

表題 傍腫瘍性小脳変性症における新規抗原の研究

論文の区分 博士課程

著者名 手 塚 修 一

担当指導教員 藤 本 健 一 准教授
氏名

所属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系専攻
精神・神経・筋骨格疾患学分野
臨床神経学

2014年1月10日申請の学位論文

目次

I. 緒言	1
1. 傍腫瘍性小脳変性症とは	1
1.1. 傍腫瘍性神経症候群と傍腫瘍性小脳変性症	1
1.2. 傍腫瘍性小脳変性症と自己抗体	2
1.3. 傍腫瘍性小脳変性症の発症機序	7
2. プロテオーム解析による自己抗体の検出	9
2.1. プロテオーム解析とは	9
2.2. プロテオーム解析における解析技術	9
II. 研究目的	12
III. 実験材料および方法	13
1. 患者及びコントロール検体	13
2. 動物組織及び試薬	13
3. Western blot (WB)及び二次元電気泳動(2-DE)	14
4. MS 分析	15
5. 組換え CKB タンパク質による抗体吸収	15
6. 免疫組織染色	16
7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による抗 CKB 抗体の定量	16

IV. 結果	18
1. PCD 患者血清中の抗神経抗体の検出	18
2. プロテオーム解析による PCD 関連新規抗原の同定	20
3. PCD 患者血清及び髄液中の抗 CKB 抗体の検出	21
4. 免疫組織染色によるマウス小脳及び膀胱癌組織における CKB 発現の検討	23
5. 膀胱癌組織における CKB の発現	23
6. 患者血清を用いたマウス小脳および膀胱癌組織の免疫染色	25
7. 小脳以外の脳組織における抗 CKB 抗体及び患者血清による免疫反応	27
8. 他の PCD 患者血清を用いた抗 CKB 抗体の特異性についての検討	31
9. ELISA 法による抗 CKB 抗体の検出・定量	34
10. 免疫組織染色によるヒト小脳組織における CKB 発現の検討	36
V. 考察	37
VI. まとめ	41
VII. 謝辞	42
VIII. 参考文献	43

I. 緒言

1. 傍腫瘍性小脳変性症とは

1-1 傍腫瘍性神経症候群 (paraneoplastic neurological syndromes: PNS) と傍腫瘍性小脳変性症 (paraneoplastic cerebellar degeneration: PCD)

担癌患者に生じる神経疾患で、腫瘍と密接に関連しその発症に免疫学的機序が関与すると考えられる一群を PNS と称する。PNS においては、小脳変性症、脳脊髄炎、辺縁系脳炎、後根神経節/末梢神経炎、神経筋接合部疾患、筋炎など、神経筋の様々な組織に病変主座を有する病型が認められる。PNS 患者の血清及び髄液中には、腫瘍細胞と神経細胞に共通に発現する抗原(onconeural antigen)を認識し標的とした抗神経抗体(onconeural antibodies)が認められ、PNS は神経抗原を異所性に発現した腫瘍に対する免疫反応が自己の神経組織を傷害することにより発症すると考えられている[1]。また、“抗神経抗体(onconeural antibodies)”という用語は、腫瘍/神経共通抗原認識抗体を意味する専門用語として、癌免疫学者によって提唱されたものである[2]。以下本論文では、腫瘍/神経共通抗原認識抗体を抗神経抗体と呼ぶ。癌患者の 1~25%において何らかの PNS を合併すると報告されているが、今後癌患者数の増加とともにその罹患数も増加すると推定される[3]。PNS の 70~80%は腫瘍の発見に先んじて神経筋症状が現れる。発症早期から、血液・髄液中に病型と関連する自己抗体が認められ、関連自己抗体の検出は、本症の診断および悪性腫瘍早期発見のマーカーとしても有用である。しかし、既に同定されている PNS 関連自己抗体が検出される症例は少なく、また PNS のみに特異的に出現する神経症状が存在するわけではないことから、早期診断は難しいというのが現状である。近年、抗体検出技術に大きな進歩が見られ、中枢・末梢神経系の様々な疾患において、診断に有用な自己抗体 (NMDA 受容体抗体・アクアポリン 4 抗体等)が相次いで発見されている[4]。これは、従来の免疫組織化学的方法や Western blot による検出に加え、プロテオーム解析手法が導入され、新たな抗原分子の同定が可能になってきたことに起因する。また、細胞表面抗原に対する cDNA を生細胞に発現させることにより立体構造を保ったままで抗原を発現させる手法が導入され、三次元構造を認識する抗体を検出したり、細胞表面受容体抗体やチャネルに対する自己抗体がどのように神経細胞の機能を障害するのかを明らかにできるようになって

きた。生体内で生じる自己抗体は通常ポリクローナルで、同じ抗原を認識する複数の抗体が混在することも多い。そこで多数の抗体を同時に検出する手法も開発されてきている。PNSに関連する新たな自己抗体が同定されるにつれて、抗原の局在による治療反応性の差異や予後の推定が可能になると同時に、神経傷害機序の解明にも新たな知見が加わった[5, 6, 7]。

PCD は、最も頻度の高い PNS の 1 つであり[8]、全悪性腫瘍患者の 0.2% に小脳変性症が出現すると報告されている[9]。PCD に随伴する主な腫瘍を表 1 に示す。多くの場合、亜急性に小脳症状が出現し、数週から数ヶ月で症状の悪化を認め、半年以内に症状は安定する。小脳症状が出現した当初は、悪性腫瘍が見つからず、1 年以内に悪性腫瘍が発見される場合も多い。PCD であれば、患者血清や髄液中に抗神経自己抗体が出現している可能性があり、その検出は診断に有用である。本症における代表的な既知抗体として、Yo 抗体や Hu 抗体などが知られている。しかし、主要既知抗体が検出される症例は、PCD の約 36% 前後と比較的少なく[10]、本疾患に関連する未知の自己抗体が認識する新規抗原の網羅的な解析が求められている。

表 1. PCD に随伴する主な腫瘍

卵巣癌、子宮癌、乳癌
肺小細胞癌、悪性リンパ腫、精巣癌
胸腺腫、神経芽細胞腫、非小細胞性肺癌、悪性黒色腫

1-2 PCD と自己抗体

PCD で出現する自己抗体には表 2 に示すような抗体が知られており、それぞれ特有の悪性腫瘍と関連している。随伴する腫瘍としては、肺小細胞癌や乳癌、卵巣癌、子宮癌、胸腺腫などが多い。PCD には、小脳症状のみが単独で出現するものと、他の神経症状とともに小脳症状が出現するものがある。小脳症状のみが出現するものとしては、Yo 抗体、VGCC 抗体、Tr 抗体、mGluR 抗体、Zic 抗体、CARPVIII 抗体などがある。それ以外の抗体が関連する PCD では、小脳症状に加え、神経・筋症状が出現することもある。以下に PCD に関連する主要な既知抗神経抗体について概説する。

表 2. PCD に関連する主要既知抗神経抗体と小脳症状以外の神経症状

抗神経抗体	抗原	腫瘍	小脳症状以外の主な神経症状
〔細胞内タンパク質に対する抗体〕			
Yo 抗体	CDR2	卵巣癌、子宮癌、乳癌	知られていない
Hu 抗体	HuD	肺小細胞癌、 前立腺癌、副腎癌 軟骨粘液腫、肺腺癌 神経芽細胞腫	感覚性ニューロン障害、 辺縁系脳炎 自律神経障害 脳幹脳炎、脊髄症
Ri 抗体	Nova-1	乳癌	オブソクローヌス・ミ オクローヌス
Tr 抗体	DNER	Hodgkin リンパ腫	知られていない
CV-2 抗体	CV-2	肺小細胞癌 皮膚癌、消化器癌 前立腺癌、乳癌 リンパ腫	辺縁系脳炎 末梢神経障害 錐体外路症状 視症状、脳神経麻痺
Ma 抗体	Ma1, Ma2, Ma3	精巣癌、肺癌、乳癌	脳幹脳炎
Ma2 抗体	Ma2	精巣癌、肺癌、乳癌	辺縁系脳炎 脳幹脳炎
Amphiphysin 抗体	Amphiphysin	乳癌、肺小細胞癌	Stiff-person 症候群 辺縁系脳炎
CKB 抗体 (本報告)	Creatine kinase, brain- type	膀胱癌、肺小細胞癌、 悪性リンパ腫	感覚性ニューロン障害
〔細胞表面タンパク質に対する抗体〕			
mGluR1 抗体	mGluR	Hodgkin リンパ腫	知られていない
VGCC 抗体	VGCC	肺小細胞癌	Lambert-Eaton 筋無力症候群

a. Yo 抗体

Yo 抗体は、PCD のうち、子宮癌や卵巣癌などの婦人科領域の悪性腫瘍や乳癌を伴う女性患者にみられる抗体である。急性・亜急性の経過で重篤な小脳失調を呈する。小脳失調は急速に進行し、各種の免疫療法（ステロイド、cyclophosphamide, ガンマグロブリン, 血漿交換）で症状が改善しないことが多い。小脳症状は亜急性に進行した後に安定化するが、癌そのものが予後を左右し、平均生存期間は乳癌で 100 カ月、婦人科癌で 22 カ月と報告されている[11]。Yo 抗体は、免疫組織染色で小脳プルキンエ細胞の細胞質、小脳分子層の神経細胞の細胞質や脳幹などにある神経細胞の細胞質を強く染め、神経組織以外はほとんど染まらない[12]。Western blot では 58 kDa 付近に反応するバンドを認め、Yo 抗体が認識する抗原は CDR2 と呼ばれている[13]。この抗原タンパク質の細胞内機能については不明な点が多いが、そのタンパク質内に leucine zipper motif を持ち、転写調節に関わっている可能性が指摘されている[14]。このモチーフを持つタンパク質は、ヘテロ二量体またはホモ二量体を形成するが、CDR2 は細胞増殖、癌化やアポトーシスなどに重要な役割をしていることが知られている PKN、c-Myc や MRGX などと結合することが明らかになっている[15]。これらのタンパク質も leucine zipper motif を持っており、このモチーフを介して CDR2 と結合していると考えられる。Yo 抗体が出現した PCD 患者血液中には、CDR2 を特異的に認識する細胞障害性 T 細胞が出現することも報告されており、細胞傷害性 T 細胞免疫と病態発症機序との関連も指摘されている[16]。

b. Hu 抗体

肺小細胞癌に随伴する PCD は 4 種類(Hu 抗体, SOX1 抗体, VGCC 抗体, ZIC4 抗体)を超える抗体が報告されている。その中でも Hu 抗体が最も古くから研究され代表的な抗体である。Hu 抗原は肺小細胞癌などの癌細胞に発現している。Hu 抗体陽性患者の多くは、多彩な神経症状を呈し、感覚性ニューロン障害、小脳変性症、脳幹脳炎や辺縁系脳炎を含む脳脊髄炎、自律神経障害などが組み合わさった神経症状を示す。この中で、患者の臨床症状の 6 割近くが感覚性ニューロン障害、次いで 2 割に辺縁系脳炎がみられ、小脳変性症はそれに次ぐ。Hu 抗体が出現する PNS の 7～8 割が肺小細胞癌を随伴し、そのほか、前立腺癌、副腎

癌、軟骨粘液腫、肺腺癌、神経芽細胞腫などの報告がある。Hu 抗体陽性患者の肺小細胞癌は胸郭に限局しており、その進行は極めて遅く、剖検するまで腫瘍の存在がわからない場合もある。神経障害の範囲や治療の有無が予後と関連し、特に免疫療法（ステロイド、cyclophosphamide、ガンマグロブリン、血漿交換）が行われた群で有意に予後が良好もしくは不変であったとしている[17]。Hu 抗体を用いた免疫組織染色では、中枢神経系の大部分の神経細胞の核を強く染めるが、グリア細胞や非神経組織の細胞は染まることはない。Hu 抗体は Western blot で 34～43 kDa の複数の抗原を認識する。対応抗原には数種類の isotype が存在し、Hu family (HuD, HuC/ple21, bet-NI, HuR) をなす。これらの抗原のうち、HuR を除く抗原は神経細胞にのみ発現しており、いずれも核に存在している。これらの抗原はいずれも 3つの Ribonucleoprotein (RPN) 型 RNA 認識配列を持つ RNA 結合タンパク質であり、Gap-43、tau タンパク質、neurofilament M、p21、TNF- α などの mRNA の 3'非翻訳配列中の Adenine Uridine (AU)-rich element に結合し、これら mRNA の安定化に関与することが知られている[18]。上記の多様な mRNA の安定化を介して神経細胞の分化決定に大きな影響を与え、神経系の発達と維持に重要な働きをしていると考えられている。

c. Ri 抗体

PCD の中でも、オプソクローヌス・ミオクローヌスを伴う小脳失調症の患者には Ri 抗体が出現する。小児ではミオクローヌスとオプソクローヌスを伴う小脳失調症は神経芽細胞腫と関連して発症がみられ、成人においては乳癌や肺小細胞癌が主に随伴する[19]。オプソクローヌス・ミオクローヌスでは、亜急性の体幹失調にオプソクローヌスなどの眼球運動の異常を伴い、めまいや嘔気、嚥下障害、聴覚障害、近位筋の筋力低下などを呈する。時に自然経過で症状の軽減を認めることがある。Ri 抗体を用いた免疫組織染色では Hu 抗体での染色パターンと類似しており、大部分の神経細胞の核を染色するが、非神経組織及び後根神経節細胞などの末梢神経の細胞核は染色しない。Western blot では 55 kDa と 80 kDa のバンドが認識される。認識される抗原は神経系に特異的に発現する RNA 結合タンパク質である Nova-1 である。Nova-1 は主に脳幹や脊髄の神経細胞に発現しており、大脳皮質や視床の神経細胞では発現が認められない[20]。ま

