

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590632

研究課題名（和文）膠原病診療を変革するニューロパチーの早期診断マーカー同定と至適検査手順の確立

研究課題名（英文）Developing early diagnostic markers of neuropathy with collagen disease and establishment of the clinical examination scheduling process

研究代表者

大林 光念（OBAYASHI KONEN）

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90361899

研究成果の概要（和文）：本研究は、膠原病患者のニューロパチーに関する発症予知因子、早期診断あるいは予後推定のマーカーを探索、同定し、同症診断への検査手順を確立することを目的とした。quantitative sensory testing (QST)、レーザー血流画像検査、ならびに生検皮膚の H. E. 染色標本における膨隆汗腺の有無チェックが、最も早期にこれらの患者における末梢神経障害の発症を確認する方法であることをつきとめた。さらに血清の羅的解析の結果、早期診断マーカーとなりうる可能性を持つ候補蛋白質、ペプチドが多数ピックアップされた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to develop early diagnostic markers of neuropathy with collagen disease and establish the clinical examination scheduling process. Our results suggest that quantitative sensory testing (QST), laser-Doppler flowmetry, and skin biopsy are the most useful methods to diagnose the neuropathy with collagen disease. Moreover, we could pick up many proteins and peptides which have the potential to become early diagnostic markers of the disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：膠原病、シェーグレン症候群、後根神経節炎、自律神経ニューロパチー

1. 研究開始当初の背景

我が国における膠原病およびその近縁疾患の患者数は約 200 万人にのぼるが、これら膠原病患者の QOL を大きく規定する因子の一つにニューロパチーの合併がある。このような膠原病性ニューロパチーの代表的なものとしては、ステロイド療法に反応性の高い、

血管炎に伴う多発性単神経炎が真っ先に挙げられるが、その一方で、例えばシェーグレン症候群に多く認められるような、慢性の経過をたどり、感覚神経が左右対称に遠位部から侵されてくる感覚性ポリニューロパチーを発症する頻度も、膠原病全体の約 40% と高い。本タイプのニューロパチーの主たる病態

は自己免疫学的機序に伴う後根神経節の炎症によるものとされ、その治療にはステロイド療法に加え、免疫グロブリン大量療法 (IVIg) や免疫抑制剤の投与、血漿交換療法なども用いられるが、本病態、あるいはその増悪因子である自律神経ニューロパチーの出現を臨床現場で発症早期に捉えることは極めて難しく、血管炎に伴う多発性単神経炎との混同を含めた診断の遅れによる神経障害の不可逆化が、これらの治療効果を下げ、患者の QOL を低下させている。

2. 研究の目的

本研究は、膠原病に伴う後根神経節炎、自律神経ニューロパチーに関する発症予知因子、早期診断、あるいは予後推定のマーカーを探索、同定するとともに、より早期から定量性をもって本症を検出する、神経生理学的、病理組織学的検査手順を確立することによって、早期からの選択的治療法の提供を実現し、これらの患者の QOL を大きく改善させようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 最適な神経生理学的検査法、病理組織学的検査法の構築

後根神経節炎の出現頻度が最も高い膠原病近縁疾患はシェーグレン症候群である。熊本大学医学部附属病院でフォローしているシェーグレン症候群患者のうち、研究の趣旨を理解し、同意を得ることのできた患者群を対象に、神経生理学的、病理組織学的手法を用い末梢神経の機能、あるいは障害度を評価し、より早期に、かつ定量的に末梢神経障害を確認する神経生理学的検査法、病理組織学的検査法の選択、確立を目指す。検査項目は、神経線維の種類、分布を考慮し、1) 神経伝導検査、2) QST、3) レーザードプラ血流画像検査、4) 心電図 R-R 間隔変動検査、5) サーモグラフィーによる皮膚温検査、6) 微量発汗検査、7) 胃電図検査、および病理組織学的検査の 8 つとする。

