

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461290

研究課題名(和文) 脳小血管病に関わる抗血管内皮抗体の同定と機能解析：病態解明とバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Anti-endothelial cell autoantibodies associated with cerebral small vessel disease

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大脳微小血管内皮細胞を抗原とする二次元免疫ブロット法および免疫沈降法を用い、脳小血管病変を合併する神経疾患患者の血清および髄液中より抗血管内皮抗体を検出し、その認識抗原を質量分析を用い同定した。その後、同定した抗血管内皮抗体の抗体価と脳小血管病変の重症度との関連性を検討した。高度脳小血管病変を合併した患者血清より、ミトコンドリア外膜に発現し、エネルギー産生やアポトーシスの調整に関与するHexokinase 1 に対する自己抗体を同定した。また血清抗Annexin A2抗体価と髄液抗Amyloid 抗体価が、アルツハイマー型認知症における大脳白質病変の重症度と相関することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We detected the anti-endothelial cell autoantibodies in sera and cerebrospinal fluid (CSF) from patients with neurological diseases by 2-dimensional immunoblotting or immunoprecipitation using primary cultured human brain microvascular endothelial cells as the antigen source. Subsequently, we analyzed the target antigens of these autoantibodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. We also analyzed the association between the titer of identified anti-endothelial cell autoantibodies and the severity of cerebral small vessel disease. We detected the autoantibody against hexokinase 1, which is a mitochondrial outer membrane protein and play a role for regulation of energy production and apoptosis, in sera from the patient with severe small vessel disease. We also found that the serum anti-Annexin A2 autoantibodies and CSF anti-amyloid autoantibodies are associated with the severity of cerebral small vessel disease in patients with Alzheimer's disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗血管内皮抗体 脳小血管病変 Annexin A2 Amyloid Hexokinase 1

1. 研究開始当初の背景

脳小血管病は、脳小血管の比較的均一な病理変化を背景とする大脳白質病変、ラクナ梗塞、脳出血を包括する病態を総称するものである。脳小血管病は、認知機能障害、歩行障害などの運動機能障害、脳梗塞の再発に関連するといわれ、その予防は、健康寿命の延伸につながる極めて重要な病態である。脳小血管病の病態機序は多様であり、未だ不明な点が多く、確立した治療法もない。Pantoni は脳小血管病を 6 型に分類し(Pantoni L. Lancet Neurol 2010; 9: 689-701.)、そのうち、炎症もしくは自己免疫機序が関与する病態を 4 型としている。その一方、4 型に限らず脳小血管病全般において炎症機序の関与を指摘する報告もある(van Dijk EJ, et al., Circulation 2005 ; 112 : 900-905.)。また、自己抗体と脳小血管病との関連を指摘した報告もある(Rouhl RP, et al., Stroke 2010 ; 41 : 2687-2689.)。本研究でも、自己抗体、特に大脳微小血管内皮細胞を標的とする自己抗体である抗血管内皮抗体に着目し、脳小血管病との関連性に焦点をあて研究を行った。

2. 研究の目的

脳小血管病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、大脳微小血管内皮細胞を標的とする抗血管内皮抗体を検出し、その認識抗原蛋白の同定を行った。その後、同定した抗血管内皮細胞抗体と脳小血管病態との関連性を検討した。

3. 研究の方法

[1] 脳小血管病患者を含む対象患者の臨床データ収集・検体採取

当科もの忘れ外来を受診した高齢者、約 200 名を対象とした。全ての患者は、病歴や合併症の聴取、神経診察、神経心理学的評価(MMSE, HDS-R, FAB, CDR)、頭部 MRI 画像検査(T1・T2・FLAIR・T2*画像、VSRAD 解析)、脳血流シンチ検査、血液検査を行い、同意が得られた患者では髄液検査(Aβ42、リン酸化タウ蛋白の測定を含む)を施行した。

[2] 脳小血管病変の評価

上記対象患者の MRI 画像をもとに、脳小血管病の有無を判定した。Fazekas rating scale (Fazekas F, et al. AJR Am J Roentgenol 1986; 149:351-356.)を用い半定量的に評価した大脳白質病変と、ラクナ梗塞および T2*画像で検出される微小出血の有無により、その重症度を評価した。画像データの評価は 2 人の神経内科専門医が別々に行い、その後、一致した値をデータとして用いた。

