

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591256

研究課題名(和文) プロテオミクスとプロテインアレイを用いたアルツハイマー病に関わる自己抗体の検索

研究課題名(英文) Searching for autoantibodies related Alzheimer disease by proteomics and protein array system

研究代表者

犬塚 貴 (Inuzuka, Takashi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50184734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー型認知症の病態機序の解明とバイオマーカーの開発を目的として、プロテオミクス解析の手法を用い、患者血清・髄液中より自己抗体の検出を行った。結果、対照患者と比較してアルツハイマー型認知症患者の血清中に多く存在する自己抗体の認識抗原として、Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoformとMitochondrial import receptor subunit TOM40 homologを同定した。これら2つの蛋白とアルツハイマー型認知症の病態との関連性を示唆する報告があり、今後これら自己抗体の特異性の検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified novel autoantibodies in serum samples from patients with Alzheimer's diseases. To identify these novel antibodies, we employed two-dimensional immunoblotting using human neuroblastoma cells, human brain microvascular endothelial cells, or rat brain homogenate as the antigen source. As a result, we identified autoantibodies against Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform and Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog in sera from patients with Alzheimer's diseases. There are several reports describing that these autoantigens may be associated with Alzheimer's diseases. Further studies are needed to establish whether our identified autoantibodies could be useful biomarkers of Alzheimer's diseases.

研究分野：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー型認知症 抗血管内皮抗体 抗神経抗体 バイオマーカー プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症の病態機序に関しては、アミロイド 蛋白 (A $\beta$ ) の脳内での蓄積が重要であるが、最近の研究では免疫機序の関与があることが分かってきた。A $\beta$  を用いた能動免疫もしくは抗 A $\beta$  抗体の受動免疫により脳内 A $\beta$  凝集体の除去と[1]、末梢の可溶性 A $\beta$  の除去による A $\beta$  凝集体の形成抑制がもたらされるとされ[2]、今後の治療法として期待されている。一方、抗 A $\beta$  抗体はアルツハイマー型認知症患者や健常者の血清と髄液中にも自然抗体として存在することが知られている。アルツハイマー型認知症患者においては、髄液中での抗 A $\beta$  抗体価が健常者と比較して低値であるといった報告もある[3]

抗 A $\beta$  抗体以外にもアルツハイマー型認知症患者における自己抗体の報告はあるが[4]、その多くは特異性・病的意義に関して確立していない。一方、アルツハイマー型認知症におけるヒト免疫グロブリン製剤の有効性も示され[5]、アルツハイマー型認知症の病態を抑制する自然抗体の存在も示唆されている[6]。

また、様々な疾患において自己抗体のバイオマーカーとしての意義は注目されており、アルツハイマー型認知症においてもその例外ではない[7]。A $\beta$  の蓄積はアルツハイマー型認知症の発症 10~20 年前より起こるとされており、脳内における炎症も同様に発症前に起こることが推測される。よって、アルツハイマー型認知症における自己抗体の研究が、同疾患の発症前診断マーカーの開発につながる可能性も考慮される。

### 2. 研究の目的

アルツハイマー型認知症の病態機序の解明とバイオマーカーの開発を目的として、本研究では、炎症機序の関与、特に自己抗体に着目し、患者血清・髄液中より新たに抗神経抗体および抗血管内皮抗体を検出し、その認識抗原蛋白の同定と自己抗体の特異性を検討した。

### 3. 研究の方法

ヒト神経芽細胞腫由来細胞、ヒト大脳微小血管内皮細胞といった培養細胞およびラット大脳ホモジネートを抗原とした二次元免疫プロット法を用い、アルツハイマー型認知症患者の血清・髄液中より新規に、抗神経抗体と抗血管内皮抗体を検出した。その後、検出したこれら自己抗体の認識抗原蛋白を LC-MS/MS もしくは MALDI-TOF/MS を用いた質量分析により同定した。

