トピックス

III．最近の話題
2．膠原病における新たな抗神経抗体の検索

木村　暁夫　　犬塚　　貴

要　旨

神経障害を伴う膠原病患者において自己免疫異常を背景として出現した抗神経抗体は神経障害に密接な関りをもつ可能性がある．したがって特異的な抗神経抗体を同定することは，その病態解明に重要である．また，時に神経系の日和見感染症や精神疾患との鑑別が問題となるこれら神経症状の，適切な診断と治療効果のメルクマールの確立につながると考えられる．我々はプロテオミクス解析の手法を用いて，神経障害を伴う膠原病に特異的と考えられた新たな抗神経抗体をいくつか同定してきたので報告する．

〔日内会誌　99：1865～1870，2010〕

Key words：膠原病，神経障害，抗神経抗体，二次元免疫ブロット，プロテオミクス

1．膠原病患者の神経障害と自己抗体

膠原病患者に合併する神経障害と抗神経抗体を含めた自己抗体との関連性を報告した論文はこれまでに多数認められるが，その多くが全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus：SLE）[1)]に関するものであり，次いでSjögren症候群[2)]に関するものである．最近のレビューによると，これまでに精神神経症状を合併したSLEすなわちneuropsychiatric systemic lupus erythematosus（NPSLE）患者において，その血清ないし髄液中より約20種類の自己抗体が報告されている[1)]．特に以前より血清ないし髄液中の抗リボソームP抗体がループス精神病と有意な相関があることが指摘されており[3)]，近年同抗体の認識抗原がneuronal surface P antigen（NSAP）と名づけられた神経細胞表面に存在する蛋白であることが証明された[4)]．一方，SLE患者に存在する抗二本鎖DNA抗体がN-methyl-D-aspartate（NMDA）型抗グルタミン酸受容体の一部（NR2AおよびNR2B）と交差反応性を示し，さらにはアポトーシス経路を介して神経細胞死をもたらすとする報告もある[5)]．この報告に基づき，SLE患者血清中の抗NR2A抗体の存在とうつ症状および短期記憶障害との関連性を指摘する報告や，NMDAレセプターに対する抗体を発現するマウスを作成し，lipopolysaccharide（LPS）により血液脳関門を破綻させることで抗体が海馬の神経細胞と結合し，認知機能障害の原因となる神経細胞死に至ったとする報告もある[6)]．更にこの報告ではLPSを投与する以前にNMDAレセプターのアンタゴニストであるmemantineを加えることで神経細胞障害を防ぐことができたとして，今後の新たな治療法としての可能性を指摘している．しかし，これらの報告

きむら　あきお，いぬづか　たかし：岐阜大学大学院神経内科・老年学分野

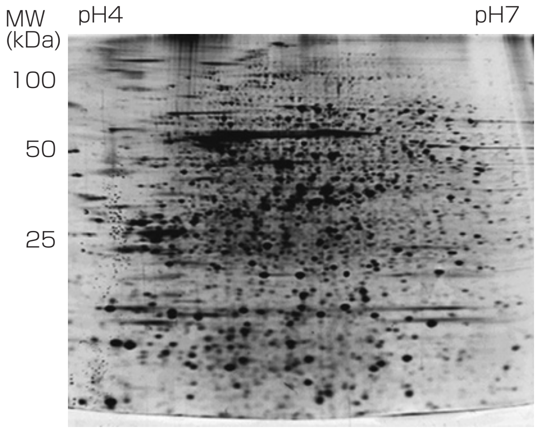

図 1．ラット大脳ホモジネートをサンプルとした二次元電気泳動後のゲル画像
蛍光色素（SYPRO® Ruby : Invitrogen）により染色した全蛋白スポット画像を示す

図 2．二次元免疫ブロット後の PVDF メンブレン画像
200 倍に希釈した辺縁系脳炎患者の髄液を用い，二次抗体として 2,000 倍希釈の抗ヒト IgGAM 抗体を用いて，抗原抗体反応を施行した．矢印に抗体反応スポットを示す．