た、オプソクローヌスは脳幹の抑制性グリシン作動性神経細胞と、ミオクローヌスは脳幹や脊髄のグリシン作動性・GABA 作動性運動神経細胞と関連するとされている。Nova-1 タンパク質は、K type の RNA 結合タンパク質で、グリシン受容体や GABA 受容体の pre-mRNA のイントロン中の UCAUY 配列を認識して結合する[21]。Ri 抗体はこの Nova-1 の RNA 結合活性を阻害することが知られている[22]。このため、Nova-1 は主に、オプソクローヌス・ミオクローヌスや小脳失調などの運動性の機能に関与しているとされている。

d. Tr 抗体

多くは Hodgkin リンパ腫に随伴し、小脳症状が単独に出現する。Hodgkin リンパ腫が治療されて腫瘍が消失すると、抗体も消失することが報告されている。この抗体が出現する小脳変性症の 14% に症状の改善がみられることから、小脳症状が可逆的な障害であることを示唆している[23]。Tr 抗体は小脳プルキンエ細胞の細胞質を染め、小脳分子層を点状に染める抗体である。対応抗原は、EGF 関連膜貫通分子 DNER (Delta/Notch-like EGF-related Receptor) であることが同定されている[24]。

e. CV-2 抗体

CV-2 抗体は、2001 年に Lennon らのグループによって報告された抗神経抗体で、主に肺小細胞癌や胸腺腫を随伴する[25]。臨床的には多彩な神経症状を呈するが、小脳変性症は辺縁系脳炎症状や末梢神経症と並んで頻度が高い。CV-2 抗体陽性の患者には、舞踏病、パーキンソニズムやジストニアのような錐体外路症状や視神経炎、網膜炎、硝子体の炎症性細胞浸潤などの視症状、嗅覚や味覚の異常や脳神経麻痺など他の PNS ではみられない特徴的な症状が出現する[26]。CV-2 抗体は 66 kDa の抗原を認識し、免疫組織染色では、この抗体はオリゴデンドログリアの細胞質と反応する。また中枢神経系では、脳幹、小脳、脊髄の白質、小脳では分子層が広汎に染色される。CV-2 は、神経細胞の軸索誘導、軸索輸送亢進、成長円錐の崩壊に重要な役割を果たすセマフォリン sema3A のシグナル情報伝達を媒介するタンパク質の 1 つであり、神経細胞やオリゴデンドロサイトの分化と軸索や突起の伸長に関連すると考えられている[27]。

f. Ma 抗体

Ma 抗体は、当初、肺癌や乳癌、耳下腺癌、大腸癌に合併した脳幹脳炎の症例で同定された神経細胞核と反応する抗体で、40 kDa と 42 kDa のタンパク質を認識する Ma1 抗体と Ma2 (Ta) 抗体が知られている。Ma 抗体では、PCD が最も多く、次いで脳幹脳炎が多い。Ma2 (Ta) 抗体が出現する場合には、数週から半年程度かけて進行する過眠や高体温などの視床下部症状や辺縁系・上部脳幹症状を呈する。頭部 MRI では側頭葉内側面や視床下部、基底核、視床、四丘体領域に異常信号を認め、髄液検査では軽度の細胞増多を認める。辺縁系脳炎が最も多く、次いで脳幹脳炎が多い。Ma2 (Ta) 抗体が出現する PNS 患者の場合にも、約 20% に小脳症状が出現する。Ma 抗体や Ma2 抗体陽性の患者は精巣癌を随伴することも多い[28]。Ma 抗体は、免疫組織染色で中枢神経系の多くの神経細胞の核小体と反応する。Ma 抗体は Ma1、Ma2、Ma3 の 3 つのタンパク質と反応する抗体であり、一方 Ma2 (Ta) 抗体は、Ma2 抗原のみを認識する[29]。

g. Amphiphysin 抗体

Amphiphysin 抗体はシナプス顆粒にある 128 kDa のタンパク質 (Amphiphysin) に反応する抗体で、傍腫瘍性 stiff-person syndrome を呈した乳癌患者で報告されたが、amphiphysin 抗体陽性 63 例の検討では、11 例で PCD を呈したと報告されている[30]。Amphiphysin 抗体はヒト大脳の神経細胞や好中球と反応する。

1-3 PCD の発症機序

PCD は、腫瘍に対する抗腫瘍免疫反応により産生された抗体が、神経細胞にも発現する共通抗原 (onconeural antigen) を攻撃する結果発症すると考えられている。これらの抗体の存在は、PCD を診断するうえで有用である。細胞表面抗原に対する抗体においては、抗体が直接神経細胞表面抗原に作用し発症すると考えられる。ヒト mGluR 抗体をマウスのくも膜下腔に直接移入すると、移入した抗体は小脳組織の全ての層に分布し、移入されたマウスは臨床的に失調症状を示した。あらかじめ mGluR1 抗原で吸収処理された抗体を移入すると失調

症状は惹起されなかった[31]。mGluR 抗体は *in vitro* でも *in vivo* でも小脳プルキンエ細胞に直接作用し、急性の可逆的な障害と慢性の変性を引き起こすことが証明された[32]。VGCC 抗体についても、抗体が直接小脳神経細胞表面の channel に作用しその機能を阻害し、症状を引き起こさせている可能性が示されている[33]。このように、細胞表面の抗原に対する自己抗体は直接小脳変性症の病態に関与していると考えられる。

一方、細胞内タンパク質を抗原とする自己抗体が出現する疾患では、病態発症機序に対する抗体の役割について不明な点が多い。GAD 抗体では、抗体をマウスの小脳に直接的に注入することにより、末梢刺激による皮質運動系の増強促進を抑制することが示され、抗体が直接発症機序に関与している可能性が示された[34]。また、amphiphysin 抗体においても、実験動物を用いた抗体の受動移入や能動免疫で、実験動物に対して神経症状を誘発することができたとの報告がなされている[35, 36]。しかしながら、Hu 抗体や Yo 抗体では受動及び能動免疫で、実験動物に臨床症状を惹起することはできておらず、また免疫療法がほとんど効果を示さないことから、抗体単独で病気を発症させる可能性は低いと考えられている。Yo 抗体が出現する PCD の患者血液で CDR2 抗原を特異的に認識する細胞障害性 T 細胞が出現することが報告されており、CD8 陽性 T 細胞が病因に関与している可能性が考えられている[16]。しかし、マウスに実験的に CDR2 抗原特異的細胞障害性 T 細胞を誘導することは可能であったが、CDR2 抗原特異的 T 細胞が誘導されたマウスに小脳失調症状は観察されなかった[37]。また、その後のマウスにおける追試では、抗原特異的細胞障害性 T 細胞の存在は確認できていない。Hu 抗体が出現する患者の剖検脳では病変部位に CD8 陽性細胞が浸潤していること、さらに病変部位に浸潤している CD8 陽性 T 細胞の T 細胞受容体遺伝子の oligoclonality から、発症機序に対する CD8 陽性 T 細胞の関与が強く示唆されている。また、HuD 特異的 type 2 CD8 陽性 T 細胞が患者血液に存在していることが証明され、この CD8 陽性 T 細胞は主に IL5 と IL13 を産生していることが報告されている[38]。しかし、一方で抗体分子、特に IgG が細胞内に取り込まれ、神経細胞を障害することが示されている[39, 40]。抗原の提示条件によっては核内にも入り得ることが自己免疫疾患の抗核抗体免疫染色にて証明されている。また、抗原の存在部位が細胞内の場合でも、条件によって

は抗原が細胞外に出ることも知られている[41]。この過程では細胞表面抗原に対する抗体産生の場合に比べ、病態発症までにより長い時間を要すると考えられる。この場合、神経症状発症時点では既に不可逆的な組織傷害が生じている可能性も考えられ、治療に反応しにくい可能性がある。

2. プロテオーム解析による自己抗体の検出

2-1 プロテオーム解析とは

ヒトゲノムプロジェクトが終了しヒトゲノムの全塩基配列が明らかになった後、トランスクリプトーム解析と呼ばれる DNA マイクロアレイなどによる mRNA の網羅的発現解析が盛んに行われてきた。しかし、1) タンパク質が生体内で実際に作用する機能分子であること、2) 細胞内の mRNA 発現量とタンパク質の存在量は必ずしも比例しないこと、3) タンパク質の機能は、細胞内での局在化、プロセッシングや翻訳後修飾などにより制御されており、mRNA とは別のレベルで調節されていることなどの理由により、生命科学研究の関心は遺伝子の機能的翻訳産物であるタンパク質の機能解析に移りつつある。これを受けて、近年、細胞で機能するタンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析が注目を浴びている。プロテオーム (proteome) とは、ある細胞がもつ全ての遺伝子 (gene) の集団 (ome) をゲノム (genome) と呼ぶのに対して作られた、タンパク質 (protein) の集団 (ome) という意味の造語である。具体的には、ある細胞がある条件下に置かれたときに、その細胞内に存在する全てのタンパク質を意味している。プロテオーム解析はタンパク質の全体像を調べることであり、生命現象や表現型の違いを、ある細胞が持つタンパク質の全体像の変化として捉え、その背景にある各タンパク質の機能や各タンパク質が構築する機能ネットワークを明らかにする研究手法である。こうして得られた新しい知見は、癌をはじめとする疾病の早期診断や病態の解明、さらには創薬研究へと応用されている[42]。

2-2 プロテオーム解析における解析技術

プロテオーム解析には高性能な分析機器を駆使した多種多様な手法がある。中でも二次元電気泳動 (two-dimensional electrophoresis: 2-DE) と質量分析

(mass spectrometry: MS) を基礎としたプロテオーム解析 (2-DE/MS) は、現在比較的よく使われる解析技術である[43]。二次元電気泳動とは、個々のタンパク質が持つ等電点 (pI) の違いを利用した等電点電気泳動(isoelectric focusing: IEF) と、分子量の違いを利用した SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を組み合わせることによってタンパク質を分離する方法である[44]。この手法を用いることにより、数百から数千種類のタンパク質を同時に分離することが可能であり、個々のタンパク質スポットとして可視化し、ある細胞集団のタンパク質発現解析を簡便に行うことができる。

二次元電気泳動によって、発現変動が認められたスポット中のタンパク質は、酵素処理によりペプチド化し、得られたペプチド断片の質量を質量分析装置で決定することで、元のタンパク質を同定することが可能である。具体的には、質量分析によって、サンプル中に含まれる各ペプチドの質量情報 (MS スペクトル) を取得する。この時、各ペプチド断片は、酵素処理により元となるタンパク質のアミノ酸配列に依存して切断されたものであるので、得られた MS スペクトルは、タンパク質固有のものとなる。これを、既にデータベース上に登録されているタンパク質の MS スペクトルと照合することで、タンパク質の同定をおこなう (ペプチドマスフィンガープリント法)。さらにタンデムマス質量分析 (MS/MS) 装置を用いることで、ペプチド断片の部分アミノ酸配列や翻訳後修飾の情報まで取得することができ、高精度にタンパク質の同定が可能となっている。この MS/MS 装置から得られた MS/MS スペクトルを用いたタンパク質同定法のひとつとして、タンパク質同定解析ソフト MASCOT™ (Matrix Science) による MS/MS ion search が挙げられる。具体的には、質量分析で MS スペクトルを取得する際に、特定の *m/z* のイオン(プリカーサーイオン)を選択し、このイオンの衝突誘起解離によって生じるプロダクトイオンの MS/MS スペクトルを取得する。次にデータベースに登録されている全タンパク質をサンプルと同じ酵素で消化した際に得られるペプチド断片の情報を取得し、このペプチド断片をコンピューター内で断片化させて、仮想 MS/MS スペクトルを取得する。そして得られた MS/MS スペクトルと仮想 MS/MS スペクトルとの一致度について統計学的に判断し、同時にペプチドの分子量情報も考慮して同定を行う方法である[45]。

プロテオーム解析は、PNS における自己抗体に対する新規抗原の探索に有用であると考えられ、実際近年いくつかの抗神経抗体の検出が報告されている[5, 6, 7]。また、これまで解明されてこなかった PNS と類似の機構により生じる自己免疫疾患の抗原の同定にも応用可能であると期待される。

II. 研究目的

PCD において、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すると指摘されている。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ない場合も多いが、腫瘍の早期治療により神経症状の改善が得られることが報告されている。

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。一方で、多様な抗体を選択して検出することには大変な困難を伴うことから、効率よく多数の抗体をスクリーニングできるシステムの構築が待たれている。

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。さらに、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。

Ⅲ. 実験材料および方法

1. 患者及びコントロール検体

本症例患者は、自治医科大学付属病院への入院 1 カ月前に膀胱癌(尿路上皮癌)と診断された 66 歳男性である。入院時、水平性眼振・構音障害・四肢の失調症状による歩行困難等の小脳症状が認められた。血算及び生化学検査では、異常なかった。PNS に関連する血清中の既知抗自己抗体 (Yo, Hu, Ri, Tr, CV2, Ma1, Ma2, and amphiphysin 抗体)は、すべて陰性であった。脳脊髄液検査では、細胞数 $29/\mu\text{L}$ (すべて単核球) , 総蛋白 77 mg/dL , 糖 68 mg/dL で軽度の細胞増多, 総蛋白増加を認め、ミエリン塩基性蛋白は 132 pg/mL と軽度高値であった。尿検査では、尿蛋白陽性以外に異常はなく、胸部 X 線写真, 心電図に異常なかった。頭部 MRI では異常なく、 ^{123}I -IMP を用いた脳血流シンチグラフィーでも小脳に血流低下は認めなかった。末梢神経伝導検査では異常はなかった。しかし、Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork で提唱された PNS の診断基準により、PCD と診断された[46]。泌尿器科で入院約 1 カ月後、経尿道的膀胱腫瘍切除術(病理: 尿路上皮癌 G 2 , pTa)を施行したが、小脳性運動失調は改善しなかった。その後、二重濾過血漿交換療法(double filtration plasmapheresis : DFPP) を 1 回施行したが、明らかな効果はなかった。本症例患者の血清、髄液及び膀胱癌手術の際に摘出した膀胱癌組織の一部を、患者の同意のもとに入手した。健常人 10 人及び小脳症状を呈する PCD 以外の患者 (急性小脳炎 2、脊髓小脳変性症 14、小脳梗塞 2、オプソクローヌス・ミオクローヌス 1、進行性核上性麻痺 1) の血清をコントロール検体として用いた。また、Yo 抗体陽性 PCD 患者 3 人の血清もコントロールとして用いた。

なお、この研究は、自治医科大学臨床研究倫理委員会の許可を得て行われた。

2. 動物組織及び試薬

6~9 週齢の C57BL/6J 雄マウス (日本クレア) を実験に使用した。マウスは頸椎脱臼にて安楽死させ、小脳と肝臓を摘出した。摘出した組織を液体窒素下で急速に冷凍した後、使用するまで -80°C にて保存した。動物実験については、自治医科大学動物実験委員会の許可を得て行った。

