

氏名	手塚 修一
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 454 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	傍腫瘍性小脳変性症における新規抗原の研究
論文審査委員	(委員長) 教授 山田 俊幸 (委員) 准教授 佐藤 滋 講師 大塚 美恵子

論文内容の要旨

1 研究目的

傍腫瘍性小脳変性症 (paraneoplastic cerebellar degeneration: PCD) においては、血清や髄液中に出現する代表的な抗体として、Yo 抗体や Hu 抗体などが知られているが、現在抗原が明らかになっている抗体が検出される症例は、症候群全体の約 36%前後と報告されている。そのため、未だ抗原未知の自己抗体が多数存在と指摘されている。この疾患群では、神経症状が急速に進行し、高度の神経障害に進展することが多く、抗体が見いだされた時点での血液浄化療法や免疫療法はあまり有効ではない場合も多い。

新規抗神経抗体の探索は、PCD の病態解明ならびに治療法の確立にとって最重要課題である。また、抗体の存在を明らかにすることは、臨床のうえで、PCD だけでなく、広く小脳変性症を鑑別診断するうえで重要な手段となり得る。

本研究では、膀胱癌を発症し、失調等の小脳症状をきたした既知抗神経抗体陰性 PCD 患者の産生する自己抗体が認識する新規抗原の同定を目的とし、新たなプロテオーム解析によるアプローチを用いてその同定を試みた。また、その新規抗神経抗体の疾患との関連性を明らかにするために、他の主要既知抗神経抗体陰性を示す PCD 症例の血清を集積し、今回同定した新規抗神経抗体との関連性について検討した。

2 研究方法

・検体の入手：膀胱癌を発症し PCD を併発した患者の血清、髄液及び膀胱腫瘍組織を、患者の同意を得て入手した。なお、本患者血清ではこれまで報告されている抗神経抗体は認められなかった。

・SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Western blot (WB)：マウス小脳組織より 1%NP-40 を含む可溶化液でタンパク質を抽出した。これを 10% SDS-PAGE で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体として、患者血清及び健常人由来の血清を用い、二次抗体は HRP 標識抗 Human IgG 抗体を使用した。

・二次元電気泳動による抗原の分離・同定；マウス小脳組織から抽出したタンパク質 200 μ g を用いて二次元電気泳動を行い、タンパク質を展開した。二次元電気泳動したタンパク質を膜に転写後、患者血清を用いた WB でスポットを検出した。別に泳動したゲルは蛍光染色

(Flamingo-Fluorescent Gel stain)後、ゲルピッカーを用いたスポットの切り出しに使用した。

- ・MS (Mass Spectrometry)解析による抗原の同定：目的のゲルスポットをトリプシンにてゲル内消化後、ペプチドを抽出して液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)測定を施行しタンパク質を同定した。

- ・免疫組織染色による抗原の発現の検討：マウス小脳及び患者腫瘍組織の凍結切片を、抗CKB抗体を用いて免疫組織学的検討をおこなった。また、膀胱癌54例の組織切片を入手し、同様に免疫組織染色を行った。

- ・Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法による抗体価の測定；ELISA法を確立し、コントロール群と比較して抗体価が優位に上昇しているかどうかを検討した。

3 研究成果

本研究では、膀胱癌を発症し、失調等の小脳症状をきたした患者血清中の抗体により認識される新規抗原の同定を試みた。まず、マウス小脳組織の抽出液を用いてWBを実施した結果、患者血清に特異的に反応するバンドが検出された。この組織抽出液を二次元電気泳動にて展開し、患者血清によるWBを実施したところ、抗原候補タンパク質となるタンパク質スポットを検出した。そのスポットを切り出し、前処理後MS解析を施行したところ、Creatine kinase B-type (CKB；CK brain-type)を新規の抗原タンパク質の候補として同定することができた。