も含めNPSLEに特異的といえる自己抗体は未だ確立していない．その理由の一つとしてNPSLE患者にみられる精神神経症状は多彩であることがあげられる．アメリカリウマチ学会（ACR）は1999 年に，SLEの精神神経病変を議論するための共通の基盤を作るために，SLEの精神神経症状の新たな分類を提唱した．この分類では，19にわたる精神神経症状を大きく中枢神経病変と末梢神経病変に分け，さらに前者を「神経症状」（neurologic syndromes）と「精神症状」（diffuse psychiatric/neuropshychological syndromes）に大別している．このようなNPSLE患者に合併する多彩な神経障害の病態背景には，多様な機序が存在することが推測され，関与しうる自己抗体も多種類存在する可能性が予想される．今後，NPSLE患者において検出された自己抗体の特異性を議論するにあたり，ACRの分類に基づいた精神神経症状との関連性を詳細に検討する必要があると考えられる．

Sjögren症候群に関する報告では，以前より感覚優位の末梢神経障害の患者で脊髄後根神経節細胞に対する自己抗体を検出したとする報告がある[2]．また，四肢筋力低下・小脳失調を呈した症例で脊髄運動ニューロン・大脳皮質ニューロン・小脳Purkinje細胞に免疫反応性を有する約34 kDaの抗神経抗体を検出したとする報告[7]や，下位運動ニューロン徴候を呈した症例で大脳もしくは脊髄に存在する約 50 kDaの蛋白に対する抗神経抗体を検出したとする報告などがある[8, 9]．しかし，これらの報告はいずれも症例報告にとどまり，検出された抗神経抗体の病的意義は不明である．今後の症例の蓄積と抗原蛋白の同定ならびに特異性の検討が重要であると思われる．

2．抗神経抗体の検索

我々は抗神経抗体の検出方法として，二次元電気泳動後にウエスタンブロットを施行する二次元免疫ブロット法を用いている．二次元電気泳動とは一次元目として固定化pH勾配ストリップゲルを使用した等電点電気泳動を行い，さらに二次元目として等電点電気泳動終了後のストリップゲルをポリアクリルアミドゲルにのせて，sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）を行うものである．二次元電気泳動を行うことでサンプル中に含まれ

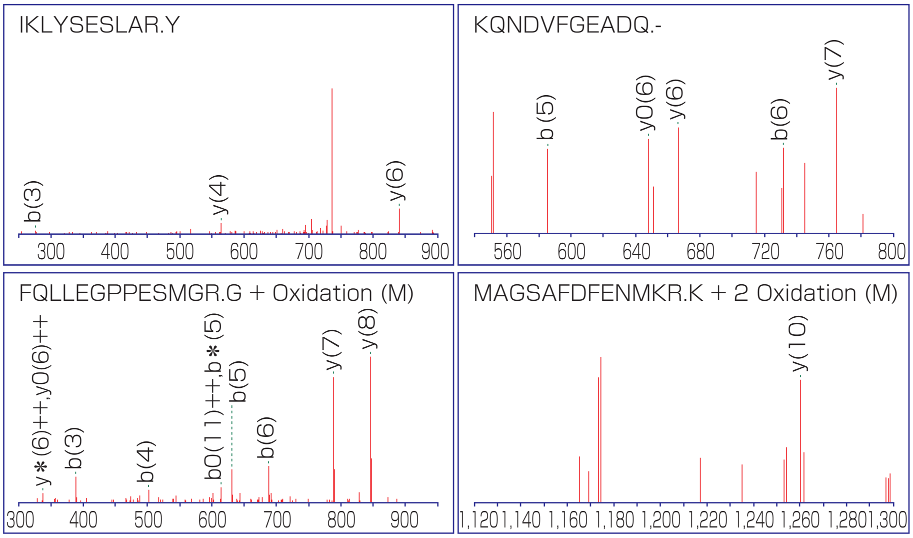

図 3. 質量分析の結果得られたペプチドの MS/MS スペクトルとアミノ酸配列
αGDI の 4 つのペプチドに相当するスペクトルが検出された.

