

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860699

研究課題名(和文) プロテオーム解析を用いた慢性炎症性脱髄性多発神経炎の新規標的抗原の網羅的解析

研究課題名(英文) Searching for the immune target molecules in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy by proteomic analysis.

研究代表者

別府 美奈子 (BEPPU, MINAKO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70623669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は自己免疫性ニューロパチーとされるが、標的抗原は不明であり、確立した診断マーカーもないため診断が遅れ難治化する症例も多いことが大きな臨床的問題点である。当研究ではCIDP患者血清中の自己抗体の標的分子をプロテオーム解析法を用いて網羅的に探索した。CIDPは複数の病態を含む症候群で、臨床的・電気生理学的にサブグループに分けられる。それぞれのサブグループにわけてepitope探索を行い、複数の抗原候補蛋白質を同定した。この成果をもとに病態を明らかにすることで、病態に応じた至適治療が確立され、CIDPの治療法の選択・予後改善に貢献をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) is classified into several clinical subtypes such as "typical" and "atypical" CIDP, and the pathogenetic mechanisms are presumably different among the subtypes. Several CIDP-specific autoantibodies have been reported, whereas they are detected only in a small population of CIDP patients. The aim of this study was to identify novel immunological target molecules of CIDP using an unbiased proteomics-based screening approach. In this study, We identified several candidate proteins. Further examination of the role of these proteins in the pathogenesis of CIDP is required.

研究分野：神経内科学

キーワード：慢性炎症性脱髄性多発神経炎 プロテオーム解析 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性炎症性脱髄性多発神経炎の診断・治療における本研究の意義

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は自己免疫機序により末梢神経に脱髄を生じ、筋力低下や感覚障害をきたす疾患である。慢性進行型、再発・寛解型の経過が特徴であり、筋萎縮や重度身体機能障害に陥ること少なくない。CIDPの予後は良好であるとはいえず、診断マーカーや新規治療法の開発が必須であり、病態機序の解明は急務である。CIDPは血漿交換療法が有効であり、神経生検において有髄神経線維に抗体や補体の沈着が見られることから、液性免疫の関与が示唆されてきた。その標的抗原として P0 蛋白質などのミエリン蛋白質を候補として研究が行われてきたが標的分子は全く不明である。患者血清中 IgG とミエリン化していないシュワン細胞に免疫反応が見られたという報告もあり(Kwa *et al. Brain* 2003)、自己抗体の標的抗原はミエリン蛋白質そのものではなく、シュワン細胞の細胞外表面の蛋白質やミエリン蛋白質と軸索の interaction にある可能性も指摘される。

CIDP は臨床経過や治療の反応や予後は症例により様々であることから、複数の異なった病態を含む症候群であると考えられている。近年、EFNS / PNS (2005) European Federation of Neurological Societies / Peripheral Nerve Society による CIDP 診断基準が設定され、典型的 CIDP と非典型的 CIDP に分類することが提唱されている。CIDP を厳密にサブグループに分けて研究することは新たなアプローチであり、病態機序の解明につながることを期待される。CIDP の各サブグループにおいて、標的抗原が異なることが予想される。

(2)現在の自己抗体の標的抗原探索法とその問題点

これまで標的抗原の検索法として cDNA ライブラリーを用いた SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) やプロテオーム解析技術を用いた手法が行われてきた。SEREX は細胞株などから調整された cDNA フェージライブラリーを大腸菌で発現させ、患者血清中の IgG が認識する抗原をスクリーニングする方法である。同定された抗原をコードする遺伝子が既に cDNA という形でフェージにクローニングされているため、その塩基配列を調べるだけで遺伝子の同定が可能である。しかし、抗原蛋白質を全長として発現させていないこと、糖鎖付加などの翻訳後修飾がヒトのものとは異なることが問題点である。一方、プロテオーム解析技術を用いた手法は、細胞株や組織などから抽出した蛋白質を SDS-PAGE や 2 次元電気泳動で展開・分離し、患者血清中の IgG が認識する抗原を質量分析計で同定する方法である。このプロテオーム解析を用いた手法は、SEREX の 2 つの問題点を解決できるが、血清に反応するバンドが多数検出され膜蛋白質のみでなく関連する細胞内成分が多く検出されることが問題であった。そこで、従来のゲルを用いたプロテオーム解析の問題点を解決する手法として免疫沈降法を用いた第 3 の手法が報告されている (Vincent. *Mol cell proteomics* 2009)。この手法は培養細胞そのものに血清を反応させてから、抗体ビーズを用いて免疫沈降法を行い、患者血清 IgG と反応して得られた抗原蛋白質をショットガン法により解析するものである。この手法は、細胞膜蛋白質を標的抗原とした。