CKBが新規の抗原タンパク質か否かを、精製ヒトCKBを用いたWBにて検討したところ、患者血清および髄液に抗CKB抗体が存在することが確認された。

抗CKB抗体の疾患への関連性を明らかにするために、患者腫瘍およびマウスおよびヒト小脳組織を用いて、抗CKB抗体による免疫組織学的検討を行った。まず患者腫瘍においては、局所的に強い染色が認められ、患者腫瘍組織におけるCKBの発現が確認された。次に、マウスおよびヒト小脳組織でのCKBの発現を確認し、特にプルキンエ細胞で強い染色を認めた。以上から、膀胱癌に発現するCKBに対する自己抗体が産生され、小脳に作用し小脳失調症状を呈するものと考えられた。

膀胱癌におけるCKBの発現が一般的な現象であるか否かを検討するために、膀胱癌54例の組織切片について、免疫組織学的検討を行ったところ、48例(約90%)の癌組織においてCKB陽性であった。

ELISA法にて、コントロール群と比較して抗体価が優位に膀胱癌性小脳変性症にて特異的に上昇していた。

4 考察

本研究において、プロテオーム解析によりPCD患者の自己抗体に対する新規抗原として、CKBを同定することができた。また、健常人、小脳症状を呈する他の疾患患者、PCDを伴わない癌患者等のコントロール血清では、抗CKB抗体が認められなかったことから、抗CKB抗体がPCD患者特有の抗神経抗体であることも確認した。さらに、病因になりうる膀胱癌組織および抗体の標的と考えられる小脳の神経細胞において、CKBが発現することを確認した。抗神経抗体として認められるためには、少なくとも2つの重要な要因がある。第1に、これらの

自己抗体が PCD による神経症状を伴っていない癌患者の血清中に存在しないこと、つまり主要な抗神経抗体は癌患者における腫瘍マーカーでないことである。第 2 に、PCD に関連した抗神経抗体に対する抗原が小脳の神経細胞に強く発現していることである。本研究では、膀胱癌 1 例、SCLC 2 例、non-Hodgkin リンパ腫 1 例の計 4 症例の PCD 患者において、患者血清中に抗 CKB 抗体の存在を確認し、上記の 2 点についても詳細に検討された。更に、本研究にて同定された抗 CKB 抗体は、Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork で提唱されている認定基準の必要条件のほとんどを満たしていた。これらの結果より、抗 CKB 抗体は PCD 関連抗神経抗体の 1 つとしてリストに加えられることは妥当と考えられる。しかしながら、他の主な抗神経抗体と同様に、PCD 診断における有用なマーカーとして確立されるためには、更なる疫学的サーベイランスが必要である。

Yo や Hu や CKB に代表される細胞質内抗原が病因である PCD の病態発症機序については、現在のところ不明である。なぜならば、PCD 患者が持つ抗神経抗体がどの様に細胞質内抗原を認識しているのかを直接的に立証することが難しいからである。これまで、受動免疫及び能動免疫による PCD 動物モデルの作製が試みられてきたが、成功例は報告されていない。

PCD の病態発症機序において最も重要な点は、小脳のプルキンエ細胞が障害されていることである。PCD 患者の抗神経自己抗体によりプルキンエ細胞が不可逆的に障害されると、PCD 患者に深刻な小脳失調症状を呈してくるようになる。従って、本研究における PCD 患者においては、抗 CKB 抗体が単に CKB の機能を抑制することにより発症するというよりは、CKB 発現の高いプルキンエ細胞自身が抗自己抗体により障害されたことにより発症したものと考えられた。

また、本研究を通じて、我々の用いたプロテオーム解析による抗原の検出及び同定は有用であることが示された。今後、抗 CKB 抗体がどの様に神経障害を引き起こしているのかを解明するために、更なる病態発症機序の解明に対する研究が必要であると考えられる。