る蛋白質は個々のもつ電荷と分子量の違いによりゲル上に多数のスポットとして展開される.我々の施設では抗神経抗体の検出のためラット大脳ホモジネートを抗原サンプルとして用いているが，この二次元電気泳動によりラット大脳サンプル中に含まれる最大約 1,400 個の蛋白スポットを再現性よく分離することが可能である(図 1).この方法の長所として抗原となる蛋白質の糖鎖などの側鎖構造がそのまま保たれる点があげられる.一方,短所としてSDS-PAGEにより蛋白質の立体構造が失われること，高分子量蛋白や塩基性蛋白の分離が比較的困難であることがあげられる.次に二次元電気泳動終了後のポリアクリルアミドゲル内の蛋白をpolyvinylidene difluoride（PVDF）メンブレンにブロットし，ブロット後のメンブレンを用いて抗原抗体反応を行うことにより網羅的に患者血清・髄液中に存在する抗神経抗体を検出している（図 2).

3. 抗神経抗体認識抗原蛋白の同定の実際

初めにラット大脳サンプルを同時に 2 枚のゲルを用いて二次元電気泳動で展開し，蛍光色素を用いて全蛋白染色する．一枚のゲルはスポット切り出し用に保存し,他方のゲルはスキャナーで全蛋白染色後の画像を取りこんだ後，免疫ブロットを行う．この時，抗原抗体反応を施行する前のメンブレンの全蛋白染色画像（全蛋白染色したゲル上の蛋白は色素を保持したままメンブレンに移行する）を画像に取り込み，さらに抗原抗体反応施行後に検出試薬を用いて抗体反応スポットを検出し画像として別に保存する．最後に抗体反応スポットと抗原抗体反応施行前のメンブレンおよびゲル上の全蛋白染色スポットを画像解析ソフトを用いてマッチングする．次に一致したスポットにつきin gel消化を行い，液体クロマトグラフィー（liquid chromatography：LC）とタンデム質量分析（tandem mass spectrometry：MS/MS)装置を組み合わせたLC-MS/MSシステムによりペプチドのアミノ酸配列を解析し（図 3)，さらにそこから得られたデータを，検索サーバーを介しデータベース検索により抗神経抗体の認識抗原蛋白を同定している(図 4).

Protein View
Match to : GDIA_RAT Score : 130
Rab GDP dissociation inhibitor alpha - Rattus norvegicus (Rat)
Nominal mass (Mr) : 51074 ; Calculated pI value : 5.00
NCBI BLAST search of GDIA_RAT against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications
Taxonomy : Rattus norvegicus
Fixed modifications : Carbamidomethyl(C)
Variable modifications : Carbamyl (N-term), Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin : cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage : 10%
Matched peptides shown in **Bold Red**

```
  1 MDEEYDVIVL GTGLTECILS GIMSVNGKKV LHMDRNPYYG GESSSITPLE
 51 ELYKRFQLLE GPPESMGRGR DWNVDLIPKF LMANGQLVKM LLYTEVTRYL
101 DFKVVEGSFV YKGGKIYKVP STETEALASN LMGMFEKRRF RKFLVFVANF
151 DENDPKTFEG VDPQTTSMRD VYRKFDLGQD VIDFTGHALA LYRTDDYLDQ
201 PCLETINRIK LYSESLARYG KSPYLYPLYG LGELPQGFAR LSAIYGGTYM
251 LNKPVDDIIM ENGKVVGVKS EGEVARCKQL ICDPSYIPDR VRKAGQVIRI
301 ICILSHPIKN TNDANSCQII IPQNQVNRKS DIYVCMISYA HNVAAQGKYI
351 AIASTTVETA EPEKEVEPAL ELLEPIDQKF VAISDLYEPI DDGSESQVFC
401 SCSYDATTHF ETTCNDIKDI YKRMAGSAFD FENMKRKQND VFGEADQ
```

図 4.　検索サーバーを利用した蛋白質の同定

Mascot Search Server に図 3 の質量分析データを送ってデータベース検索をした結果 αGDI が同定された.