[3] 抗血管内皮抗体のスクリーニング

上記対象患者のうち、脳小血管病患者の血清を用い、抗血管内皮抗体をスクリーニングした。スクリーニング方法としてヒト大脳微小血管内皮細胞を用いた免疫染色を行い、特に強く染色された患者血清を用いて、抗血管内皮抗体の同定を試みた。

[4] 脳小血管病患者からの新規抗血管内皮抗

体の同定

[3] のスクリーニング検査にて、特異的な抗血管内皮抗体の存在が示唆された。脳小血管病患者の血清を用い、新規抗血管内皮抗体の同定を行った。抗体の検出は、スクリーニングで用いたものと同じヒト大脳微小血管内皮細胞を抗原とした免疫沈降法と、二次元免疫プロット法で行った。その後、目的とする抗体反応スポットをゲル内より切り出し、トリプシン消化後、LC-TOF/MS を用いて抗体の認識抗原蛋白の同定を行った。

[5] 同定した抗血管内皮抗体の疾患特異性の検討

疾患特異性を検討するため、同定した抗血管内皮抗体のスクリーニングのための ELISA プレートを作成した。作成した ELISA プレートを使用し、多数の対象患者の血清を用い同定した抗血管内皮抗体の抗体価を測定し、頭部 MRI 画像所見との関連性を検討した。

4. 研究成果

[1] 免疫沈降法と質量分析を用いた抗血管内皮抗体の同定

免疫沈降法と質量分析の手法を用いて、高度の脳小血管病態を伴うアルツハイマー型認知症患者の血清中より、新たに抗血管内皮抗体を検出した。その後、これらの抗体の認識抗原蛋白のひとつとして Hexokinase-1 (HK1)、を同定した。HK1 は、ミトコンドリア外膜に発現している解糖系酵素の 1 つであり Hexokinase は、グルコースと結合しグルコース 6 リン酸を生産し、細胞のエネルギー産生やアポトーシスの調整に不可欠な酵素である。あらゆる細胞のミトコンドリア外膜に発現しているが、type1 である HK1 は脳内に多く存在し、brain form hexokinase とも呼ばれている。疾患との関連では、常染色体劣勢遺伝形式を呈する遺伝性運動性感覚性ニューロパチー患者の一部で HK-1 の遺伝子異常を有することが確認されている(Hantke J, et al. Eur J Hum Genet. 2009; 17: 1606-14.)。現時点において HK-1 に対する自己抗体の産生機序および特異性に関しては、不明であり、今後の検討課題と考えられた。

[2] 二次元免疫プロット法を用いた抗血管内皮抗体の同定

二次元免疫プロット法により、高度の脳小血管病変を伴うアルツハイマー型認知症患者の血清中より、新たに抗血管内皮抗体の検出をこころみた。しかしこれらの患者から、健常者とは異なる新たな抗体反応スポットは確認できなかった。そこで 30 名の健常者の血清を用いて行った抗血管内皮抗体の反応スポットのデータをもとに、この中の 25%以上の血清で反応がみられた抗血管内皮抗体の反応スポットに該当する抗原蛋白の同定を行った。結果、7 個の抗原蛋白 78kDa glucose-regulated protein (GRP-78), dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP-L), vimentin, perilipin-3, alpha enolase, Annexin A2 を新たに同定し報告した(Kimura A, et al. Curr Neurovasc Res. 2015; 12: 25-30)。これ

らの抗原蛋白に対する自己抗体は、いわゆる Naturally occurring antibody と呼ばれる。健常者を含めたあらゆるヒトの体内において明らかな抗原感作を受けていないにも関わらず、常に一定量産生され存在する低親和性のポリクローナル抗体と思われ、生体内における詳細な役割は明らかにされていない。次にこれらの抗体と脳小血管病態との関連性を検討した。それぞれのリコンビナント蛋白を抗原とする ELISA プレートを作成し、対象患者の血清を用いて、抗体価の測定を行った。さらに抗体価と頭部 MRI 画像における脳小血管病変との関連性を検討した。その結果、アルツハイマー型認知症患者の血清抗 Annexin A2 抗体価が、大脳白質病変の重症度と相関性があることを見出した。アルツハイマー型認知症患者と健常者間において、抗 Annexin A2 抗体価に有意差はみられなかったが、アルツハイマー型認知症患者のみで行った、頭部 MRI 画像所見との関連性の検討では、抗 Annexin A2 抗体価は Fazekas rating scale の periventricular hyperintensity (PVH) ($R=0.326$, $P=0.043$) および deep and subcortical white matter hyperintensity (DSWMH) ($R=0.336$, $P=0.036$) の各スコアと正の相関関係を示した。一方、ラクナ梗塞の有無で抗体価に差はみられなかった。