5 結論

筆者らはこれまでの研究で癌に由来する PCD の自己抗体が認識する新規抗原を検索し CKB を同定した。免疫組織染色においてマウス小脳、患者腫瘍組織及び PCD を伴わない膀胱癌組織切片に、CKB の発現が認められた。さらに主要既知抗神経抗体陰性であった PCD 患者他 3 例の血清中においても抗 CKB 抗体が検出された。コントロール血清中には抗 CKB 抗体は認められなかった。従って、この新規神経抗原の PCD における特異性が証明された。

CKB は、主として脳に存在しているが、今回マウス及びヒト小脳（特にプルキンエ細胞）での高発現が確認され、傍腫瘍性小脳変性症の小脳症状との関わりが推定された。今回、PCD の新規自己抗体を探索した結果、癌組織における CKB の発現が確認され、自己抗体産生への癌組織の関与が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

傍腫瘍性小脳変性症 (PCD) においては、腫瘍組織中の成分に対して産生された自己抗体が、共通抗原性を有する小脳中の成分に反応することにより小脳を傷害すると考えられている。

これまで、血清や髄液中に出現する代表的な抗体として、Yo 抗体や Hu 抗体などが見出されてきたが、症候群全体の約 60%は抗原と対応する抗体が明らかになっていない。申請者は新たに抗 CKB (クレアチンキナーゼ B タイプ) 抗体をこれらのラインアップに加えた。この領域の臨床に大きな貢献を果たしたものと評価できる。

研究の大きな柱は、膀胱癌で PCD を示した患者の自己抗体 (血清中または髄液中) の対応抗原が、マウス脳組織中の CKB であることを、プロテオーム解析、ここでは 2 次元電気泳動と質量分析により同定したことである。この方法論、結果に問題はない。さらに、この抗体が PCD の病原因子であることを間接的に証明するための種々の検討が慎重になされた。

まず、CKB の存在が免疫組織化学的に、患者膀胱癌、マウスおよびヒトの小脳で確認された。小脳においては特にプルキンエ細胞で強い染色を認め、症状発現との関連が示唆された。また、膀胱癌における CKB の発現を検討したところ約 90%で陽性であり、おそらく種々の悪性腫瘍における CKB の発現が稀ではないことがうかがわれた。なお、脳組織においては小脳以外にも CKB は発現しており、他の神経症状を呈することもありうる。実際に、過去において感覚障害を起こした 1 例で抗 CKB 抗体の関与が示唆されている (この報告は不十分な検討であり、抗 CKB 抗体は一般的には認知されてこなかった)。

次に、抗 CKB 抗体を検出する ELISA を構築し、PCD を示し、既知の自己抗体が陰性であった他 3 例において本自己抗体が陽性であることが確認された。この反応の特異性はウエスタンブロットで確認されている。

本来は動物モデルなどで、本自己抗体の病原性を直接証明することも試みられるべきであるが、実際そのような試みは既知の抗体でも示されていない。しかしながら、前述の検討成績により病原性は認定可能と判断された。

行われた検討自体に大きな問題はなく、審査委員からは、論文の記載の仕方についていくつかコメントがあった。また、不明な部分に興味集中した。すなわち、なぜ CKB に対して自己抗体が産生されるのか、細胞質内抗原である CKB に対して抗原抗体反応がどのように起き、結果としてどのように傷害が起こるのか、細胞性免疫の関与はないのか、なぜ小脳傷害が優先的に起こるのか、治療はどのように考えていったらいいのか、など。これらについては将来的な検討課題とされた。それにはさらなる症例集積が必要となる。

様々な興味、疑問点が残るが、新たな診断ツールを提供した点で本研究の意義は高い。申請者は、実験を通して科学的な理解を十分身につけており、審査委員全員一致で学位論文に値するものと判断した

最終試験の結果の要旨

申請者は審査委員からの質問、意見にも適切に応えており、求められた論文修正にも適切に対応した。以上より、申請者の学識、および研究能力は学位を授与するに値すると審査委員全員一致して判断した。