4.　NPSLE患者と抗神経抗体

我々は，これまで上記プロテオミクス解析の手法を用いてNPSLE患者の血清中よりいくつかの抗神経抗体を同定し報告した[10]．二次元免疫ブロットにより 12 例の健常者血清に反応せず 7 例のNPSLE患者の血清にのみ反応した 9 つのスポットを選択し，このうちの 7 つのスポットから 6 つの抗原蛋白を同定した. これらはstress-70 protein, Rab GDP dissociation inhibitor alpha（αGDI），isocitrate dehydrogenase［NAD］subunit alpha，L-lactate dehydrogenase B chain，F-actin-capping protein subunit alpha-2, Rab GDP dissociation inhibitor beta（GDI-2）であった．これらの抗原蛋白のうちαGDIは，神経シナプスに局在し小胞輸送に必要なG蛋白Rab3aのリサイクリングに関与することが知られている．さらにαGDIをコードするGDI-1 遺伝子は，精神発達遅滞を唯一の臨床症状とする非特異的X連鎖精神遅滞の原因遺伝子の 1 つであり，そのノックアウトマウスでは，短期記憶障害，攻撃性の低下，社会行動の変化を示すことが知られている[11]．これらの報告を踏まえ抗αGDI抗体が神経シナプスにおける伝達障害に関与する可能性を考慮し，同抗体の特異性につき検討した.

5.　NPSLEと抗αGDI抗体

ヒトαGDIリコンビナント蛋白を用い, NPSLE患者および対照の血清を一次抗体として一次元免疫ブロットを施行した．検索対象はNPSLE患者 18 例, 精神神経症状を合併しないSLE患者 19 例, 多発性硬化症患者 12 例, 感染性髄膜脳炎患者 13 例，多発性ニューロパチー患者 10 例，統合失調症患者 5 例，躁うつ病患者 5 例，健常者 12 例であった. 結果, NPSLE患者 4 例と神経症状を合併しないSLE患者 1 例の計 5 例で同抗体が陽性でありその他の患者および健常者では全て陰性であった. 抗体陽性であった 4 例のNPSLE患者は臨床的に，ACRの精神神経症状の分類に基づくpsychosisを合併したため, NPSLE全患者 18 例をpsychosisの有無で 2 つに分類し改めて抗

体陽性率を検討した．結果，psychosisを合併したNPSLE患者における同抗体の陽性率は5例中4例（80％）であり，psychosisを合併しない（神経症状のみ合併する）NPSLE患者では13例中0であった．精神神経症状を合併しないSLE患者では19例中1例（5.3％）であった．その他，多発性硬化症12例，感染性髄膜脳炎13例，多発性ニューロパチー10例，精神疾患10例および健常者12例では，いずれも陰性であった．以上の結果から抗αGDI抗体はNPSLE患者におけるpsychosisと何らかの関連性がある可能性が示唆されたが，未だ少数例の検討であり，特異性の確立には今後の多数例での検討が必要と考える[10]．