Annexin A2 は血管内皮細胞膜表面に発現し、tPA とプラスミノゲンと結合しプラスミンの生成に関与することにより線溶系を促進することが知られている (Madureira PA, et al. Blood 2011; 118: 4789-97.)。Annexin A2 欠損マウスでは、血管内皮細胞表面の tPA によるプラスミン生成が阻害されるため、傷害血管における血栓消退が遅延する他、血管新生も抑制されるとする報告もある (Ling Q, et al. J Clin Invest 2004; 113: 38-48)。一方、抗 Annexin A2 抗体は抗リン脂質抗体症候群 (Cesarman-Maus G, et al. Blood 2006; 107: 4375-82.) や脳静脈血栓症で検出され (Cesarman-Maus G, et al. Stroke. 2011; 42: 501-3.)、病態との関連性が示唆されている。アルツハイマー型認知症患者における抗 Annexin A2 抗体は線溶系抑制、血管新生の抑制を介し、大脳白質病変の進展に関与している可能性が推測された。

[3]アルツハイマー型認知症の脳小血管病変と抗アミロイド β 抗体との関連性の検討

先行研究において、広範な大脳白質病変や多発する皮質微小出血を合併し、病理学的に脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の診断に至った患者の髄液において、抗アミロイド β ($A\beta$) 抗体の上昇を認めたことから、我々は、約 9 割の患者にアミロイドアンギオパチーを合併することが報告されている (Jellinger KA, J Neural Transm 2002; 109: 813-36.) アルツハイマー型認知症においても、大脳白質病変や皮質微小出血などの小血管病変の病態機序の背景に、脳アミロイドアンギオパチー関連炎症と同様の抗 $A\beta$ 抗体の関与があるのではないかと推測した。そこで 70 名の髄液 A₄₂ の低下を確認しえたアルツハイマー型認知症患者の血清・髄液の抗 $A\beta$ 抗

体価を ELISA 法により測定し、脳 MRI における大脳白質病変の重症度、皮質微小出血やラクナ梗塞の有無といった脳小血管病変との関連性を検討した。髄液抗 $A\beta$ 抗体価は、Fazekas の PVH ($R=0.300$, $P=0.012$) および DSWMH ($R=0.377$, $P=0.001$) の両スコアと正の相関関係を示した。次に、髄液抗 A 抗体価、高血圧・糖尿病・脂質異常症を説明変数として、中等度以上の大脳白質病変の合併を目的変数とするロジスティック回帰分析を行った。その結果、髄液抗 A 抗体価は、高血圧とともに、中等度以上の DSWMH (Fazekas grade 2~3) に関連する因子であることが明らかとなった (Odds ratio 2.31, 95%CI 1.22-4.36, $P=0.010$)。これらの結果から、髄液抗 $A\beta$ 抗体の上昇を介する炎症機序が、アルツハイマー型認知症における大脳白質病変の病態機序の背景に存在している可能性が推測された。今後、どのようなメカニズムを介し、髄液抗 $A\beta$ 抗体が、大脳白質病変に関連するのかを明らかにする研究が必要であると考えられた。

【研究成果のまとめ】

- 脳小血管病変患者より、ミトコンドリア外膜に発現し、エネルギー産生やアポトーシスの調整に関与する解糖系酵素の 1 つである Hexokinase-1 に対する自己抗体を同定した
- Naturally occurring anti-endothelial cell antibody の 7 つの標的抗原蛋白を同定した
- アルツハイマー型認知症患者の血清抗 Annexin A2 抗体と、同疾患の大脳白質病変の関連性を明らかにした
- アルツハイマー型認知症患者の髄液抗 A 抗体と、同疾患の大脳白質病変の関連性を明らかにした

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 17 件)

1. Kimura A, Takemura M, Saito K, Serrero G, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Increased cerebrospinal fluid progranulin correlates with interleukin-6 in the acute phase of neuromyelitis optica spectrum disorder. J Neuroimmunol. 2017;305:175-181. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.01.006. 査読有
2. Kimura A, Takemura M, Kuniaki S, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Association between naturally occurring anti-amyloid β autoantibodies and medial temporal lobe atrophy in Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017;88(2):126-131. doi: 10.1136/jnnp-2016-313476. 査読有
3. Kimura A, Takemura M, Kuniaki S, Yoshikura N, Hayashi Y, Harada N, Nishida H, Nakajima H, Inuzuka T. Comparison of cerebrospinal fluid profiles in Alzheimer's