(2) シェーグレン症候群に伴うニューロパチーに関するバイオマーカーの探索、同定

神経生理学的検査や病理組織学的検査を行ったシェーグレン症候群患者や、熊本大学医学部附属病院に蓄積された FAP 患者約 40 名、ニューロパチーを認めない筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者 20 名分の脳脊髄液、皮膚や末梢神経の剖検・生検組織、血清などを検体として、プロテオミクス解析の技術を応用した網羅的解析を行うことにより、シェーグレン症候群に伴う後根神経節炎、自律神経ニューロパチーの発症予知因子、早期診断、ならびに予後推定マーカーを探索、同定する。

1) SELDI-TOF MS を用いた網羅的解析

① 健常者の血清を用い、実験条件を検討する。
② 感覚性ポリニューロパチーを伴うシェーグレン症候群患者の脳脊髄液、皮膚生検組織、血清を用い、健常者、感覚性ポリニューロパチーの出現を認めないシェーグレン症候群患者、および感覚性ポリニューロパチーを認める他の膠原病患者の検体から得られたデータと比較することにより、シェーグレン症候群患者に特有の、あるいは感覚性ニューロパチーを伴う膠原病患者に共通のペプチドピークを探索する。

2) 候補ペプチドのアミノ酸配列分析

SELDI-TOF MS でのスクリーニングの際の条件と同一の条件で HPLC を用い、当該のペプチドを精製し、プロテインシーケンサーを用いて候補ペプチドのアミノ酸配列を分析、決定する。

4. 研究成果

様々な神経生理学的、病理組織学的手法を用い、シェーグレン症候群患者の末梢神経機能、あるいは末梢神経の障害度を評価することで最適な神経学的検査法、病理組織学的検査法を構築しようと試みた結果、quantitative sensory testing (QST)、レーザードプラ皮膚血流検査、ならびに生検皮膚の H. E. 染色標本における膨隆汗腺の有無チェックが、最も早期にシェーグレン症候群患者における末梢神経障害の発症を確認する方法であることをつきとめた。さらに、前述の各種検査法で末梢神経障害の早期と判断したシェーグレン症候群患者の血清、あるいは皮膚生検組織を用い、プロテオミクス解析の技術を応用した網羅的解析を行うことで、シェーグレン症候群に伴う後根神経節炎、自律神経ニューロパチーの発症予知因子、早期診断マーカー、あるいは予後推定マーカーの探索を試みた。網羅的解析の結果、発症予知因子、早期診断マーカー、あるいは予後推定マーカーとなりうる可能性を持つ候補蛋白質、ペプチドが多数ピックアップされた。最終的に臨床的に有効と思われるマーカーの確立までには至らなかったが、3 年間本研究を遂行していく過程で、副産物としてシェーグレン症候群以外の自律神経ニューロパチー患者の診断に有用なツールが複数考案された。

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 18 件)

- ① Obayashi K, Ando Y. Focus on autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid 19* (Suppl 1): 28-29, 2012. 査読有