6. NPSLEと抗Hsp60抗体

多発単ニューロパチーで発症し，その後特徴的な大脳・小脳・脳幹に広範な白質病変を呈した69歳男性NPSLE患者を経験し，その血清中より上記システムを用い4つの抗神経抗体を検出し報告した[12]．その認識抗原蛋白は質量分析の結果，beta-actin，alpha-internexin，heat-shock protein 60（Hsp60），glial fibrillary acidic protein（GFAP）であった．このうちのHsp60に関しては通常，ミトコンドリアのシャペロン蛋白として機能するが，ストレス下の血管内皮細胞膜表面に発現することが知られており，SLE患者において抗血管内皮細胞抗体の認識抗原として報告されている[13]．そこで我々は，各種神経疾患180例および健常者23例における血清中抗Hsp60抗体価をenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法により測定した．結果，NPSLE患者および神経症状を合併したSjögren症候群患者で高値となる傾向がみられたが，健常者やその他神経疾患患者の抗体価との間に有意差は認められなかった．

7. 膠原病患者における抗神経抗体の役割

NPSLEの病態機序はその精神神経症状の多様性と同様，自己抗体が直接的に介在する神経障害のみならず血管障害，血液凝固異常といった多様な機序が想定されている．これまでに我々がNPSLE患者より同定した自己抗体の多くは，神経組織以外にも存在する細胞骨格関連蛋白や解糖系酵素などを認識抗原とする自己抗体であり，病態機序において直接的な役割は果たしている可能性は乏しいと思われる．これらの自己抗体が膠原病患者の共通した自己免疫異常を背景とした，神経障害の結果，二次的に産生された可能性もあるが，診断のバイオマーカーとしての価値を検討することはきわめて重要であると考える．なぜなら，膠原病では神経系の日和見感染や併存する神経疾患との鑑別がしばしば困難であるからである．

最後に本研究で紹介した，新たな抗神経抗体の同定のためのプロテオミクス解析法は，神経障害を合併した膠原病患者における新たなバイオマーカーの確立に極めて有効な研究手法であり，今後も新たな発展が望まれる．

謝辞：本研究にあたりLC-MS/MSシステムによる蛋白質同定にご協力いただきました岐阜大学大学院病態情報解析医学分野竹村正男先生，清島満先生，患者血清ならびに髄液を提供していただきました同内分泌代謝病態学分野加納克徳先生および同神経内科・老年学分野山田恵先生，香村彰宏先生，櫻井岳郎先生，林祐一先生，田中優司先生，保住功先生に深謝いたします．

文　献

1）Zandman-Goddard G, et al : Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid syndrome. Semin Arthritis Rheum 36 : 297–315, 2007.
2）Moll JWB, et al : Antineuronal antibodies in patients with neurologic complications of primary Sjögren's syndrome. Neurology 43 : 2574–2581, 1993.
3）Bonfa E, et al : Association of between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. N Engl J Med 317 : 265–271, 1987.

4) Matus S, et al : Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. J Exp Med 204 : 3221–3234, 2007.
5) DeGiorgio LA, et al : A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. Nat Med 7 : 1189–1193, 2001.
6) Kowal C, et al: Cognition and immunity;antibody impairs memory. Immunity 21 : 179–188, 2004.
7) Owada K, et al : Motor weakness and cerebellar ataxia in Sjögren syndrome-identification of antineuronal antibody : a case report. J Neurol Sci 197 : 79–84, 2002.
8) 高倉由佳, 他：Sjögren症候群を合併し病初期に免疫療法が有効であったbrachial amyotrophic diplegiaの１例. 臨床神経学　45 : 346–350, 2005.
9) 清水文崇, 他：Sjögren症候群を合併し抗神経抗体をともなう進行性の下位運動ニューロン徴候を呈した45歳女性例. 臨床神経学　47 : 502–506, 2007.
10) Kimura A, et al : Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Neurology 74 : 1372–1379, 2010.
11) D'Adamo P, et al : Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. Nat Genet 19 : 134–139, 1998.
12) Kimura A, et al : Proteomic analysis of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus patient with white matter hyperintensities on brain MRI. Lupus 17 : 16–20, 2008.
13) Dieudé M, et al : Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. Arthritis Rheum 50 : 3221–3231, 2004.