- disease with multiple cerebral microbleeds and cerebral-amyloid angiopathy related inflammation. *J Neurol*. 2017;264(2):373-381. doi: 10.1007/s00415-016-8362-2. 査読有
4. Hayashi Y, Godai A, Yamada M, Yoshikura N, Harada N, Koumura A, Kimura A, Okayasu S, Matsuno Y, Kinoshita Y, Itoh Y, Inuzuka T. Reduction in the numbers of drugs administered to elderly in-patients with polypharmacy by a multidisciplinary review of medication using electronic medical records. *Geriatr Gerontol Int*. 2017; 17(4): 653-658. doi: 10.1111/ggi.12764. 査読有
 5. Hayashi Y, Yamada M, Kimura A, Inuzuka T. IVIG treatment for repeated hypothermic attacks associated with LGI1 antibody encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017; 4(4): e348. doi: 10. 査読有
 6. Hayashi Y, Nagasawa M, Asano T, Yoshida T, Kimura A, Inuzuka T. Central hypothermia associated with Alexander disease. A case report. *Clin Neurol Neurosurg*. 2017; 157: 31-33. doi: 10.1016/j. 査読有
 7. Hayashi Y, Kimura A, Nakamura H, Mimuro M, Iwasaki Y, Hara A, Yoshida M, Inuzuka T. Neuropathological findings from an autopsied case showing posterior reversible encephalopathy syndrome-like neuroradiological findings associated with premedication including tacrolimus for autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Neurol Sci*. 2017; 375: 382-387. doi: 10.1016/j.jns.2017.02.030. 査読有
 8. Hayashi Y, Yasunishi M, Hayashi M, Asano T, Kimura A, Inuzuka T. Reversible splenial lesion of the corpus callosum associated with meningococcal meningitis. *J Neurol Sci*. 2017 Feb 15;373:81-82. doi: 10.1016/j.jns.2016.12.035. 査読有
 9. Hayashi Y, Iwasaki Y, Takekoshi A, Yoshikura N, Asano T, Mimuro M, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. An autopsy-verified case of FTLD-TDP type A with upper motor neuron-predominant motor neuron disease mimicking MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion*. 2016; 10(6): 492-501. 査読有
 10. Hayashi Y, Yoshikura N, Takekoshi A, Yamada M, Asano T, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Inuzuka T. Preserved regional cerebral blood flow in the occipital cortices, brainstem, and cerebellum of patients with V180I-129M genetic Creutzfeldt-Jakob disease in serial SPECT studies. *J Neurol Sci*. 2016; 370: 145-151. doi: 10.1016/j.jns.2016.09.043. 査読有
 11. 犬塚 貴, 木村 暁夫, 林 祐一. 自己免疫性脳症の新展開 *神経治療学* 2016; 33: 94-98. 査読無
 12. 木村 暁夫, 犬塚 貴. 【免疫性・炎症性神経疾患-病態解明から疾患修飾薬開発まで-】(中枢神経疾患) 自己免疫性脳炎. *Modern Physician* 2016; 36(7): 688-691. 査読無
 13. Kimura A, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Kobayashi Y, Kobayashi I, Yano T, Inuzuka T. Identification of target antigens of naturally occurring autoantibodies in cerebrospinal fluid. *J Proteomics*. 2015;128:450-457. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.005. 査読有
 14. Kimura A, Sakurai T, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Ohtaki H, Chousa M, Seishima M, Inuzuka T. Identification of target antigens of antiendothelial cell antibodies against human brain microvascular endothelial cells in healthy subjects. *Curr Neurovasc Res*. 2015;12(1):25-30. 査読有
 15. Kimura A, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Inuzuka T. 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*. 2015;352(1-2):79-83. doi: 10.1016/j.jns.2015.03.036. 査読有
 16. Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Hatano T, Tatsumi S, Satoh K, Kimura A, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. Decreased regional cerebral blood flow in the bilateral thalami and medulla oblongata determined by an easy Z-score (eZIS) analysis of (99m)Tc-ECD-SPECT images in a case of MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci*. 2015; 358(1-2): 447-52. doi: 10.1016/j.jns.2015.09.356. 査読有
 17. 木村暁夫, 林 祐一, 犬塚 貴. 自己免疫性脳炎(神経細胞表面抗原を認識する自己抗体陽性脳炎). *医学のあゆみ*. 2015: 255; 497-503. 査読無
- (学会発表) (計 13 件)
1. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会 (2016 年 9 月 30 日、長崎)
MS/NMO における髄液プログレニユリンの検討: 木村 暁夫, 竹村 正男, 吉倉 延亮, 林 祐一, 犬塚 貴
 2. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会 (2016 年 9 月 30 日、長崎)
NMDA 受容体抗体陽性脳炎における多彩な自律神経症状とその対応: 吉倉 延亮, 木村 暁夫, 安西 将大, 竹腰 顕, 山田