精製ヒト脳型クレアチンキナーゼ(CKB)、ヒト筋型クレアチンキナーゼ

(CKM)、抗 CKB 抗体(rabbit monoclonal, ヒト・マウス・ラットの CKB を認識する)、抗 β -アクチン抗体は Abcam (Cambridge, UK)より入手した。免疫組織染色の際に関連性のないネガティブコントロールとして用いられた抗 HA 抗体(rabbit polyclonal)は Santa Cruz Biotechnology より入手した。ヒト膀胱癌(尿路上皮癌)組織アレイスライドは US Biomax, Inc. (Rockville, MD, USA)より、また、ヒト凍結切片小脳組織スライドは BioChain (CA, USA)より購入した。免疫組織染色のためのパラフィンマウス脳矢状断切片スライドは Genostaff Co., Ltd. (Tokyo, Japan)より購入した。

3. Western blot (WB)及び二次元電気泳動(2-DE)

マウス小脳及び肝臓組織抽出液は、プロテアーゼ阻害剤(Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem, San Diego, CA)を付加した NP-40 lysis buffer [1% NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 10% glycerol]を用いて作製した。抽出液中のタンパク質 (100 μ g)を、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)にて分離し、その後分離されたタンパク質をニトロセルロース膜 (GE Healthcare)に転写した。患者及びコントロール血清は、blocking buffer [2% fetal bovine serum (FBS), 0.5% skim milk in phosphate-buffered saline with 0.05% Tween20 (PBST)]にて1000倍に希釈し、ニトロセルロース膜と共に 4°Cにて一晩インキュベートした。その後、そのニトロセルロース膜を PBST にて洗浄し、500 倍希釈した Horseradish peroxidase conjugated anti-human Ig secondary antibody (GE Healthcare) にて室温 1 時間インキュベートした後、ECL 試薬 (GE Healthcare) を反応させた。化学発光反応を示したバンドを、LAS mini 4000 (GE Healthcare) を用いて検出した。コントロールの β -アクチンの検出には、2000 倍希釈の Mouse anti- β -actin antibody (Abcam) を用いた。血清中の抗 CKB 抗体の存在は、抽出液の代わりに精製 CKB タンパク質及び CKM タンパク質を用いて確認した。

2-DE については、2 つのゲルを作製し、Mass spectrometry (MS)解析に必要なスポットの切り出しのために、免疫反応による陽性スポットの検出のためにそれぞれ使用した。200 μ g のマウス小脳タンパク質を、Ettan 2-D Clean-up kit (GE Healthcare)を用いて精製・濃縮した。サンプルを Immobiline Drystrips

(pH 3-11 NL, 18 cm, GE Healthcare) に加えて、step gradient protocol を使い (rehydration for 12 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, and 8000 V for 8 h)、Ettan IPGphor System (GE Healthcare) を用いて等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動で分離されたタンパク質は、10% SDS-PAGE で二次元展開され、一方のゲルを Flamingo™ Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で染色した。もう一方のゲル中のタンパク質は、PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写され、患者血清を用いた WB で陽性スポットを検出した。

4. MS 分析

WB で陽性のスポットと同一のスポットを蛍光色素で染色された 2-DE ゲルから、2-DE Gel-Picker FluoroPhoreStar 3000 (Anatech, Tokyo, Japan) を用いて切り出した。切り出されたゲルスポット中のタンパク質はトリプシン (12.5 ng/ μ l, Promega, Madison, WI, USA) にて酵素消化された。

液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) は、FINNIGAN LTQ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を用いて行った (MS4, AMR 社)。これらの分析結果を MASCOT software program version 2.2 (Matrix Science, London UK) と National Center for Biotechnology Information (NCBI) database を用いた MS/MS ion search で各スポット中のタンパク質を同定した。なお、同定にあたっては MASCOT score 50 以上を、有意差があるものとした。

5. 組換え CKB タンパク質による抗体吸収

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と CKB の融合タンパク質を発現するベクターを作るため、まずヒト CKB cDNA フラグメントを pCAGGS-hCKB をテンプレートとして *Pfu* ULTRA DNA polymerase (Agilent, USA) で増幅し、pGEX-4T-1 の *Eco* RI と *Xho* I サイトにサブサブクローニングした [47]。GST 及び GST-CKB 融合タンパク質を大腸菌 BL21 に発現させ、glutathione sepharose 4B™ ビーズ (GE Healthcare) を用いて精製した。精製された GST 及び GST-CKB 融合タンパク質 (50 μ g) を、50% glutathione

sepharose ビーズ懸濁液 60 μ l と共に、4°Cで1時間インキュベートした。その後、ビーズを洗浄液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% NP-40) で3回洗浄した。ビーズに抗CKB抗体陽性PCD患者血清 (20 μ l)を加え、4°Cで1時間インキュベートした後、血清を回収した。その抗体吸収後の血清 (1000倍希釈)を、マウス小脳タンパク質 (100 μ g) 及び精製CKBタンパク質 (0.5 μ g)を用いたWBで使用した。遺伝子組み換え実験については、自治医科大学遺伝子組み換え実験安全委員会の許可を得て行った。

6. 免疫組織染色

免疫染色施行前に、パラフィン膀胱癌組織アレイスライドおよびパラフィンマウス脳矢状断切片スライドは、キシレン及びエタノールによる脱パラフィン処理及び親水化を行った。PCD患者膀胱癌の凍結切片スライド及びヒト凍結切片小脳組織スライドは、PBSで親水化した。その後、0.05% citraconic anhydride solution, pH 7.4 (Immunosaver; Nissin EM Co. Ltd., Tokyo, Japan) による抗原賦活を、98°Cで45分間行った。PBSで3回洗浄し、細胞内のペルオキシダーゼ活性を不活化するために、0.3%過酸化水素水/メタノールで10分間処理した。切片を5% FBS/PBSで1時間ブロッキングした後、ブロッキング液で希釈した一次抗体 (rabbit 抗CKB抗体; 200倍、ヒト血清; 1000倍、抗体吸収処理後血清; 200倍)を、4°Cで一晩インキュベーションした。また、関連性のないネガティブコントロールとして抗HA抗体(rabbit polyclonal)を200倍希釈して使用した。その後、200倍希釈のビオチン標識二次抗体 (anti-rabbit or anti-human Ig, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を、室温で30分間反応させ、VECTASTAIN ABC 及び DAB Peroxidase Substrate 染色キット (Vector Laboratories)で発色した。組織学的評価のためにすべてのスライド切片をヘマトキシリンで染色した。

7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による抗CKB抗体の定量

PCD患者及びコントロール血清中の抗CKB抗体を定量するために、抗原タンパク質として精製ヒトCKBを用いたELISAを行った。96穴プレートに、PBSで10 μ g/mlに希釈したCKBタンパク質を50 μ lずつ滴下し、1時間イ

ンキュベートした。プレートを PBST で洗浄後、各ウェルに 100 μ l のブロッキング液(2%FBS in PBST)を加え 4℃で一晩静置した。プレートを PBST で洗浄し、ブロッキング液で 500 倍希釈した血清を 50 μ l ずつそれぞれのウェルに加え、1 時間インキュベートした。プレートを洗浄後、ブロッキング液で 5,000 倍に希釈した二次抗体 (HRP-conjugated anti-human Ig) を加え、30 分間反応させた。PBST で 5 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ活性を検出するため、0.04 mg/ml の OPD (σ -フェニレンジアミンジヒドロクロリド) ペルオキシダーゼ基質 (SIGMAFAST™ OPD, Sigma) をウェルに 100 μ l ずつ加えた。30 分反応させた後、450 nm の吸光度を EnVision™ 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer Japan Co., Ltd.)で測定した。OD 値の cut-off 値は次の式で算出した。

$$\text{Cut-off OD} = \text{mean average OD}_{450} (\text{of 28 control sera}) + 2 \text{ S.D.}$$

IV. 結果

1. PCD 患者血清中の抗神経抗体の検出

まず、本 PCD 患者血清中に PNS に関連した主要既知抗神経抗体が認められるかどうかを検討したが、主要既知抗神経抗体 (Yo, Hu, Ri, Tr, CV2, Ma1, Ma2, 及び、amphiphysin 抗体) は、本患者血清中には認められなかった。この結果は、新規の抗神経抗体が患者血清中に存在していることを強く示唆していた。そこで、膀胱癌を合併した本 PCD 患者血清中に小脳特異的に反応する自己抗体が存在することを示すために、マウス小脳及び肝臓から抽出した組織抽出液を用いて WB を行った。その結果、患者血清と特異的に強く反応する 45 kDa 付近のバンドが、小脳抽出液で認められた (図 1A)。このバンドは健常人コントロール血清においては認められなかった。以上の結果は、本 PCD 患者の血清中に新規抗神経抗体が存在し、小脳抽出液中の 45 kDa 付近のタンパク質がその抗原である可能性を示していた。

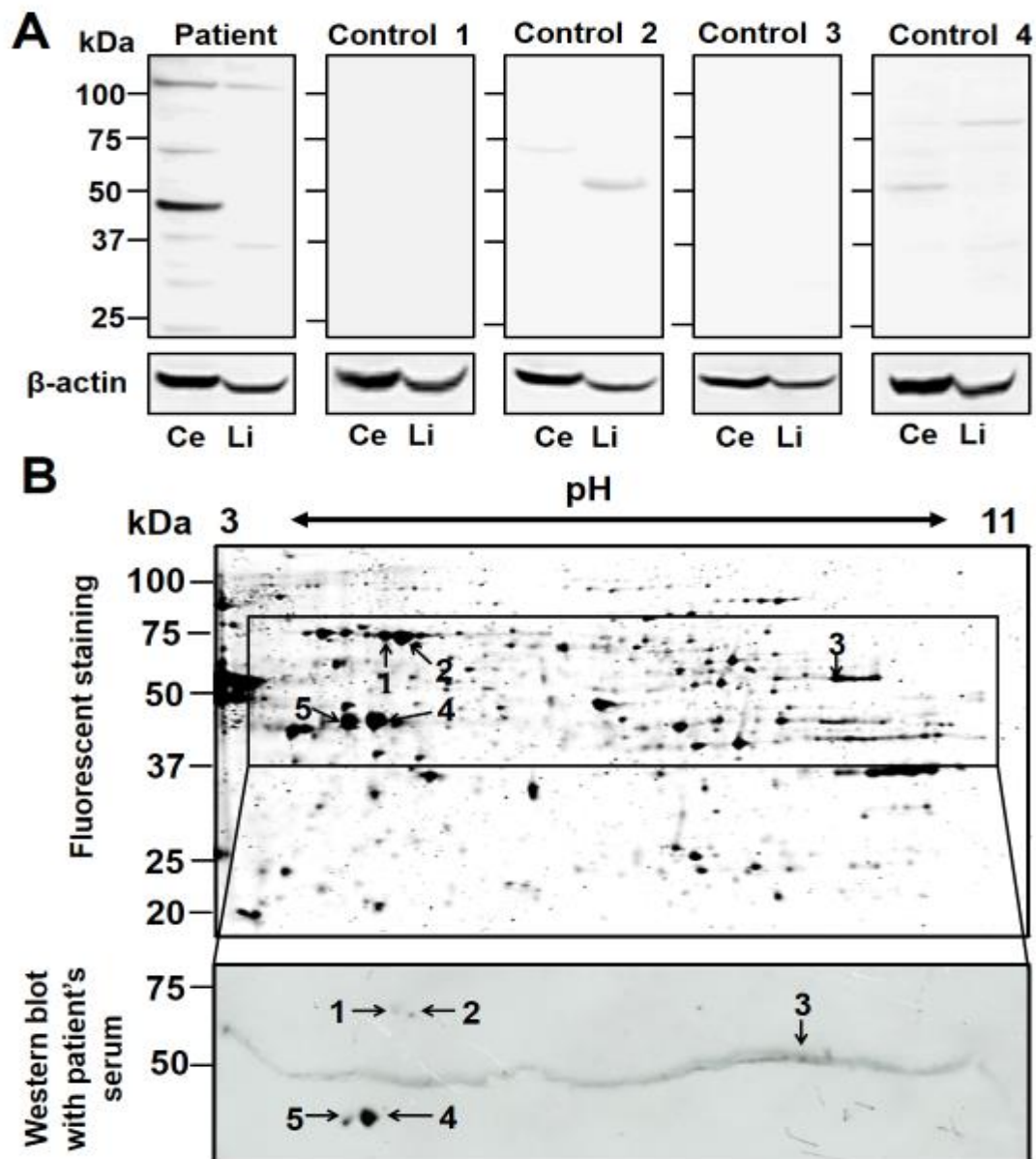


図 1. A. PCD 患者血清中の抗神経抗体の検出。患者血清及び健常人コントロール血清に反応するマウス小脳(Ce)及び肝臓タンパク質(Li)を WB (100 μ g/lane)で検出した。小脳タンパク質において、患者血清のみに強く反応する 45 kDa 付近のバンドが認められた。B. 2-DE による標的抗原タンパク質の分離。二次元展開されたマウス小脳タンパク質を Flamingo 蛍光染色した (upper panel)。WB で陽性と判定されたスポットと同一のスポットを 1 から 5 で示した。患者血清による WB (lower panel)。患者血清に反応する 5 つのスポットが WB で認められ、そのスポットを 1 から 5 で示した。1 から 5 に相当するスポットを蛍光染色したゲルから切り出し、MS 解析を行った。

2. プロテオーム解析による PCD 関連新規抗原の同定

本 PCD 患者血清に特異的に反応する 45 kDa 付近のタンパク質を同定するために、患者血清を用いて 2-DE 及び WB を行った。WB ではいくつかの弱い反応性を示すスポットと、1 つの強く反応するスポット (No.4) が認められた。MS 解析のために No.4 を含む計 5 箇所をゲルから切り出した (図 1B)。スポット No.4 及び 5 の分子量は、患者血清により一次元電気泳動による WB で検出された前述のバンドの分子量とほぼ一致していた (図 1A)。特にスポット No.4 は、患者血清と強く反応し、また分子量も近いことから新規抗原の可能性が強く示唆された。全てのスポット中のタンパク質に対して MS 解析を行い、タンパク質を同定した (表 3)。前述のスポット No.4 及び 5 は、同一タンパク質であり CKB と同定された。推定されるマウス CKB の pI 値は 5.40 で、分子量は 42,713.26 であり、2-DE の結果と非常に良く一致していた (ヒト CKB; pI 5.34, 分子量 42,644)。以上の結果から、CKB がこの患者血清中の自己抗体に認識される抗原である可能性が最も高いと考えた。

表 3. Protein identification by LC-MS/MS and MS/MS ion search by MASCOT

Spot number	Protein name	Protein (NCBI)	ID	Nominal Mass (Mr)	Calculated pI value	Score	Sequence Coverage
1	Serum albumin	NP_033784.2		70700	5.75	772	48%
2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component (E2)	NP_663589.3		68469	8.81	116	7%
3	Syntaxin-binding protein 1	NP_117041.1		67829	6.49	129	5%
4	Creatine kinase B-type	NP_067248.1		42971	5.40	366	29%
5	Creatine kinase B-type	NP_067248.1		42971	5.40	134	15%

Mr: molecular weight, pI: Isoelectric point, Mascot score probability based score used by MASCOT program.