2. 研究の目的

当研究では、CIDP 患者血清中の自己抗体の標的分子をプロテオーム解析法を用いて網羅的に探索し、疾患の病態に關与する新規 epitope を明らかにし、CIDP のバイオマーカーを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 電気泳動による手法

ブタ馬尾から抽出した蛋白質を 2 次元電気泳動で展開・分離し、PVDF 膜に転写後、患者血清中 IgG を一次抗体としたウェスタンブロットを行う。患者血清と反応した部位に対応するゲル上のスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化でゲルから蛋白質を抽出し、質量分析計で蛋白質を同定する。

(2) ショットガン解析を用いた手法

免疫沈降法を組み合わせた手法で、シュワノーマ細胞株に血清を反応させてから、抗体ビーズを用いて免疫沈降法を行い、患者血清 IgG と反応して得られた抗原蛋白質をショットガン解析する。

4. 研究成果

(1) 電気泳動による手法

ブタ馬尾より抽出した蛋白質を抗原として解析した。その結果、患者血清と反応し正常対照では反応がない、14 個のスポットから蛋白質を同定した。抗体標的分子は細胞外表面に存在すると予想されることから、14 個の候補蛋白質のうち、細胞膜に局在するという条件から、1 つの候補蛋白質が絞り込まれた。合成蛋白質を用いたウェスタンブロットでは、典型的 CIDP 症例でのみ自己抗体が検出されている。この蛋白質は細胞接着に関わる分子であり、脱髄の病態機序に関わる可能性がある。

(2) ショットガン解析を用いた手法

CIDP 3 症例で行い、血清中抗体と反応する蛋白質を 950 個（うち膜蛋白質 120 個）同定した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Beppu M, Sawai S, Misawa S, Sogawa K, Mori M, Ishige M, Satoh M, Nomura F,

Kuwabara S. Serum cytokine and chemokine profiles in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol.* 2015;279:7-10

doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.12.017.

(査読有)

Kuwabara S, Iose S, Mori M, Mitsuma S, Sawai S, Beppu M, Sekiguchi Y, Misawa S. Different electrophysiological profiles and treatment response in “typical “ and “atypical” chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014 Nov 25. pii: jnnp-2014-308452. doi:

10.1136/jnnp-2014-308452. (査読有)

Iose S, Misawa S, Sonoo M, Shimuzu T, Oishi C, Shibuya K, Nasu S, Sekiguchi Y, Mitsuma S, Beppu M, Omori S, Komori T, Kokubun N, Inaba A, Hirashima F, Kuwabara S; the Tokyo Metropolitan Neuromuscular Electrodiagnosis Study Group. Duration of the Distal Compound Muscle Action Potential for Diagnosis of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Effects of Low-Cut Filters. *J Clin Neurophysiol.* 2014 Oct;31(5):441-3.

doi:10.1097/WNP.000000000000045.

(査読有)

Shimizu F, Sawai S, Sano Y, Beppu M, Misawa S, Nishihara H, Koga M, Kuwabara S, Kanda T. Severity and patterns of blood-nerve barrier breakdown in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: correlations with clinical subtypes. *PLoS*

One. 2014 Aug 8;9(8):e104205. doi:
10.1371/journal.pone.0104205.

(査読有)

Sawai S, Satoh M, Mori M, Misawa S,
Sogawa K, Kazami T, Ishibashi M, Beppu
M, Shibuya K, Ishige T, Sekiguchi Y, Noda
K, Sato K, Matsushita K, Koderu Y,
Nomura F, Kuwabara S. Moesin is a
possible target molecule for
cytomegalovirus-related Guillain-Barré
syndrome. Neurology. 2014 Jul
8;83(2):113-7. doi:
10.1212/WNL.0000000000000566.

(査読有)

Nasu S, Misawa S, Nakaseko C, Shibuya
K, Iose S, Sekiguchi Y, Mitsuma S,
Ohmori S, Iwai Y, Beppu M, Shimizu N,
Ohwada C, Takeda Y, Fujimaki Y,
Kuwabara S. Bortezomib-induced
neuropathy: axonal membrane
depolarization precedes development of
neuropathy. Clin Neurophysiol. 2014
Feb;125(2):381-7. doi:
10.1016/j.clinph.2013.07.014.

(査読有)

[学会発表] (計 1 件)

Beppu M, Sawai S, Misawa S, Sogawa K,
Ishige T, Satoh M, Mori M, Nomura F,
Kuwabara S.
Serum cytokine profiles of chronic
inflammatory demyelinating
polyneuropathy. World congress of
neurology 23rd September 2013. Vienna,
Austria

6 . 研究組織

(1)研究代表者

別府 美奈子 (Beppu, Minako)

千葉大学・大学院医学研究院・助教