### 4. 研究成果

ラット大脳ホモジネートを抗原とした二次元免疫プロット法と質量分析の手法を用い、血清中の抗神経抗体の検索を行った。10 名のアルツハイマー型認知症患者の混合血

清と 10 名の健常対照者の混合血清を用い、健常者の混合血清中には存在せず、アルツハイマー型認知症患者の混合血清中のみに存在する抗神経抗体の認識抗原蛋白の同定を行った。その結果、アルツハイマー型認知症患者の混合血清中のみに存在する抗神経抗体が反応する 6 つの抗原スポットを検出し、このうちの 1 つは、Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform (PITPNA) であった。PITPNA は Phospholipid transfer protein (PLTP) の 1 つであり phosphatidylinositol もしくは phosphatidylcholine を小胞体やゴルジ装置から細胞膜へと輸送する蛋白であることが知られている。アルツハイマー型認知症との関連ではアルツハイマー型認知症患者の脳内では、非アルツハイマー型認知症患者と比較し、有意に PLTP の産生が亢進しているといった報告がある[8]。その一方アルツハイマー型認知症患者の髄液中では、その他の神経疾患患者と比較し有意に PLTP 活性の低下がみられるといった報告がある[9]。抗 PITPNA 抗体が、アルツハイマー型認知症の新たな血清バイオマーカーとなる可能性もあり、現在さらなる特異性の検討のため、リコンビナント蛋白を用いた二次元免疫プロット法を用いた検討を行っている。

続いて、ヒト神経芽細胞腫由来細胞を抗原とした二次元免疫プロット法を用い、20 例のアルツハイマー型認知症患者の髄液中に存在する抗神経抗体を検出した。二次元プロット後のメンブレン上に合計 135 個の抗体反応スポットを確認した。このうちの 25%以上のアルツハイマー型認知症患者で陽性となった抗体反応スポットは合計 13 個あり、質量分析の結果、13 個の内の 10 個のスポットから 7 種類の認識抗原蛋白を同定した。抗原蛋白名は、Heat shock 105kDa/110kDa protein 1, isoform CRA\_ B ; 78 kDa glucose-regulated protein; Heat shock cognate 71 kDa protein; Tubulin beta chain; Vimentin; 60 kDa heat shock protein; T-complex protein 1 subunit epsilon であった。一方、多発性硬化症 20 例、無菌性髄膜炎 20 例、身体表現性障害 17 例の合計 57 例の対照患者の髄液を用い、同じ条件下で二次元免疫プロットを行った。その結果、これら 7 種類の抗原蛋白を認識する自己抗体は、対照患者群においても存在し、アルツハイマー型認知症患者群との比較で、その陽性率に有意差はみられなかった。特に T-complex protein 1 subunit epsilon を除く 6 種類の抗原蛋白に関しては、分子シャペロンや細胞骨格蛋白であるが、これらに対する自己抗体は、それぞれの対照患者群においても 25%以上の患者で陽性となり、ヒトの髄液中において、特別の抗原刺激がない環境下においても存在する自然抗体と考えられた。従来報告では、血清中の自然抗体は、アポトーシスに至った細胞のクリアランスにか

かわるなど組織のホメオスタシスの維持に重要な役割を担っていると報告されている[10]。髄液中に存在する自然抗体の認識抗原を網羅的に調べた報告はなく、今回同定した自然抗体が神経組織に対し保護的に働き、ホメオスタシスの維持に重要な役割を担っている可能性もあり、これらの抗体が神経組織に及ぼす影響に関する今後の更なる検討が重要と考えられた。