3. PCD 患者血清及び髄液中の抗 CKB 抗体の検出

今回同定された抗 CKB 抗体が PCD 発症の原因であるかどうかを明らかにするために、更なる検討を加えた。患者血清が本当に CKB と反応するかどうかを確認するために、精製ヒト CKB 及びヒト CKM を用いて WB を行った。精製タンパク質 0.5 μ g を用いて、10% SDS-PAGE を行い、クマシーブルー(CBB)染色で狭雑タンパク質が含まれていないことを確認した(図 2A)。これらの精製標品を用いて抗 CKB 抗体(rabbit)による WB で CKB にのみ反応することを確認した(図 2A)。患者及びコントロール血清で同様に WB を行ったところ、患者血清だけが CKB と強く反応した(図 2B)。患者血清は、CKM とも弱く反応する様に見えたが、同様の反応性は他の健常人コントロール血清においても認められ(結果表示せず)、PCD 患者特異的ではなく、疾患とは関連性がないものと考えられた。コントロール血清では CKB と反応するものは一つも認められなかった。

次に、患者髄液にも抗 CKB 抗体が存在するかどうかを検討した。コントロールの脊髄小脳変性症(SCD)患者の髄液では、CKB とは全く反応しなかったが、PCD 患者髄液は、CKB と強く反応した(図 2C)。以上の結果は、本 PCD 患者の血清及び髄液中には CKB に対する自己抗体が産生されていることを示していた。しかし、同様に小脳症状を呈する SCD 疾患では CKB に対する抗体は出現していなかった。また、本 PCD 患者でのみで抗 CKB 抗体が髄液中にも特異的に出現していることが示された。この自己抗体が髄液に出現することにより PCD が発症した可能性が高くなった。

更に、本 PCD 患者血清中の抗 CKB 抗体の特異性を確認するために、GST-CKB 融合タンパク質を用いた抗体吸収試験を行った(図 2D)。患者血清と強く反応した 45 kDa マウス小脳タンパク質及び精製ヒト CKB への反応性は、GST-CKB 融合タンパク質による吸収処理後の患者血清で著しく減弱した。一方、GST のみによる吸収処理では、反応性の減弱は全く認められなかった。また、患者血清で認められた他のいくつかの弱いバンドへの反応性には変化が無く、45 kDa のマウス小脳タンパク質に特異的であった。以上の結果から、患者血清に反応した 45 kDa マウス小脳タンパク質は CKB であり、本 PCD 患者血清中には抗 CKB 抗体が存在すると結論付けられた。

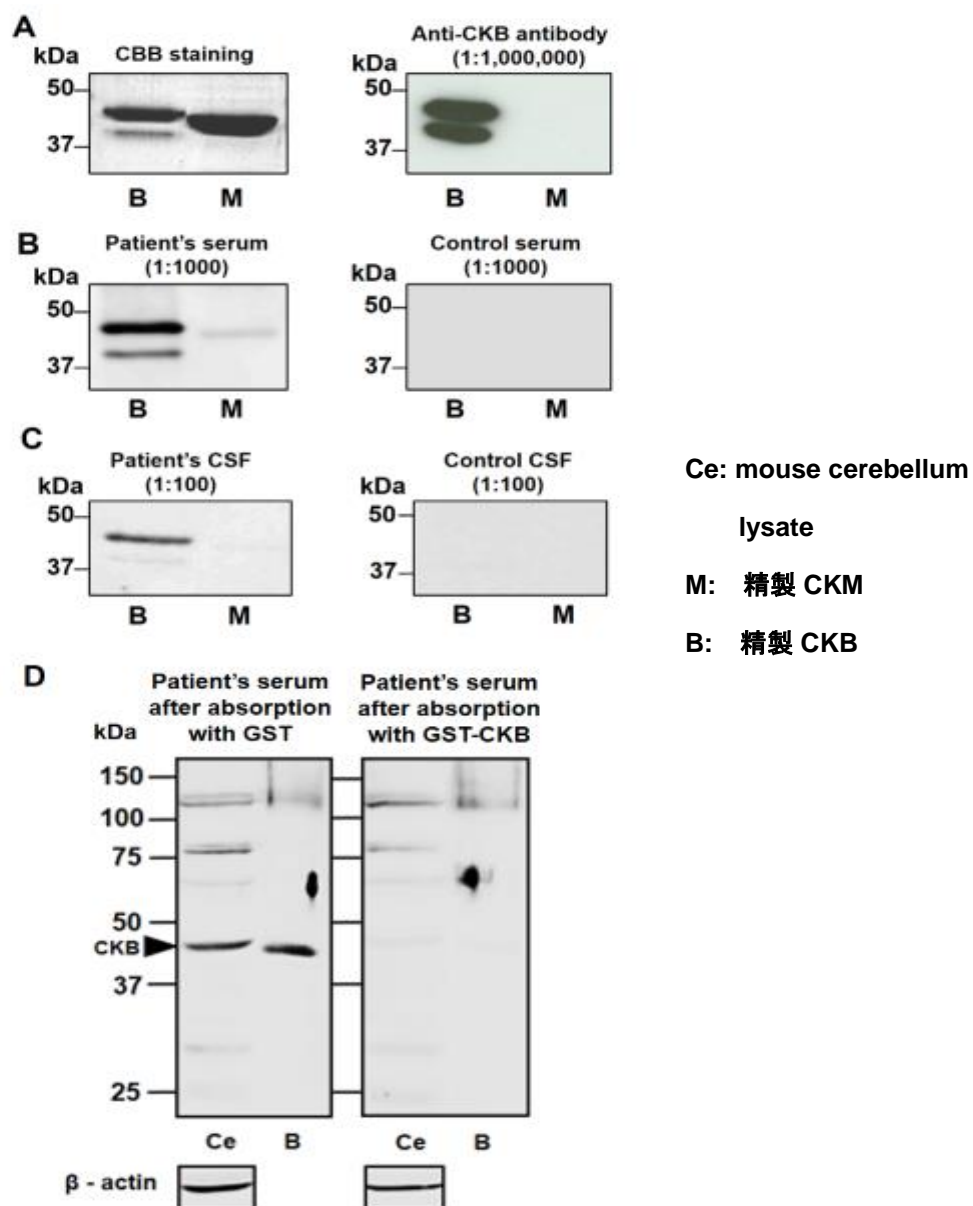


図 2. PCD 患者血清及び髄液中の抗 CKB 抗体の検出。WB にて、患者血清及び髄液中の抗 CKB 抗体を検出した。A. CBB 染色により精製タンパク質を確認した (左 panel)。市販の抗 CKB 抗体により CKB が特異的に認識されることを確認した (右 panel)。B. 患者血清及び健常人コントロール血清を用いて WB を行った。C. 患者髄液及びコントロール髄液を用いて WB を行った。D. PCD 患者血清に対する抗体吸収試験。マウス CKB と考えられる小脳タンパク質 (Ce) と精製 CKB タンパク質 (B) への反応性は、GST-CKB 融合タンパク質による抗体吸収処理後に著しく減弱した。小脳タンパク質を用いた場合は、インターナルコントロールとして β -アクチンを検出した。

4. 免疫組織染色によるマウス小脳及び膀胱癌組織における CKB 発現の検討

抗 CKB 抗体がマウス小脳組織を認識するかどうかを調べるために、免疫組織染色法を用いてマウス小脳における CKB の発現を検討した。抗 CKB 抗体によるマウス小脳の染色は、神経細胞全体に認められたが、特にプルキンエ細胞及び顆粒細胞層の細胞質で強く、CKB が発現していると考えられた(図 3A)。抗 HA 抗体を用いたコントロールの免疫染色では、強い染色性は認められず、抗 CKB 抗体による染色性が特異的であることが明らかになった(図 3B)。以上の結果は、抗 CKB 抗体を有する PCD 患者では、CKB を高発現するプルキンエ細胞などが自己抗体の標的となり、小脳症状が出現する可能性があると考えられた。

次に、本 PCD 患者の膀胱癌組織における CKB の発現の有無について検討した。抗 CKB 抗体を用いた免疫染色では、PCD 患者の膀胱癌組織が強く染色され、患者癌組織で CKB が高発現していることを示していた(図 3C)。癌組織における CKB の発現は不均一で、強く染色される箇所と染色性の弱い箇所が混在していた(図 3D)。癌の悪性化の過程で CKB の発現量が変化する可能性も考えられる。以上の結果より、CKB は本患者の癌組織及びマウス小脳の両方に発現しており、癌と神経の共通抗原であることが示された。

5. 膀胱癌(尿路上皮癌)組織における CKB の発現

膀胱癌(尿路上皮癌)組織において、どの程度の割合で CKB が発現しているのかを調べるために、ヒト膀胱癌(尿路上皮癌)組織アレイスライドを用いて免疫染色を行った。54 膀胱癌組織中 48 組織において強い CKB の発現を確認できたが、CKB の発現の強さ(レベル)と発現パターンは組織検体において様々であった(図 3E および 3F)。発現様式の違いは、癌の悪性度の違いなどに関係する可能性が考えられる。癌免疫の活性化により膀胱癌組織で発現する CKB により自己抗体が生産され、その自己抗体が CKB を正常に発現する小脳のプルキンエ細胞などの神経細胞を攻撃することによって PCD が発症したと考えられた。また、正常膀胱上皮では癌組織におけるような CKB の発現は認められなかった(0/10 組織)。

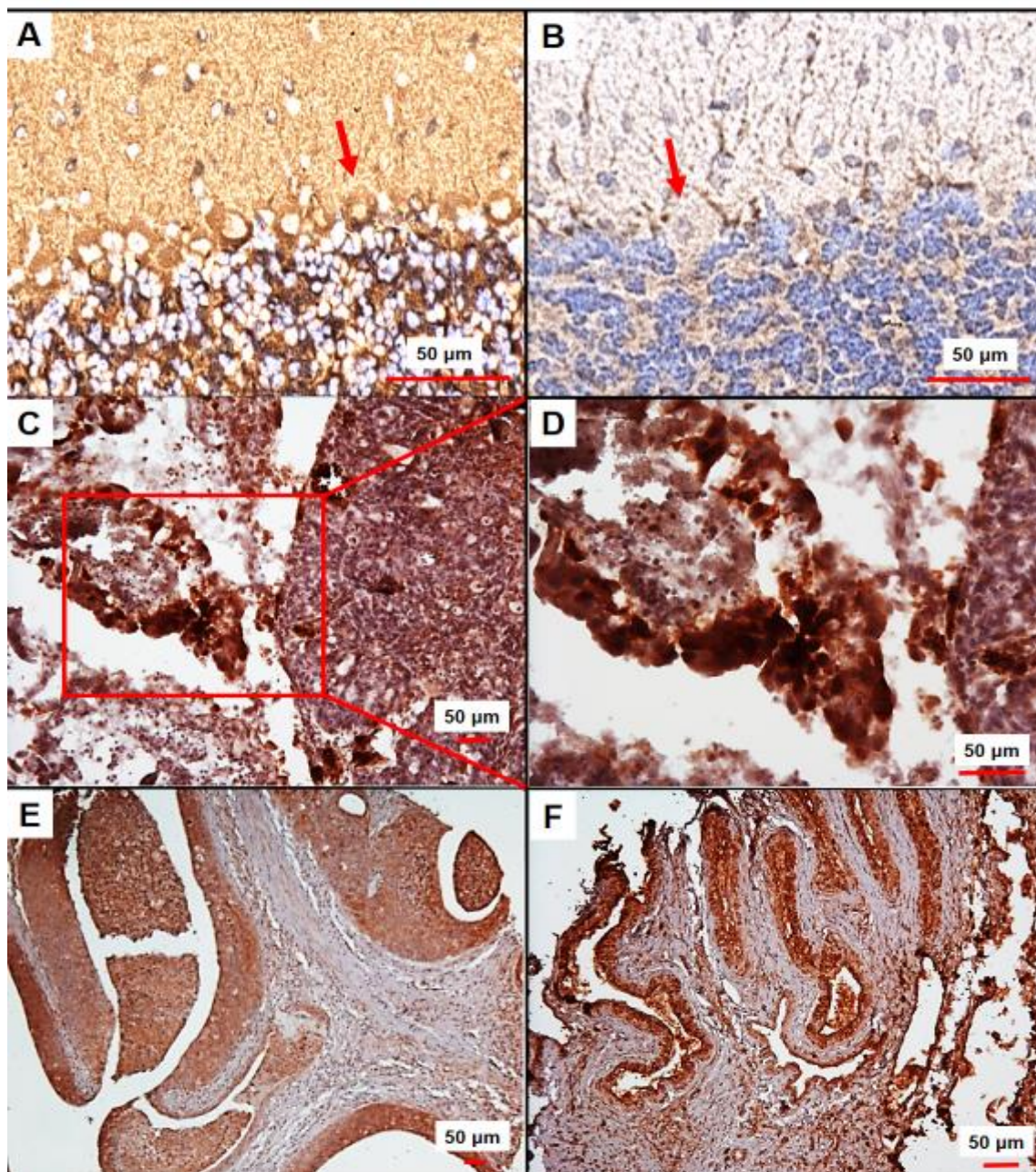


図 3. 免疫組織染色によるマウス小脳及びヒト膀胱癌組織における CKB の発現。A. マウス小脳組織において、抗 CKB 抗体による免疫染色にて CKB の発現が認められた。赤矢印で典型的なプルキンエ細胞を示した。B. 一方ネガティブコントロールの抗 HA 抗体では、ほとんど染色されなかった。C 及び D. 本 PCD 患者膀胱癌組織において、抗 CKB 抗体により CKB の発現が確かめられた。E 及び F. ヒト膀胱癌組織アレイにおいても、CKB の発現が認められた。54 組織中 48 組織で CKB 陽性である、その代表例を示した。A, B, 及び D; 200 倍、C 及び F; 100 倍、E; 40 倍。