- 恵, 林 祐一, 犬塚 貴
3. 第 57 回日本神経学会学術大会
(2016 年 5 月 21 日, 神戸)
辺縁系脳炎における原因別臨床像の比較
検討: 木村暁夫, 吉倉延亮, 竹腰 顕, 山
田 恵, 林 祐一, 犬塚 貴
 4. 第 57 回日本神経学会学術大会
(2016 年 5 月 21 日, 神戸)
自己免疫性神経疾患における新規抗血管
内皮抗体の同定: 吉倉延亮, 木村暁夫, 竹
腰 顕, 山田 恵, 林 祐一, 犬塚 貴
 5. The 68th Annual Meeting of American
Academy of Neurology
(2016/4/16, Vancouver)
Characterization of Anti-Amyloid β
Autoantibodies and Cerebrospinal Fluid
Markers of Cerebral Amyloid
Angiopathy-Related Inflammation: Kimura
A, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T
 6. 第 20 回日本神経感染症学会学術集会
(2015/10/23, 長野)
単純ヘルペス脳炎における髄液中 BAFF
の臨床的意義に関する検討: 木村暁夫,
安西将大, 瀬川 一, 竹腰 顕, 原田斉子,
吉倉延亮, 香村彰宏, 山田 恵, 林 祐一,
犬塚 貴
 7. 第 34 回日本認知症学会学術集会
(2015/10/2, 弘前)
アルツハイマー型認知症における脳小血
管病変と抗 A β 40 抗体との関連性の検討:
木村暁夫, 安西将大, 瀬川 一, 竹腰 顕,
原田斉子, 吉倉延亮, 山田 恵, 香村彰宏,
林 祐一, 犬塚 貴
 8. 第 27 回日本神経免疫学会学術集会
(2015/9/16, 岐阜)
自己免疫性脳炎における抗神経抗体の同
定: 木村暁夫, 安西将大, 瀬川 一, 竹腰
顕, 原田斉子, 吉倉延亮, 香村彰宏, 山田
恵, 林 祐一, 犬塚 貴
 9. 第 27 回日本神経免疫学会学術集会
(2015/9/15, 岐阜)
抗 NMDA 受容体抗体が陽性であった
opsoclonus-myooclonus 症候群の 1 例: 林
祐一, 吉倉延亮, 木村暁夫, 犬塚 貴
 10. 第 27 回日本神経免疫学会学術集会
(2015/9/15, 岐阜)
自己免疫性神経疾患における新規抗血管
内皮抗体の同定: 吉倉延亮, 木村暁夫, 村
上宗玄, 竹腰 顕, 山田 恵, 林 祐一, 犬
塚 貴
 11. Asia Pacific Prion Symposium 2015
(2015/9/4, Kanazawa)
SPECT findings during end-stage V180I
gCJD. Hayashi Y, Yoshikura N, Takekoshi A,
Yamada M, Kimura A, Inuzuka T.
 12. 第 56 回日本神経学会学術大会
(2015/5/21, 新潟)
自己免疫性神経疾患における新規抗血管
内皮抗体の同定と特異性の検討: 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
13. 第 56 回日本神経学会学術大会
(2015/5/23, 新潟)
脳アミロイドアンギオパチー関連炎症およ
び高齢者における抗 A β 40 抗体の特異性
の検討: 木村暁夫, 吉倉延亮, 竹腰 顕,
安西将大, 瀬川 一, 原田斉子, 香村彰宏,
林 祐一, 竹村正男, 犬塚 貴

(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

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
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
- (3) 研究協力者
吉倉 延亮 (YOSHIKURA Nobuaki) 岐阜大
学・医学部附属病院・助教
- (4) 研究協力者
香村 彰宏 (KOUMURA Akihiro) 岐阜市民
病院・神経内科・部長
- (5) 研究協力者
竹村 正男 (TAKEMURA Masao) 岐阜大
学・医学部附属病院・検査技師)

(6)研究協力者

犬塚 貴 (INUZUKA Takashi) 岐阜大学・大
学院医学系研究科・教授)