- ② 大林光念. 新しい自律神経機能検査法の構築と臨床応用. 臨床病理 60: 435-442, 2012. 査読無
- ③ Heldestad V, Wiklund U, Hörnsten R, Obayashi K, Suhr OB, Nordh E. Comparison of quantitative sensory testing and heart rate variability in Swedish Val30Met ATTR. Amyloid 18: 183-190, 2011. 査読有
- ④ Obayashi K, Yamashita T, Tasaki M, Ueda M, Shono M, Jono H, Ohshima T, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ando Y. Amyloid neuropathy in a younger domino liver-transplanted recipient. Muscle Nerve 43: 449-450, 2011. 査読有
- ⑤ Obayashi K, Hörnsten R, Wiklund U, Karlsson M, Okamoto S, Ando Y, Suhr OB. Blood pressure overshoot after tilt reversal in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. Hypertens Res 34: 133-138, 2011. 査読有
- ⑥ Obayashi K, Hörnsten R, Wiklund U, Karlsson M, Okamoto S, Ando Y, Suhr OB. Haemodynamic responses after tilt reversal in FAP. Amyloid 18 (Suppl1): 166-168, 2011. 査読有
- ⑦ Obayashi K, Ueda M, Misumi Y, Yamashita T, Jono H, Tasaki M, Shono M, Yazaki M, Kametani F, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ikeda SI, Ando Y. Amyloid turnover after liver transplantation in FAP. Amyloid 18 (Suppl1): 187-189, 2011. 査読有
- ⑧ Okamoto S, Hörnsten R, Obayashi K, Wijayatunga P, Suhr OB. Continuous development of arrhythmia is observed in swedish transplant patients with familial amyloidotic polyneuropathy (amyloidogenic transthyretin Val30Met variant). Liver Transplant 17: 122-128, 2011. 査読有
- ⑨ 大林光念, 安東由喜雄. 各種ニューロパチーの早期診断と重症度ならびに治療効果の判定. 自律神経 48: 328-330, 2011. 査読有
- ⑩ 安東由喜雄, 大林光念, 植田光晴. 内科医が知っておくべき検査の最新情報: 臨床検査の進歩 注目される新しい検査を中心に 神経内科疾患, 日本内科学会雑誌 100: 3276-3283, 2011. 査読無
- ⑪ Anan I, Kiuru-Enari S, Obayashi K, Ranløv PJ, Ando Y. Investigation of AGE, their receptor and NF-kappaB activation and apoptosis in patients with ATTR and Gelsolin amyloidosis. Histol Histopathol 25:691-699, 2010. 査読有
- ⑫ Obayashi K, Ueda M, Yamashita T, Misumi Y, Hirahara T, Tasaki M, Ohshima T, Uchino M, Ando Y. Gastric myoelectrical activities in elderly severe tetanus: Useful marker to increase volume and calorie of nasogastric tube feeding. e-SPEN 5: e261-e264, 2010. 査読有
- ⑬ Olsson M, Norgen N, Obayashi K, Plante-Bordeneuve V, Suhr OB, Cederquist K, Jonasson J. A possible role for miRNA silencing in disease phenotype variation in Swedish transthyretin V30M carriers. BMC Med Genet 11: 130, 2010. 査読有
- ⑭ 大林光念, 安東由喜雄. 近赤外分光法補遺版: 光トポグラフィに関する最新知見. 自律神経 47: 30-31, 2010. 査読有
- ⑮ 大林光念, 安東由喜雄. 糖尿病合併症診断のための生理機能検査. 各論 2. 自律神経機能検査. Medical Technology 38: 346-351, 2010. 査読無
- ⑯ Misumi Y, Ando Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Uchino M. Chain reaction of amyloid fibril formation with induction of basement membrane in familial amyloidotic polyneuropathy. J Pathol 219:481-490, 2009. 査読有
- ⑰ Okamoto S, Wixner J, Obayashi K, Ando Y, Ericzon BG, Friman S, Uchino M, Suhr OB. Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: impact on Swedish patients' survival. Liver Transpl 15:1229-1235, 2009. 査読有
- ⑱ 大林光念, 安東由喜雄. FAPの神経症候と肝移植の効果. 神経内科 70: 348-353, 2009. 査読無
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Obayashi K, Ando Y. Autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, November 20, 2011, Kumamoto, Japan
- ② Obayashi K, Yamashita T, Ueda M, Misumi Y, Ohshima T, Tasaki Masayoshi, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ando Y. Iatrogenic amyloid neuropathy in a younger domino liver-transplanted recipient. VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, November 20-22, 2011, Kumamoto, Japan
- ③ 大林光念. 新しい自律神経機能検査法の構築と臨床応用. 第 58 回日本臨床検査