6. 患者血清を用いたマウス小脳および膀胱癌組織の免疫染色

本 PCD 患者血清が、患者の膀胱癌組織及びマウス小脳と反応するのかどうかを、免疫組織染色法で検討した。患者血清においては、マウス小脳に反応し十分な染色が認められたが、健常人コントロール血清では反応せず、染色は認められなかった(図 4A および 4B)。マウス小脳における染色パターンは、抗 CKB 抗体による免疫染色パターンと同様にプルキンエ細胞が特に強く染色された。患者膀胱癌組織における免疫染色でも、同様の結果で、患者血清による染色は、抗 CKB 抗体による染色と類似していた(図 4E および 4F)。以上の結果より、患者血清も抗 CKB 抗体と同様に、小脳と膀胱癌組織両方で反応することが明らかとなった。

さらに患者血清中の抗 CKB 抗体と病態発症との関連を明らかにするために、GST 及び GST-CKB 融合タンパク質による吸収処理後の患者血清を用いて、マウス小脳組織の免疫染色を行った。GST のみで吸収処理された患者血清では、吸収処理されなかった患者血清と同様にマウス小脳組織が染色された(図 4C)。一方、GST-CKB 融合タンパク質で吸収処理された患者血清では、著しい染色性の低下を認めた(図 4D)。この染色性の低下は、プルキンエ細胞で顕著だった。以上の結果より、患者血清が CKB を高発現するマウス小脳組織の神経細胞（特にプルキンエ細胞）と強く反応することを示しており、患者血清中に存在する抗 CKB 抗体が PCD 発症の原因であることを強く示唆している。

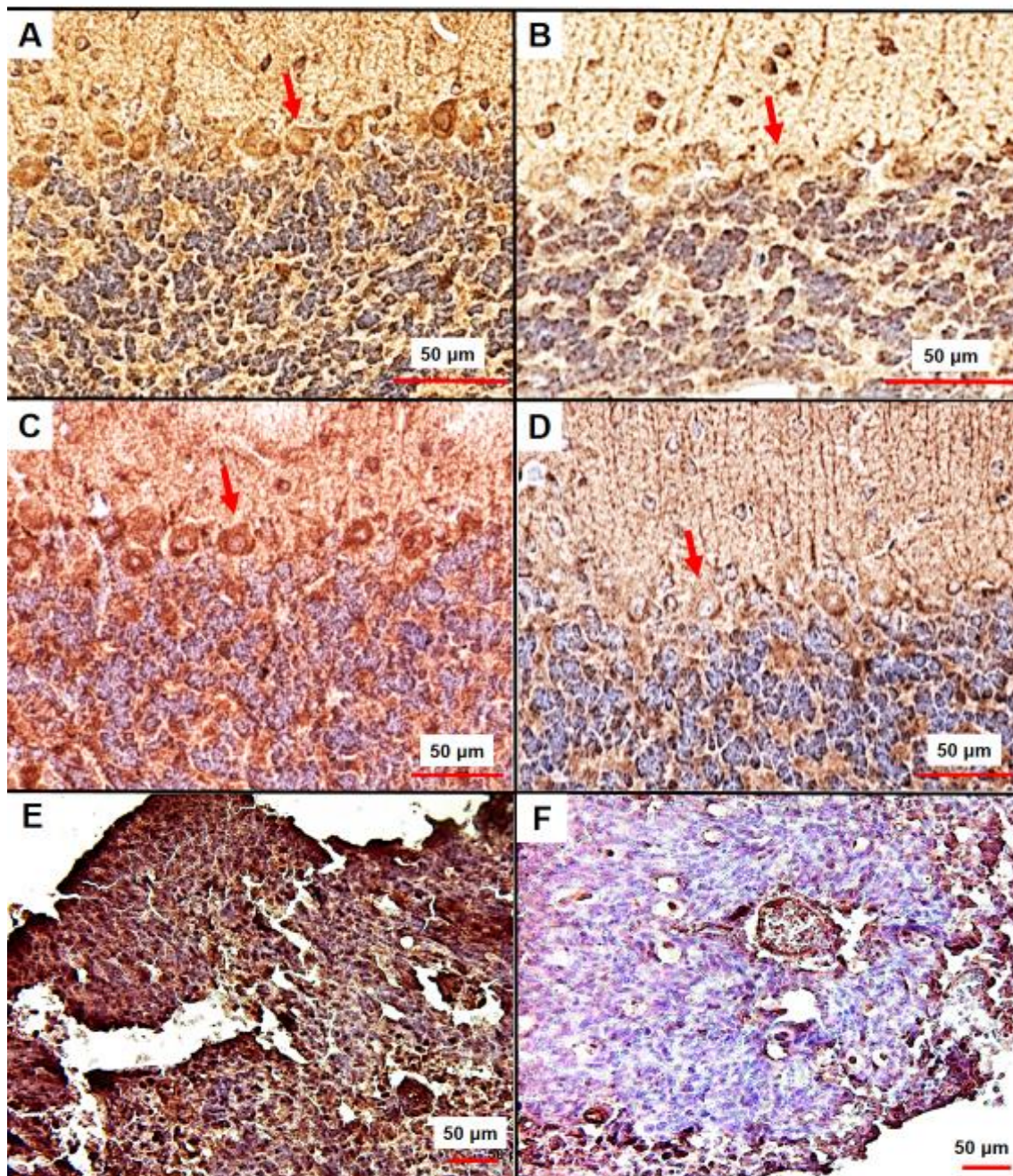


図 4. 患者血清及び健常人コントロール血清による免疫組織染色。患者血清による免疫染色では、抗 CKB 抗体による染色と同様にマウス小脳組織が染色されたが(A)、健常人コントロール血清では染色は認められなかった(B)。GST タンパク質による抗体吸収処理後の患者血清においては未処理患者血清と同様にマウス小脳組織が染色されたが(C)、GST-CKB 融合タンパク質による抗体吸収処理後の患者血清では染色性が著しく減少した(D)。赤矢印で典型的なプルキンエ細胞を示した。患者血清による患者膀胱癌組織の免疫染色は陽性であったが(E)、健常人コントロール血清による患者膀胱癌組織は染色されなかった(F)。A, B, C, and D; 200 倍。

7. マウス小脳以外の脳組織における抗 CKB 抗体及び患者血清による免疫反応

抗 CKB 抗体、患者血清、健常人コントロール血清を用いて、マウス小脳以外の脳組織における CKB の発現を検討した(図 5)。マウス脳全体の矢状断切片の抗 CKB 抗体による免疫染色では、海馬、大脳皮質、小脳を含めた脳全体に CKB の発現が認められた(図 5A)。一方、コントロール抗体では染色されず、染色が抗 CKB 抗体に特異的であることが確認された(図 5B)。また、患者血清による免疫染色でも、抗 CKB 抗体と同様の染色結果が得られた(図 5C)。健常人コントロール血清では、患者血清と比べ染色が全体的に弱く、また特異的な染色性も示さなかった(図 5D)。抗体吸収処理後の患者血清による免疫染色に関しては、GST のみで吸収処理された患者血清では、未処理の患者血清によるものと同様であったが、GST-CKB 融合タンパク質で吸収処理された患者血清では、健常人コントロール血清と類似した染色パターンを示した(図 5E および 5F)。

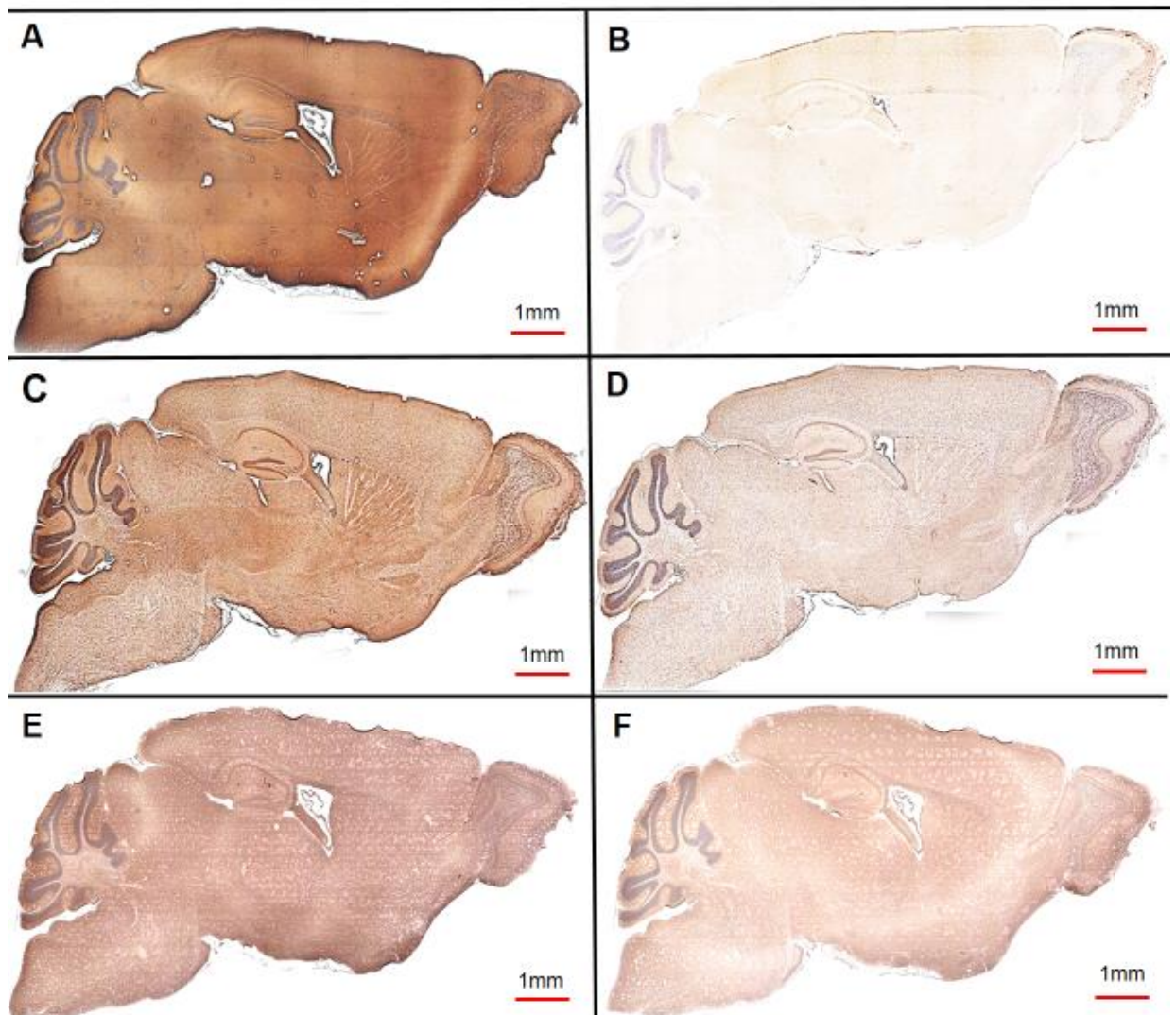


図 5. マウス脳矢状断における抗 CKB 抗体及び患者血清による免疫組織染色。A. 抗 CKB 抗体による免疫染色では、免疫反応が強く認められた。B. ネガティブコントロールの抗 HA 抗体による免疫染色では、染色は非常に弱かった。C. 患者血清による免疫染色においては、抗 CKB 抗体と同様の反応が認められた。D. 健常人コントロール血清による免疫染色においては、患者血清の場合と比較して、染色はかなり弱かった。E. GST タンパク質による抗体吸収処理後の患者血清による免疫染色では、患者血清同様の染色性が認められた。F. GST-CKB 融合タンパク質による抗体吸収処理後の患者血清による免疫染色では、染色性は著しく減少し、健常人コントロール血清による免疫染色の結果と類似していた。

次に、高倍率で細胞レベルでの染色パターンを比較した(図 6)。Jost et al.等により報告されたように、抗 CKB 抗体による免疫染色では大脳皮質及び海馬 CA3 領域における神経細胞の細胞質において強い染色性が認められた(図 6A および 6B)[48]。患者血清においても、同様に大脳皮質及び海馬の神経細胞が強く染色されたが、抗 CKB 抗体による免疫染色と異なり、細胞質だけではなく核周辺領域も染色された(図 6C および 6D)。健常人コントロール血清による免疫染色では、細胞質の染色は全く認められず、核周辺領域のみが染まっていた(図 6E および 6F)。従って、患者血清による細胞質の染色は、患者血清中に含まれる抗 CKB 抗体による可能性が考えられた。GST により吸収処理された患者血清の染色パターンは、未処理の患者血清による染色パターンとよく類似していた(図 6G および 6H)。一方、GST-CKB 融合タンパク質で吸収処理された患者血清による染色では、染色性が顕著に低下しており、健常人コントロール血清による免疫染色パターンと類似する結果を示した(図 6I および 6J)。