抗血管内皮抗体に関しては、ヒト大脳微小血管内皮細胞を抗原とした二次元免疫ブロット法と質量分析を用いて、アルツハイマー型認知症患者 24 例と 54 例の対照患者(60 歳以上の神経疾患非合併患者 19 例、40 歳未満の神経疾患非合併患者 18 例、多発性硬化症患者 17 例)の血清中に存在する抗血管内皮抗体の検索を行った。その結果、アルツハイマー型認知症患者に比較的多く存在する 5 つの自己抗体を同定した。これら自己抗体の認識抗原蛋白とアルツハイマー型認知症患者における陽性率は Vimentin (75%), Protein disulfide-isomerase A3 (45%), Alpha enolase (80%), Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog (Tom40) (42%), Annexin A2 (65%)であった。5 つの自己抗体の中、抗 Tom40 抗体のみがアルツハイマー型認知症患者において、対照患者と比較し有意に抗体陽性率が高値であった。次に抗 Tom40 抗体陽性のアルツハイマー型認知症患者と抗体陰性のアルツハイマー型認知症患者の認知機能を Mini-Mental Scale Examination を用いて評価し、比較検討した結果、抗 Tom40 抗体陽性のアルツハイマー型認知症患者は抗体陰性のアルツハイマー型認知症患者と比較し有意に MMSE の点数が低い結果となった。Tom40 はミトコンドリア外膜に存在し、ミトコンドリア内への蛋白の選択輸送に関与するチャンネルを形成していることが知られている。最近のゲノムワイド関連解析の結果、Tom40 をコードする遺伝子 TOMM40 のリスクアリルはコントロールと比較し晩期発症型アルツハイマー型認知症の発症が 2 倍になるといった報告[11]や TOMM40 のイントロン変異を持つ患者は、発症が約 7 年早くなるといった報告もある[12]。アルツハイマー型認知症における抗 Tom40 抗体の病的意義に関し現在検討中である。

#### 引用文献)

- [1] Bard F, et al. Nat Med. 6, 916-919, 2000
- [2] DeMattos RB, et al. PNAS. 98, 8850-8855, 2001
- [3] Du Y, et al. Neurology. 57, 801-805, 2001
- [4] Colasanti T, et al. Autoimmun Rev. 9, 807-811, 2010.
- [5] Dodel RC, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004
- [6] Britschgi M, et al. PNAS. 106, 12145-12150, 2009

- [7] Reddy MM, et al. Cell. 144, 132-142, 2011
- [8] Vuletic S, et al. J Lipid Res. 44, 1113-1123, 2003.
- [9] Vuletic S, et al. J Neurosci Res. 80, 406-13, 2005.
- [10] Lutz HU, et al. J Autoimmun. 29, 287-294, 2007.
- [11] Hong MG, et al. J Hum Genet. 55, 707-709, 2010.
- [12] Roses AD, et al. Pharmacogenomics J. 10, 375-384, 2010.

#### 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. Kimura A, Yoshikura N, Inuzuka T (他 5 名 8 番目): Identification of Target Antigens of Naturally Occurring Autoantibodies in Cerebrospinal Fluid. J Proteomics. 査読有, 2015 in press.
2. Kimura A, Sakurai T, Inuzuka T (他 6 名 9 番目): Identification of Target Antigens of Antiendothelial Cell Antibodies Against Human Brain Microvascular Endothelial Cells in Healthy Subjects. Curr Neurovasc Res. 査読有, 12, 25-30, 2015
3. Kimura A, Yoshikura N, Inuzuka T (他 2 名 5 番目): B-cell-activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) levels in cerebrospinal fluid of patients with meningoencephalitis. J Neurol Sci. 査読有, 352, 79-83, 2015
4. Kimura A, Sakurai T, Inuzuka T (他 5 名、8 番目): Corticosteroid therapy in a patient with cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. J Neuroinflammation. 査読有, 10, 39, 2013
5. Tanaka Y, Kato T, Inuzuka T (他 11 名、14 番目): Is there a difference in gastric emptying between myotonic dystrophy type 1 patients with and without gastrointestinal symptoms? J Neurol. 査読有, 260, 1611-1616, 2013
6. Kimura A, Sakurai T, Inuzuka T (他 7 名、10 番目): Elevated anti-heat shock protein 60 antibody titer is related to white matter hyperintensities. J Stroke Cerebrovasc Dis. 査読有, 21, 305-309, 2012
7. Kimura A, Sakurai T, Inuzuka T (他 9 名、12 番目): Anti-Endothelial Cell Antibodies in Patients with Cerebral Small Vessel Disease. Curr Neurovasc

