第49回日本神経学会総会, 2008.5.16, 横浜

〔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

船越 慶 (FUNAKOSHI KEI)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：50406188

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：