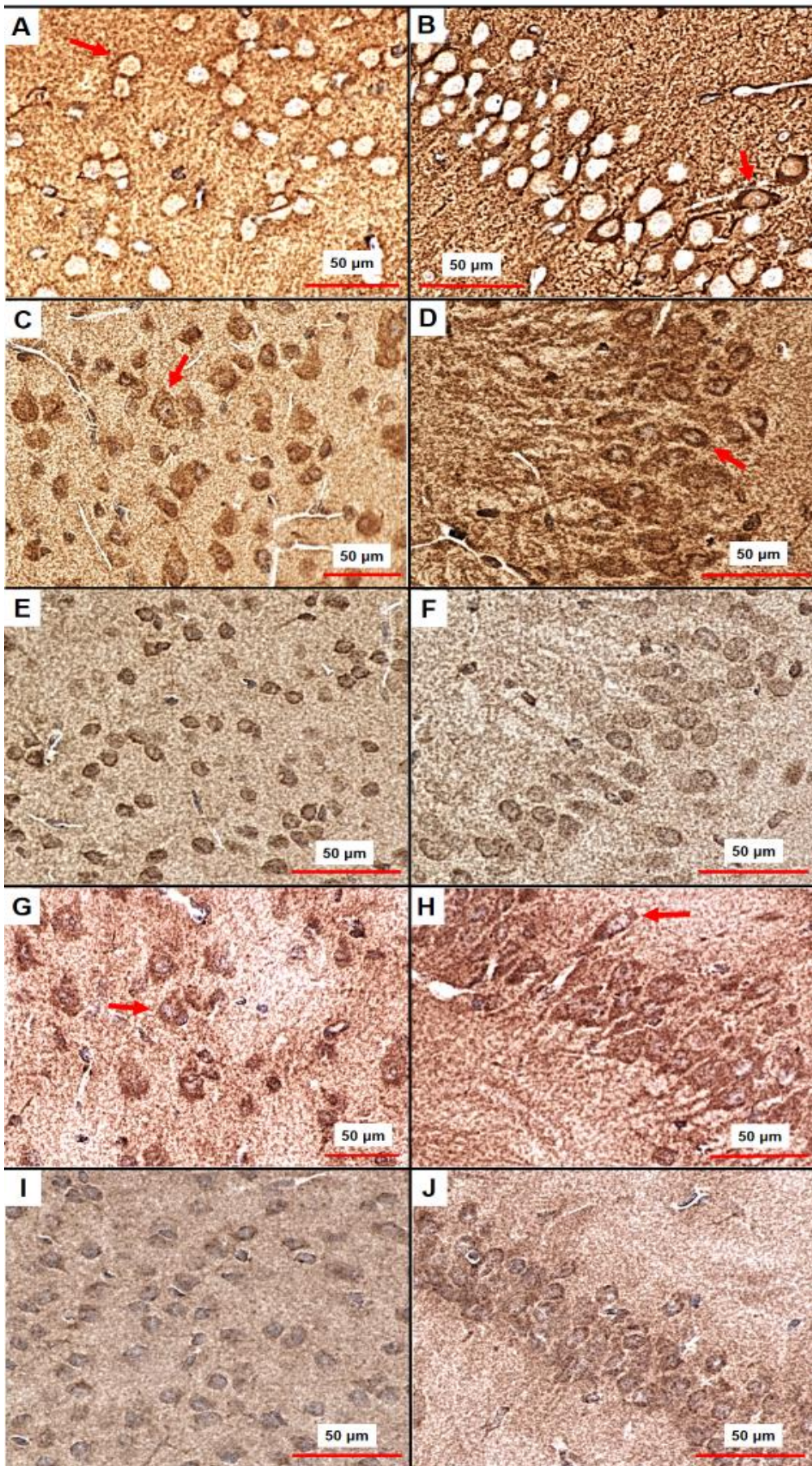


図 6. 高倍率によるマウス小脳以外の脳組織における CKB の発現検討。A および B. 大脳皮質 (A) 及び海馬 CA3 領域 (B) において、抗 CKB 抗体は神経細胞の細胞質を強く染色した。C および D. 患者血清においても、大脳皮質 (C) 及び海馬 (D) において同様の染色が認められた。E および F. 健常人コントロール血清による大脳皮質 (E) 及び海馬 (F) における免疫染色では、核周辺領域が弱く染色されたが、細胞質染色は認められなかった。G および H. GST タンパク質による抗体吸収処理後の大脳皮質 (G) 及び海馬 (H) における免疫染色。患者血清と同様に免疫染色された。I および J. GST-CKB 融合タンパク質による抗体吸収処理後の大脳皮質 (I) 及び海馬 (J) における免疫染色。健常人コントロール血清による免疫染色と同様に染色され、細胞質染色は著しく減少した。赤矢印で典型的な細胞質染色された細胞を示した。A, B, C, D, F, F, G, H, I, および J; 400 倍。

8. 他の PCD 患者血清を用いた抗 CKB 抗体の特異性についての検討

抗 CKB 抗体が他の PCD 患者血清中にも存在するかどうかを調べるために、前述の PNS の主要既知抗体 (Yo, Hu, Ri, Tr, CV2, Ma1, Ma2, and amphiphysin 抗体) が陰性であったこれまでに当院にて集積した 3 症例 (肺小細胞癌 SCLC 2 例 及び non-Hodgkin リンパ腫 1 例) の PCD 患者血清について、抗 CKB 抗体の有無について検討した。精製ヒト CKB を用いた WB で検討したところ、全ての患者血清に抗 CKB 抗体の存在が認められた (図 7A)。以上の結果は、抗 CKB 抗体が本 PCD 患者に特異的ではなく、より広く PCD 患者血清中に存在する可能性があること、また膀胱癌以外の癌を合併した PCD 患者においても抗 CKB 抗体が認められることから、PCD に関連する抗 CKB 抗体は膀胱癌特有の自己抗体ではないことを示していた。

抗 CKB 抗体が、PCD に特有の抗神経抗体であることを立証するために、PCD 以外の病因で小脳症状をきたした患者血清 (急性小脳炎 2、脊髄小脳変性症 14、小脳梗塞 2、オプソクローヌス・ミオクローヌス 1、進行性核上性麻痺 1) について精製ヒト CKB を用いた WB で同様に検討したところ、全ての血清において抗 CKB 抗体は認められなかった。従って、抗 CKB 抗体は小脳変性にともない産生される非特異的な抗神経抗体ではないことが示された (図 7B)。更に、抗 Yo 抗体陽性であった 3 症例の PCD 患者の血清についても、抗 CKB 抗体の有無を

確認したところ、抗体は認められなかった(図 7C)。以上の結果も、PCD と抗 CKB 抗体の特異性を強く示唆するものであると考えられる。

次に、5 症例の PCD を伴わない膀胱癌患者血清について同様に検討したが、5 例全ての血清で抗 CKB 抗体は認められなかった(図 7D)。以上の結果は、患者血清中の抗 CKB 抗体の産生は、PCD 発症と強い相関があり、PCD 発症の原因となる抗体である可能性を強く示している。

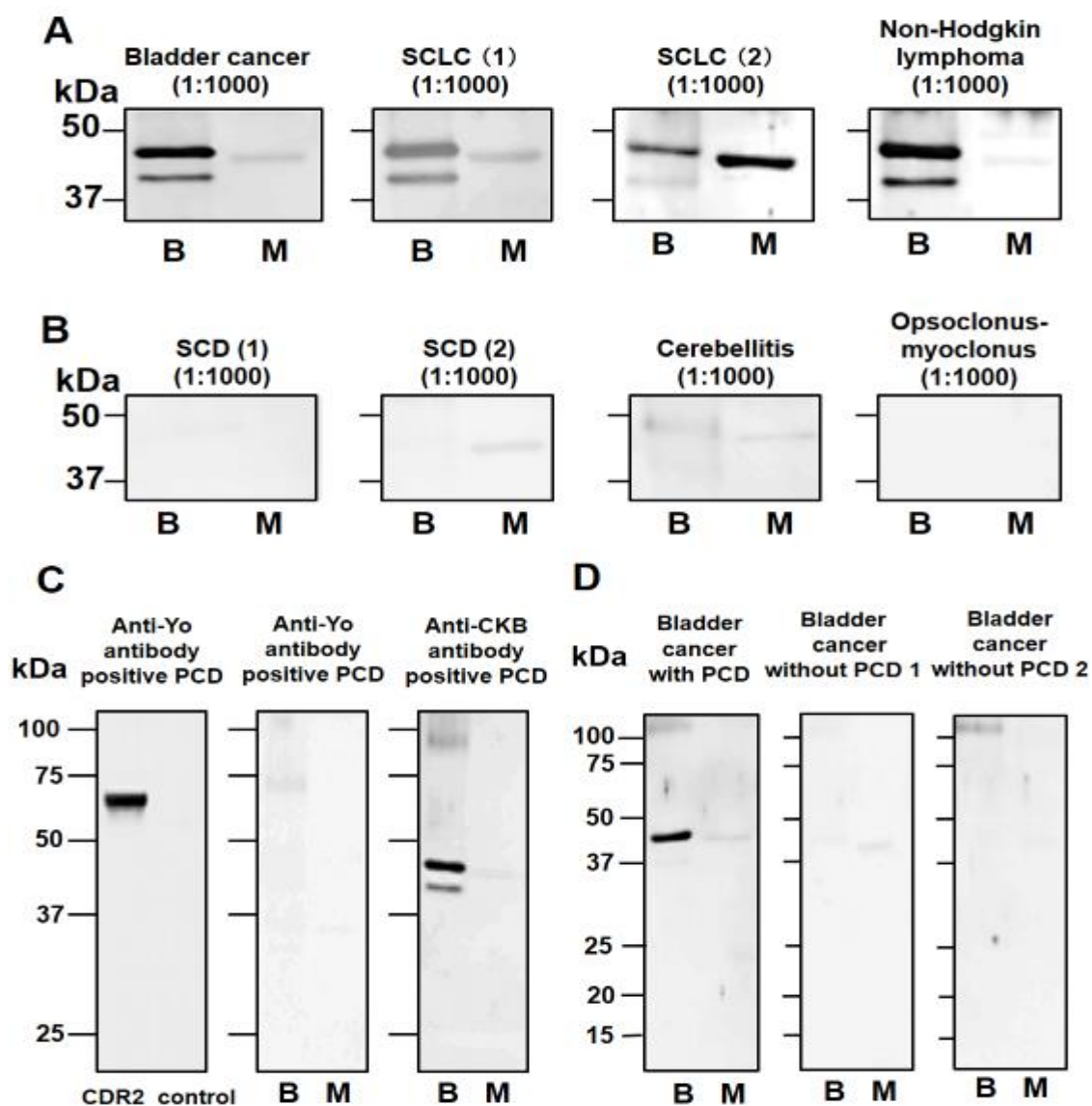


図7. PCD と抗 CKB 抗体の関連性についての検討。A. 主要抗神経抗体が陰性であった他の PCD 患者 3 症例（SCLC 2 及び non-Hodgkin リンパ腫 1）の血清による WB。B. 他の小脳症状を呈する疾患における患者血清による WB。C. HeLa 細胞にマウス CDR2 タンパク質を強制発現するベクターをトランスフェクションし、細胞抽出液を調整後、SDS-PAGE を施行した。Yo 抗体陽性 PCD 患者血清による WB では、62kDa の CDR2 が検出された(左 lane)。しかし、Yo 抗体陽性 PCD 患者血清では CKB および CKM を用いた WB では、バンドは認められなかった(中央 panel)。一方、抗 CKB 抗体陽性の PCD 患者血清では CKB バンドが検出された(右 panel)。D. 膀胱癌と抗 CKB 抗体の関連性。PCD を合併していない膀胱癌患者血清中には、抗 CKB 抗体は認められなかった。B: 精製ヒト CKB, M: 精製ヒト CKM。

9. ELISA 法による抗 CKB 抗体の検出・定量

患者及びコントロール血清中の抗 CKB 抗体価を定量するために、ELISA 法による抗体測定系を確立した。様々なグループの血清中の抗 CKB 抗体値を散布図にて示す(図 8)。WB により確認された抗 CKB 抗体陽性 PCD 患者血清中の抗 CKB 抗体価は、他のコントロール血清群と比較して有意に高いことが確かめられた($P < 0.05$, Mann-Whitney test)。今回確立された抗 CKB 抗体に対する ELISA 法は、自己抗体未知の PCD 患者血清のスクリーニングに有用であると考えられる。

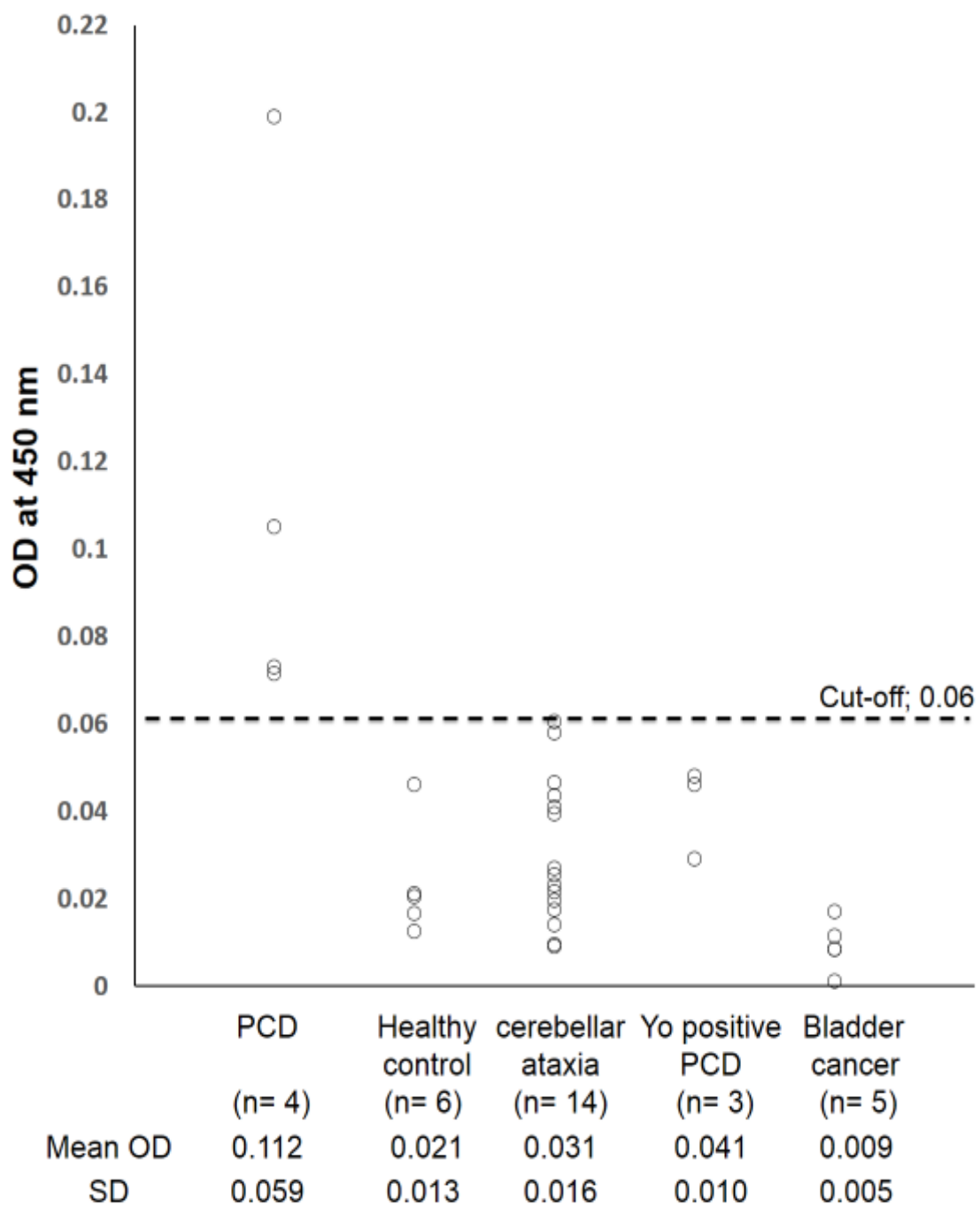


図 8. ELISA 法による抗 CKB 抗体の検出。それぞれの血清中の抗 CKB 抗体の抗体価を OD₄₅₀ 値で示した。Cut-off 値は、方法で示した計算式により 0.06 とした。