- Res. 査読有, 9, 296-301, 2012
8. Kimura A, Sakurai T, Inuzuka T (他 9 名、12 番目): Antibodies Against the Tom40 Subunit of the Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane Complex and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 査読有, 29, 373-377, 2012
  9. Yamaguchi Y, Hayashi A, Inuzuka T (他 3 名、5 番目) L-MPZ, a novel isoform of myelin P0, is produced by stop codon readthrough. J Biol Chem. 査読有, 287, 17765-17776, 2012
  10. Tanaka Y, Yoshikura N, Inuzuka T (他 7 名、10 番目) Late-onset patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Japan have a higher progression rate of ALSFRS-R at the time of diagnosis. Intern Med. 査読有, 51, 579-584, 2012
  11. Hayashi Y, Yoshikura N, Inuzuka T (他 1 名、4 番目) Peduncular hallucinations in brainstem encephalitis drawn by a patient. Neurology. 査読有, 79, 1625, 2012
  12. Tanaka Y, Kato T, Inuzuka T (他 11 名、14 番目): Is there delayed gastric emptying in patients with multiple system atrophy? An analysis using the (13) C-acetate breath test. J Neurol. 査読有, 259, 1448-1452, 2012

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 (2014/9/5、金沢歌劇座(石川・金沢)) 自己免疫性神経疾患における抗神経抗体・抗血管内皮抗体に関する検討 木村暁夫、櫻井岳朗、吉倉延亮、原田斉子、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
2. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 (2014/9/5、金沢歌劇座(石川・金沢)) 膀胱癌合併傍腫瘍性小脳失調症患者における抗神経抗体の検討 香村彰宏、木村暁夫、吉倉延亮、林 祐一、犬塚 貴
3. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 (2014/9/5、金沢歌劇座(石川・金沢)) 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症における臨床および髄液所見の検討 吉倉延亮、木村暁夫、竹腰 顕、瀬川 一、原田斉子、山田 恵、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
4. 第 55 回日本神経学会学術大会 (2014/5/24、福岡国際会議場(福岡・福岡)) 多発性硬化症患者における髄液中抗神経抗体の検討 木村暁夫、吉倉延亮、原田斉子、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
5. 第 55 回日本神経学会学術大会 (2014/5/21、福岡国際会議場(福岡・福岡)) アルツハイマー型認知症における microbleed と臨床所見との関連性の検討 吉倉延亮、木村暁夫、安西将大、竹腰 顕、原田斉子、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
6. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 (2013/11/27、海峡メッセ(山口・下関)) 免疫介在性ニューロパチーにおける血清 BAFF 値と臨床所見との関連性の検討 木村暁夫、吉倉延亮、原田斉子、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
7. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 (2013/11/27、海峡メッセ(山口・下関)) 亜急性小脳失調症における新規抗神経抗体の同定 香村彰宏、木村暁夫、吉倉延亮、原田斉子、林 祐一、犬塚 貴
8. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 (2013/11/27、海峡メッセ(山口・下関)) 自己抗体関連脳炎における髄液中 BAFF, APRIL 値の検討 吉倉延亮、木村暁夫、香村彰宏、原田斉子、林 祐一、犬塚 貴
9. 第 134 回日本神経学会東海北陸地方会 (2013/10/20、石川県地場産業振興センター(石川・金沢)) 急性の認知機能低下を主訴とし肺小細胞癌を合併した抗 ANPA 受容体抗体陽性辺縁系脳炎の 1 例 原田斉子、林 祐一、吉倉延亮、香村彰宏、木村暁夫、犬塚 貴
10. 第 134 回日本神経学会東海北陸地方会 (2013/10/20、石川県地場産業振興センター(石川・金沢)) 辺縁系脳炎、急性運動感覚性ニューロパチーを呈した抗 Hu 抗体陽性傍腫瘍症候群の 1 例 櫻井岳朗、脇田賢治、西田 浩、木村暁夫、犬塚 貴
11. 第 18 回日本神経感染症学会総会 (2013/10/11、シーガイアコンベンションセンター(宮崎・宮崎)) ACTH 単独欠損症に生じたインフルエンザ脳症の 2 例 瀬川 一、林 祐一、吉倉延亮、櫻井岳朗、原田斉子、香村彰宏、木村暁夫、牛越博昭、諏訪哲也、犬塚 貴
12. 第 133 回日本神経学会東海北陸地方会 (2013/7/7、名古屋国際会議場(愛知・名古屋)) リツキシマブ投与にて症状改善を得た、治療抵抗性の Stiff-person 症候群の 1 例 吉倉延亮、林 祐一、原田斉子、香村彰宏、木村暁夫、犬塚 貴
13. 第 54 回日本神経学会学術大会 (2013/5/31、東京国際フォーラム(東京・東京)) 亜急性小脳失調症における新規抗神経抗体の同定 香村彰宏、木村暁夫、原田斉子、吉倉延亮、林 祐一、犬塚 貴
14. 第 54 回日本神経学会学術大会 (2013/5/29、東京国際フォーラム(東京・東京)) CAA 関連炎症・血管炎に対する