- 医学会学術集会（学会賞受賞講演）
2011. 11. 18, 岡山市.
- ④ 大林光念、植田光晴、大嶋俊範、山下太郎、三隅洋平、安東由喜雄. 食後高血糖 (IGT) 患者における末梢神経障害、内臓神経障害の出現頻度と治療可逆性. 第52回日本神経学会学術集会、2011. 5. 18、名古屋市
- ⑤ 大林光念、植田光晴、城野博史、田崎雅義、安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチー患者における異型トランスサイレチンに対する自己抗体の探索. 第51回日本臨床化学学会年次学術集会、2011. 8. 26、札幌市
- ⑥ 大林光念、山下太郎、植田光晴、三隅洋平、大嶋俊範、安東由喜雄. A δ 特異的痛覚閾値検査と皮膚血流検査、発汗機能検査を組み合わせた小径線維ニューロパチーの早期診断法. 第64回日本自律神経学会総会. 2011. 10. 25、秋田市
- ⑦ 大林光念、山下太郎、植田光晴、大嶋俊範、安東由喜雄. 若年のドミノ肝移植レシピエントに生じたアミロイドニューロパチー. 第63回日本自律神経学会総会. 2010. 10. 22-23、横浜市
- ⑧ 大林光念. 私はこのように自律神経機能検査を用いている：各種ニューロパチーの早期診断と重症度ならびに治療効果の判定. 第63回日本自律神経学会（教育セミナー）、2010. 10. 22-23、横浜市
- ⑨ Obayashi K, Hörnsten R, Wiklund U, Karlsson M, Okamoto S, Ando Y, Suhr OB. Hemodynamic responses after tilt reversal in FAP. XII International Symposium on Amyloidosis. April 18-21, 2010, Rome, Italy
- ⑩ Obayashi K, Ueda M, Misumi Y, Yamashita T, Jono H, Tasaki M, Shono M, Yazaki M, Kametani F, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ikeda S, Ando Y. Liver transplantation promoted amyloid turnover in FAP. XII International Symposium on Amyloidosis. April 18-21, 2010, Rome, Italy
- ⑪ 大林光念、Rolf Hörnsten、Urban Wiklund、Marcus Karlsson、Ole B Suhr、植田光晴、三隅洋平、山下太郎、安東由喜雄. FAP 患者における起立後再臥床時の血圧オーバーシュート現象. 第51回日本神経学会総会. 2010. 5. 20-22、東京
- ⑫ 大林光念、今村華奈子、植田光晴、庄野信、城野博史、池田勝義、安東由喜雄. IGT 患者における末梢神経障害ならびに内臓神経障害の出現頻度と治療可逆性. 第57回日本臨床検査医学会学術集会、2010. 9. 9-10、東京
- ⑬ 大林光念、安東由喜雄. アミロイド蛋白への治療アプローチ -家族性アミロイドポリニューロパチーをモデルとして-. 第60回日本電気泳動学会（シンポジウム）2009. 9. 13、松本市、
- ⑭ 大林光念、植田光晴、Victoria Heldestad、Urban Wiklund、Rolf Hörnstedt、Ole Suhr、Erik Nordh、安東由喜雄. 心臓自律神経機能と四肢末梢の小径有髄、無髄線維の機能から見た、FAP の発症年齢とニューロパチーの進行パターンとの関係. 第50回日本神経学会総会. 2009. 5. 20、仙台市
- ⑮ 大林光念、植田光晴、三隅洋平、城野博史、安東由喜雄. IGT ニューロパチーの診断と治療可逆性. 第27回日本神経治療学会総会、2009. 6. 11-12、熊本市、
- ⑯ 大林光念、田崎雅義、植田光晴、堀端洋子、城野博史、安東由喜雄. 心拍変動検査、皮膚温度感覚閾値検査から見た FAP の発症年齢とニューロパチーの進行パターンとの関係. 第56回日本臨床検査医学会学術集会、2009. 8. 26-30、札幌市
- ⑰ 大林光念、植田光晴、三隅洋平、山下太郎、安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者における局所皮膚加温による皮膚血流量の変化と四肢末梢に生じる自覚的冷感の出現メカニズムについて. 第62回日本自律神経学会総会、2009. 11. 5-6、和歌山市

〔図書〕（計0件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/amyloidunit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林 光念 (OBAYASHI KONEN)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90361899

(2) 研究分担者

安東 由喜雄 (ANDO YUKIO)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：20253742