10. 免疫組織染色によるヒト小脳組織における CKB 発現の検討

抗 CKB 抗体によるヒト小脳組織の染色は、神経組織全体に認められたが、特にプルキンエ細胞の細胞質で強く、プルキンエ細胞で特に CKB が高発現していることが解った(図 9A, 9C および 9D)。一方、抗 HA 抗体を用いたコントロールの免疫染色では、染色はほとんど認められず、抗 CKB 抗体による染色が特異的であることが明らかとなった(図 9B)。マウス小脳ではプルキンエ細胞の細胞質だけでなく顆粒層の神経細胞質でも CKB の発現が認められたが、ヒト小脳の場合はプルキンエ細胞の細胞質でより強い CKB の発現が認められた。以上の結果は、抗 CKB 抗体を有する PCD 患者では、主に CKB を高発現するプルキンエ細胞が自己抗体の標的となり、小脳症状が出現する可能性を更に強く示すものであった。

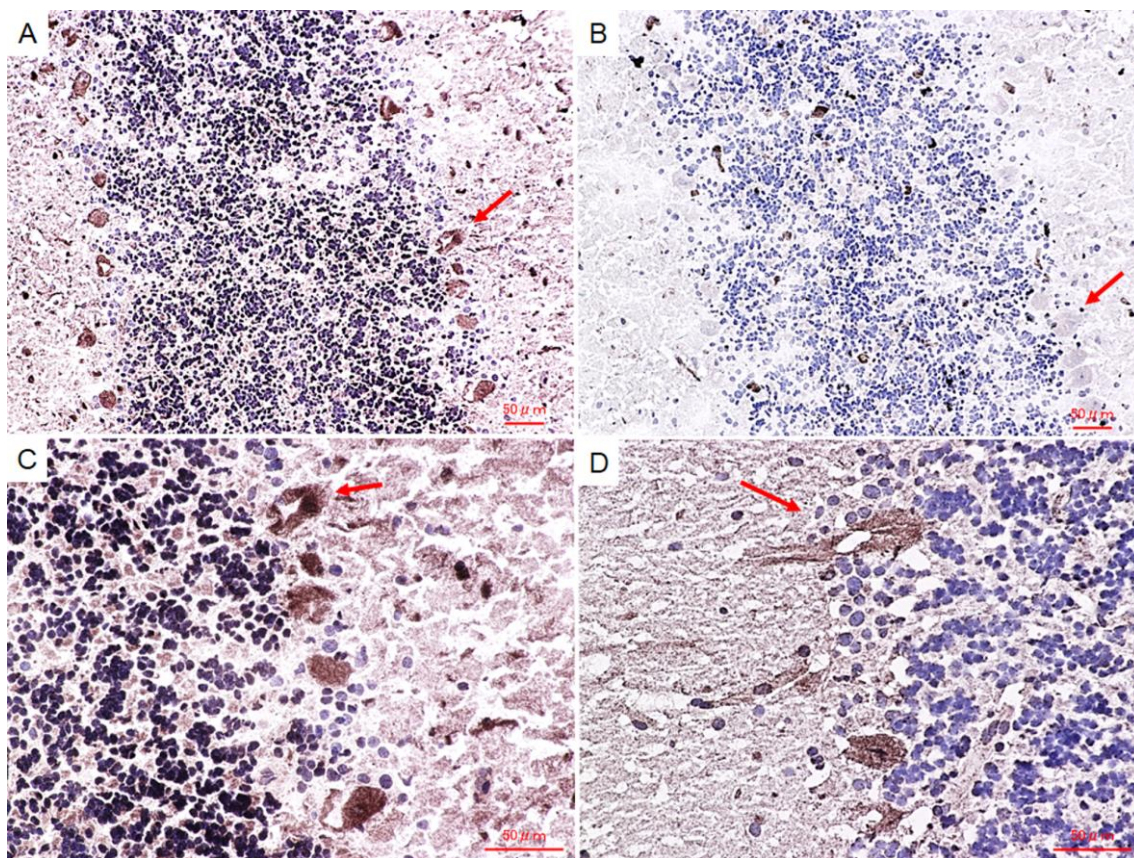


図 9. 免疫組織染色によるヒト小脳組織における CKB の発現検討。A, C および D. ヒト小脳組織を用いて抗 CKB 抗体による免疫染色を行った。プルキンエ細胞の細胞質で特に高い CKB の発現が認められた。B. ネガティブコントロールの抗 HA 抗体では、染色は認められなかった。赤矢印：典型的なプルキンエ細胞。A および B; 200 倍、C および D; 400 倍。

V. 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。以前、PNS のひとつである傍腫瘍性感覚性ニューロパチー患者血清において、抗 CKB 抗体の存在が報告された[49, 50]。しかしながら、この論文では CKB の発現が癌組織でも神経組織でも確認されていないこと、1 症例の報告であったことより、これまで CKB は PNS における神経抗原の候補としては、あまり認知されていなかった。膀胱癌に伴う PCD の報告は Ri 抗体陽性の 1 例のみであり、本症例では Ri 抗体は陰性であった[51]。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[52]。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 (1. 通常の免疫組織学的染色パターンとリコンビナント蛋白を抗原とする免疫ブロットの両方で特異性が確認できる、2. 腫瘍に関連した多数の症例報告がある、3. 抗体に関連して特徴的な神経症候がみられる、4. 異なる研究者間で抗体の同定がなされている等)のほとんどを満たしていた[46]。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[53, 54]。T 細胞による細胞性免疫システムが病態発症機序により重要であるという報告や[4, 16, 37, 38]、細胞内抗原を認識する Yo 抗体において、直接的にプルキンエ細胞に障害を与えていることを示唆する実験報告もなされている[40]。以上の様なこれまでの研究結果にも関わらず、細胞内抗原を認識する主要抗神経抗体の PNS 病態発症機序における役割は、未だ不明のままである。一方、PCD 患者において約 36%しか既知抗神経抗体が同定されないという疫学的結果を考慮すると[10]、新規抗神経抗体の同定は、病態発症機序の解明においても重要であると考えられる[3]。更に、PNS の治療には腫瘍そのものに対する治療法と自己免疫に対する治療法が推奨されているが、同様の神経免疫疾患の重症筋無力症のように治療方針が未だ定まっておらず、効果が定かではないものもある[55]。VGCC 抗体や VGKC 抗体陽性例など一部の例を除いて、PNS は副腎皮質ステロイド、血漿交換療法、免疫抑制薬、免疫グロブリン静注療法などの治療に反応せず、神経障害は一般に急速に進行する[56]。しかしながら、発症から 1 カ月以内の PCD では免疫グロブリン静注療法が有効との報告もあり[57]、また、癌の早期発見、早期治療につながる新たなマーカーとなる可能性もあるので、新規抗神経抗体のさらなる同定が期待される。また、本研究においては、前述の様にプロテオーム解析を用いて新規神経抗原を同定することができた。本手法が、今後未知の PCD 関連抗原を同定するのに有用であると考えられた。

クレアチンキナーゼ (CK) は骨格筋、心筋、脳、平滑筋などに多量に存在し、クレアチンリン酸+ADP ⇌ クレアチン+ATP を介してエネルギー代謝上極めて重要な役割を演じている。CK は、筋肉タイプ (M, muscle) 及び脳タイプ (B, brain) の 2 個のサブユニットが 2 量体を形成することにより構成されており、その組み合わせにより細胞質中に 3 つのアイソザイム (CK-MM, CK-MB, CK-BB) が存在する[58]。CKB は主に、脳及び神経組織において発現し、神経保護作用があるとされている[48]。マウス小脳においてはプルキンエ細胞及び顆粒層において CKB がより多く発現しているという Jost et al.らの報告があり[48]、

本研究においても同様の結果が得られた。また、ALLEN Mouse Brain Atlas における RNA プローブによる In situ hybridization(ISH) data においても、CKB mRNA がマウス小脳プルキンエ細胞において高発現しているのが認められる(図 10)。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傷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傷害されると、PCD 患者に深刻な小脳失調症状を呈してくるようになる[3]。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。

今回同定した抗 CKB 抗体は、膀胱癌の症例で同定した。膀胱癌における PCD 併発の例は稀で[51]、当初抗 CKB 抗体は膀胱癌に特有の自己抗体である可能性が考えられた。しかしながら、PCD を示さない複数の膀胱癌患者血清では抗 CKB 抗体が一般に認められないこと、多くの膀胱癌組織で CKB が高発現していることから、膀胱癌組織での CKB 発現レベルの上昇と抗 CKB 抗体の産生との間には何らかの Trigger となる因子の存在が考えられた。また、SCLC、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、悪性リンパ腫等において、CKB が高いレベルで発現しているという報告がこれまでになされている[59-65]。さらに本研究では、SCLC、悪性リンパ腫においても抗 CKB 抗体が出現する PCD 症例を報告した。これらの事実をふまえると、抗 CKB 抗体は、Yo 抗体や Hu 抗体と同様、主要な抗神経抗体に位置付けられる自己抗体となり得る可能性があると考えられる。

最近、CKB が上記の様な様々な癌において高発現しているという報告に加えて、癌細胞の増殖を促進しアポトーシスを抑制する働きがあることが示され、CKB を抑制することにより、癌細胞の増殖促進を抑制できるという報告が in vitro における実験において報告されている[66]。癌細胞の増殖における CKB の役割を究明する研究を更に進めることにより、PNS の研究とは別に、抗がん剤の開発といった CKB に関しての研究の新たな発展の可能性も考えられる。

本研究において、いくつかの異なったタイプの癌による PCD 患者に、抗 CKB 抗体が出現していることを示すことができた。従って、抗 CKB 抗体は PCD に関連した新規抗神経抗体である可能性が十分にあると考えられる。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。

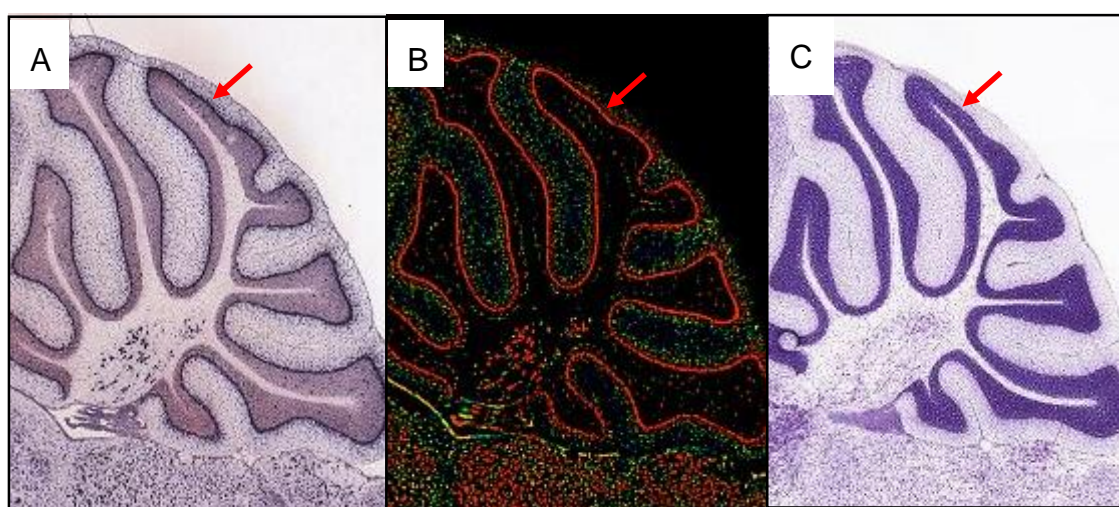


図 10. In situ hybridization によるマウス小脳における CKB mRNA の発現検出。CKB mRNA がマウス小脳プルキンエ細胞において高発現していることが解る。A. ISH (CKB mRNA の発現), B. CKB mRNA の発現強度。ヒートマップ法で発現強度が示されており、CKB mRNA が強く発現している所は赤色で示されている。C. Nissl 染色。矢印：プルキンエ細胞層。(ALLEN Mouse Brain Atlas より引用、<http://mouse.brain-map.org/experiment/show/393211>)

VI. まとめ

PCD で神経抗原に対する抗体が同定された症例は約 36%と低い。本研究では筆者が診断・治療した PCD 患者の自己抗体が認識する新規抗原を検索し、CKB と同定した。具体的には、まず膀胱癌を発症し PCD を併発した患者の血清、髄液及び膀胱癌組織を、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主要既知抗神経抗体は認められなかった。WB により、患者血清だけが特異的に認識する小脳タンパク質を検出した。LC-MS/MS 測定を施行し、新規抗原タンパク質として CKB (brain-type creatine kinase)を同定した。免疫組織染色にてマウス小脳、患者腫瘍組織及び、PCD をきたしていない膀胱癌組織切片に、CKB の発現を認めた。さらに主要既知抗神経抗体陰性であった PCD 患者他 3 例(肺小細胞癌 2 例、非ホジキンリンパ腫 1 例)の血清中においても抗 CKB 抗体が検出された。健常人 10 例、脊髄小脳変性症等の小脳失調をきたす疾患患者 20 例、Yo 抗体陽性 PCD 患者 3 例、PCD を伴わない膀胱癌組織を呈している患者 5 例の血清中には抗 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、PCD の小脳症状との関わりが推定された。一方で CKB は、悪性腫瘍における診断意義が高いとされている。通常成人の血中には存在しない CKB がある種の癌（乳癌・肺癌など）で血中に出現するとされている。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。