- ステロイド治療と髄液マーカーの検索。  
木村暁夫、吉倉延亮、原田斉子、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
15. 第 54 回日本神経学会学術大会  
(2013/5/29、東京国際フォーラム(東京・東京)) 自己免疫性中枢性神経疾患患者における血清 BAFF, APRIL 値の検討。  
吉倉延亮、香村彰宏、木村暁夫、原田斉子、林 祐一、犬塚 貴
16. The 65<sup>th</sup> Annual Meeting of American Academy of Neurology (2013/3/18, San Diego, (USA)) Pure motor chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.  
Kimura A, Koumura A, Sakurai T, Hayashi Y, Inuzuka T.
17. 第 132 回日本神経学会東海北陸地方会  
(2013/3/3、名古屋国際会議場(愛知・名古屋)) 痙攣重積で発症した若年男性の腫瘍非合併抗 NMDA 受容体抗体陽性脳炎の 1 例  
櫻井岳朗、林 祐一、武田明子、原田斉子、吉倉延亮、香村彰宏、木村暁夫、犬塚 貴
18. 第 30 回日本神経治療学会総会  
(2012/11/30、北九州国際会議場(福岡・北九州)) 単純血漿交換療法およびIVIg 療法が有効であった抗 mGluR1 抗体陽性亜急性小脳失調症の 1 例  
原田斉子、林 祐一、吉倉延亮、香村彰宏、木村暁夫、犬塚 貴
19. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会  
(2012/9/20-21、軽井沢プリンスホテル(長野・軽井沢)) A 関連血管炎患者における血清・髄液中 A 抗体の検討  
木村暁夫、櫻井岳朗、吉倉延亮、原田斉子、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
20. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会  
(2012/9/15、京王プラザホテル(東京・東京)) 多発性筋炎患者における抗 MYBPC2 抗体および抗 PK M1/M2 抗体の同定と特異性の検討  
木村暁夫、櫻井岳朗、吉倉延亮、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、大瀧博文、帖佐光洋、犬塚 貴
21. 第 53 回日本神経学会学術大会  
(2012/5/24、東京国際フォーラム(東京・東京)) 自己免疫介在性脳炎・脳症における新規自己抗体の同定  
木村暁夫、櫻井岳朗、吉倉延亮、原田斉子、香村彰宏、林 祐一、犬塚 貴
22. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of American Academy of Neurology (2012/4/25, New Orleans, (USA)) Anti-endothelial cell antibodies in patients with Alzheimer disease.  
Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Otaki H, Chousa M, Inuzuka T.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬塚 貴 (INUZUKA, Takashi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50184734

(2) 研究分担者

木村 暁夫 (KIMURA, Akio)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00362161

(2) 研究分担者

矢野 竹男 (YANO, Takeo)

三重大学・地域イノベーション学研究所・教授

研究者番号: 00569197