また、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った。今後、抗 CKB 抗体がどのよう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たいする研究が必要であると考えられた。

VII. 謝辞

本論文は筆者が自治医科大学大学院医学研究科地域医療学系 臨床神経学専攻科に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻科前教授 中野今治先生、准教授 藤本健一先生には担当指導教員として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、御指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。人間生物学系 生体分子医学専攻分野 分子生化学専攻科教授 遠藤仁司先生、准教授 富永薫先生には、研究指導協力教員として実験方法や研究に関する御助言を戴くとともに、本論文の細部にわたり御指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。地域医療学系 臨床神経学専攻科講師 森田光哉先生には、研究指導協力教員として御指導を戴きました。ここに感謝の意を表します。自治医科大学生化学講座機能生化学部門講師 黒岩憲二先生ならびに同部門研究補助員 太田恵理子氏には、本研究における実験手法や機器操作について御指導を戴きました。ここに感謝の意を表します。自治医科大学生化学講座機能生化学部門の各位には研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。

VIII. 参考文献

- [1] Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 349(16): 1543-54, 2003.
- [2] Seeger RC, Zeltzer PM, Rayner SA. Onco-neural antigen: a new neural differentiation antigen expressed by neuroblastoma, oat cell carcinoma, Wilms' tumor, and sarcoma cells. *J. Immunol* 122: 1548-1555, 1979.
- [3] Dalmau J, Rosenfeld MR. Paraneoplastic syndromes of the CNS. *Lancet Neurol* 7(4): 327-40, 2008.
- [4] Iorio R, Lennon VA. Neural antigen-specific autoimmune disorders. *Immunol Rev* 248(1): 104-21, 2012.
- [5] Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, Matà S, Kremens D, Vitaliani R, Geschwind MD, Bataller L, Kalb RG, Davis R, Graus F, Lynch DR, Balice-Gordon R, Dalmau J. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 65(4): 424-34, 2009.
- [6] Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterization of the antigen. *Lancet Neurol* 9(1): 67-76, 2010.
- [7] Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Kano T, Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, Sasaki H. Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J Neurol* 23, 2013, Epub ahead of print.
- [8] Giometto B, Grisold W, Vitaliani R, Graus F, Honnorat J, Bertolini G, Euronetwork P. N. S. Paraneoplastic neurologic syndrome in the PNS Euronetwork database: a European study from 20 centers. *Arch Neurol* 67(3): 330-5, 2010.

- [9] Croft PB, Wilkinson M. The incidence of carcinomatous neuromyopathy in patients with various types of carcinoma. *Brain* 88(3): 427-434, 1965.
- [10] Shams'ili S, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, Hooijkaas H, van der Holt B, Vecht C, Sillevius Smitt P. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain* 126(6): 1409-18, 2003.
- [11] Rojas I, Graus F, Keime-Guibert F, Reñé R, Delattre JY, Ramón JM, Dalmau J, Posner JB. Long-term clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *Neurology* 55(5): 713-5, 2000.
- [12] Greenlee JE, Brashear HR. Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol* 14(6): 609-613, 1983.
- [13] Sakai K, Mitchell DJ, Tsukamoto T, Steinman L. Isolation of a complementary DNA clone encoding an autoantigen recognized by an anti-neuronal cell antibody from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 28(5): 692-698, 1990.
- [14] Sakai K, Ogasawara T, Hirose G, Jaekle KA, Greenlee JE. Analysis of autoantibody binding to 52-kd paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen expressed in recombinant proteins. *Ann Neurol* 33(4): 373-380, 1993.
- [15] Sakai K, Kitagawa Y, Saiki S, Saiki M, Hirose G. Effect of a paraneoplastic cerebellar degeneration associated neural protein on B-myb promoter activity. *Neurobiol Dis* 15(3): 529-533, 2004.
- [16] Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 4(11): 1321-1324, 1998.
- [17] Graus F, Keime-Guibert F, Reñé R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 124(6): 1138-48, 2001.

- [18] Sakai K, Kitagawa Y, Saiki M, Saiki S, Hirose G. Binding of the ELAV-like protein in murine autoimmune T-cells to the nonameric AU-rich element in the 3' untranslated region of CD154 mRNA. *Mol Immunol* 39(14): 879-883, 2003.
- [19] Bataller L, Graus F, Saiz A, Vilchez JJ. Spanish Opsoclonus-Myoclonus Study Group, Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonusmyoclonus. *Brain* 124(2): 437-443, 2001.
- [20] Buckanovich RJ, Posner JB, Darnell RB. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11(4): 657-672, 1993.
- [21] Jensen KB, Dredge BK, Stefani G, Zhong R, Buckanovich RJ, Okano HJ, Yang YY, Darnell RB. Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* 25(2):359-371, 2000.
- [22] Buckanovich RJ, Yang YY, Darnell RB. The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies. *J Neurosci* 16(3): 1114-22, 1996.
- [23] Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, Ferrer I, Rene R, Marin C, Vecht CJ, Arbizu T, Targa C, Moll JW. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol* 74(1-2): 55-61, 1997.
- [24] de Graaff E, Maat P, Hulsenboom E, van den Berg R, van den Bent M, Demmers J, Lugtenburg PJ, Hoogenraad CC, Sillevius Smitt P. Identification of delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor as the Tr antigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 71(6): 815-24, 2012.
- [25] Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Benarroch EE, Lennon VA. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Ann Neurol* 49(2): 146-154, 2001.

- [26] Vernino S, Tuite P, Adler CH, Meschia JF, Boeve BF, Boasberg P, Parisi JE, Lennon VA. Paraneoplastic chorea associated with CRMP-5 neuronal antibody and lung carcinoma. *Ann Neurol* 51(5): 625-630, 2002.
- [27] Hotta A, Inatome R, Yuasa-Kawada J, Qin Q, Yamamura H, Yanagi S. Critical role of collapsin response mediator protein-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons. *Mol Biol Cell* 16(1): 32-9, 2005.
- [28] Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol* 50(3): 339-48, 2001.
- [29] Dalmau J, Graus F, Villarejo A, Posner JB, Blumenthal D, Thiessen B, Saiz A, Meneses P, Rosenfeld MR. Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. *Brain* 127(8):1831-844, 2004.
- [30] Pittock SJ, Lucchinetti CF, Parisi JE, Benarroch EE, Mokri B, Stephan CL, Kim KK, Kilimann MW, Lennon VA. Amphiphysin autoimmunity: paraneoplastic accompaniments. *Ann Neuro* 58(1): 96-107, 2005.
- [31] Sillevs Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Henzen-Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R. Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N Engl J Med* 342(1): 21-27, 2000.
- [32] Coesmans M, Smitt PA, Linden DJ, Shigemoto R, Hirano T, Yamakawa Y, van Alphen AM, Luo C, van der Geest JN, Kros JM, Gaillard CA, Frens MA, de Zeeuw CI. Mechanisms underlying cerebellar motor deficits due to mGluR1-autoantibodies. *Ann Neurol* 53(3): 325-336, 2003.
- [33] Fukuda T, Motomura M, Nakao Y, Shiraishi H, Yoshimura T, Iwanaga K, Tsujihata M, Eguchi K. Reduction of P/Q-type calcium channels in the postmortem cerebellum of paraneoplastic cerebellar degeneration

- with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 53(1): 21-28, 2003.
- [34] Manto MU, Laute MA, Aguera M, Rogemond V, Pandolfo M, Honnorat J. Effects of anti-glutamic acid decarboxylase antibodies associated with neurological diseases. *Ann Neurol* 61(6): 544-551, 2007.
- [35] Sommer C, Weishaupt A, Brinkhoff J, Biko L, Wessig C, Gold R, Toyka KV. Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet* 365(9468): 1406-1411, 2005.
- [36] Geis C, Grünewald B, Weishaupt A, Wulsch T, Toyka KV, Reif A, Sommer C. Human IgG directed against amphiphysin induces anxiety behavior in a rat model after intrathecal passive transfer. *J Neural Transm* 119(8):981-985, 2012.
- [37] Sutton IJ, Steele J, Savage CO, Winer JB, Young LS. An interferon- γ ELISPOT and immunohistochemical investigation of cytotoxic T lymphocytemediated tumour immunity in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *J Neuroimmunol* 150(1-2): 98-106, 2004.
- [38] Roberts WK, Deluca IJ, Thomas A, Fak J, Williams T, Buckley N, Dousmanis AG, Posner JB, Darnell RB. Patients with lung cancer and paraneoplastic Hu syndrome harbor HuD-specific type 2 CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 119(7): 2042-2051, 2009.
- [39] Tanaka K, Tanaka M, Onodera O, Igarashi S, Miyatake T, Tsuji S. Passive transfer and active immunization with the recombinant leucine-zipper (Yo) protein as an attempt to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neurol Sci* 127(2): 153-8, 1994.
- [40] Greenlee JE, Clawson SA, Hill KE, Wood BL, Tsunoda I, Carlson NG. Purkinje cell death after uptake of anti-Yo antibodies in cerebellar slice cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(10): 997-1007, 2010.

- [41] Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, James G, Krueger JG. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B / ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest* 90(3): 1067-1076, 1992.
- [42] Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 442(6928): 226-232, 2003.
- [43] Humphrey-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 18(8): 1217-42, 1997.
- [44] Appella E, Arnott D, Sakaguchi K, Wirth PJ. Proteome mapping by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in combination with mass spectrometric protein sequence analysis. *EXS* 88: 1-27, 2000.
- [45] 青島健. プロテオミクス総論. *Cognition and Dementia* 3: 217-231, 2004.
- [46] Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler Ch, Verschuuren JJ, Vincent A, Voltz R. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(8): 1135-40. 2004.
- [47] Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 83(10): 5137-47, 2009.
- [48] Jost CR, Van Der Zee CE, In 't Zandt HJ, Oerlemans F, Verheij M, Streijger F, Fransen J, Heerschap A, Cools AR, Wieringa B. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. *Eur J Neurosci* 15(10):1692-706, 2002.
- [49] Arawaka S, Kato T, Kurita K, Daimon M, Matsumoto N, Sasaki H. A novel autoantibody in paraneoplastic sensory-dominant neuropathy.

- Neuropathology* 17: 89-93, 1997.
- [50] Arawaka S, Daimon M, Sasaki H, Suzuki JI, Kato T. A novel autoantibody in paraneoplastic sensory-dominant neuropathy reacts with brain-type creatine kinase. *Int J Mol Med* 1(1): 597-600, 1998.
 - [51] Prestigiacomo CJ, Balmaceda C, Dalmau J. Anti-Ri-associated paraneoplastic opsoclonus-ataxia syndrome in a man with transitional cell carcinoma. *Cancer* 91(8): 1423-1428, 2001.
 - [52] Graus F, Saiz A, Dalmau J. Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS. *J Neurol* 257(4):509-17, 2010.
 - [53] Graus F, Illa I, Agusti M, Ribalta T, Cruz-Sanchez F, Juarez C. Effect of intraventricular injection of an anti-Purkinje cell antibody (anti-Yo) in a guinea pig model. *J Neurol Sci* 106(1): 82-7, 1991.
 - [54] Sillevs Smitt PA, Manley GT, Posner JB. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology* 45(10): 1873-8, 1995.
 - [55] Tetsuka S, Fujimoto K, Ikeguchi K. Preoperative high-dose steroid has long-term beneficial effects for myasthenia gravis. *Neurol Res Int* 709480: 7pages, 2013, e - published.
 - [56] 田中恵子. 抗プルキンエ細胞質抗体(抗 Yo 抗体). *日本臨* 68: 526-529, 2010.
 - [57] Widdess-Walsh P, Tavee JO, Schuele S, Stevens GH. Response to intravenous immunoglobulin in anti-Yo associated paraneoplastic cerebellar degeneration: case report and review of the literature. *J Neurooncol* 63(2): 187-190, 2003.
 - [58] Bessman SP, Carpenter CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 54: 831-62, 1985.
 - [59] Carney DN, Zweig MH, Ihde DC, Cohen MH, Makuch RW, Gazdar AF. Elevated serum creatine kinase BB levels in patients with small cell lung cancer. *Cancer Res* 44(11): 5399-403, 1984.
 - [60] Nikliński J, Furman M, Laudański J, Pałynyczko Z, Welk M. Evaluation

- of carcinoembryonic antigen (CEA) and brain-type creatine kinase (CK-BB) in serum from patients with carcinoma of the lung. *Neoplasma* 38(2): 129-35, 1991.
- [61] Nikliński J, Furman M, Palynyczko Z, Laudański J, Bułatowicz J. Carcinoembryonic antigen, neuron-specific enolase and creatine kinase-BB as tumor markers for carcinoma of the lung. *Neoplasma* 38(6): 645-51, 1991.
- [62] Zarghami N, Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJ. Quantification of creatine kinase BB isoenzyme in tumor cytosols and serum with an ultrasensitive time-resolved immunofluorometric technique. *Clin Biochem* 28(3): 243-53, 1995.
- [63] Zarghami N, Giai M, Yu H, Roagna R, Ponzzone R, Katsaros D, Sismondi P, Diamandis EP. Creatine kinase BB isoenzyme levels in tumour cytosols and survival of breast cancer patients. *Br J Cancer* 73(3): 386-90, 1996.
- [64] Huddleston HG, Wong KK, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC. Clinical applications of microarray technology: creatine kinase B is an up-regulated gene in epithelial ovarian cancer and shows promise as a serum marker. *Gynecol Oncol* 96(1): 77-83, 2005.
- [65] Ishikawa J, Taniguchi T, Takeshita A, Maekawa M. Increased creatine kinase BB activity and CKB mRNA expression in patients with hematologic disorders: relation to methylation status of the CKB promoter. *Clin Chim Acta* 361(1-2): 135-40, 2005.
- [66] Li XH, Chen XJ, Ou WB, Zhang Q, Lv ZR, Zhan Y, et al. Knockdown of creatine kinase B inhibits ovarian cancer progression by decreasing glycolysis. *Int J Biochem Cell Biol* 45(5): 979-86, 2013.