

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08984

研究課題名(和文) C型肝炎におけるクリオグロブリンの生成機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cryoglobulin formation in hepatitis C

研究代表者

四柳 宏 (Yotsuyanagi, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30251234

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)：クリオグロブリン血症を合併し、抗HCV療法によりHCVの排除された患者におけるクリオグロブリンの構成成分を決定した。クリオプレシピテート及びクリオプレシピテート分離後の血清から精製した抗体プロフィールを比較して前者に濃縮されている抗体3種類の同定を行なった。うち2種類は自己抗体であり、HCVとの交差反応性を有していた。これらの自己抗体が共通して認識する自己抗原候補としてPAFAH1B3を含むいくつかのヒトタンパク質が見出された。また、クリオプレシピテート採取時に同時に採取した末梢血検体からRNAを抽出し、次世代シーケンサーにより患者固有の抗体シーケンズレパートリーを取得することができた。

研究成果の概要(英文)：The component of cryoglobulin was determined in a patient with chronic hepatitis C who underwent antiviral treatment and cleared HCV RNA. Three types of antibodies concentrated in the cryoprecipitate were identified by comparing antibody profiles purified from cryoprecipitate and serum. Two of the three antibodies were autoantibodies and had cross-reactivity with HCV. Several human proteins including PAFAH1B3 were found as candidates for autoantigens. Total RNA extracted from peripheral blood specimens showed a patient-specific antibody sequence repertoire.

研究分野：消化器内科学

キーワード：クリオグロブリン 自己抗原 自己抗体 C型肝炎

1. 研究開始当初の背景

クリオグロブリンとは、体温未満の温度で析出し、37℃の加温で再溶解する免疫グロブリン(Ig)と定義される。クリオグロブリンはHCV感染症のおよそ50%で認められ、特に混合型の92%でみられたとの報告もある。HCVのCoreタンパクとこれに対するIgG抗体によって形成された微小免疫複合体が、変性IgGに対するリウマトイド因子活性を有するIgM抗体によって架橋されることで巨大免疫複合体となり、タンパク同士の電荷的な相互作用の結果として複合体全体の親水性が低下するために冷却によって容易に析出するようになることがわかっているが、自己抗原とそれに対する自己抗体は同定されていない。

2. 研究の目的

今回、クリオグロブリン血症を合併したC型慢性肝炎患者からクリオプレシピテートを分離し、この点について検討した。

3. 研究の方法

クリオプレシピテート及びクリオプレシピテート分離後の血清からプロテインGを用いてIgGを精製した。パepsin消化により可変部を分離精製した後、ラジオアイソトープ標識を行い、液相クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS)にかけてタンパクのスペクトラムを取得した。

4. 研究成果

iTRAQ ラジオアイソトープ標識タグの強度から相対定量を行い、クリオプレシピテート側に優位に濃縮されている抗体として UT1.1、UT1.2、UT1.3の3種類が同定できた(図1)。

このうち UT1.1 と UT1.3 は交叉反応性を有する自己抗体である可能性が強く疑われた。一方の UT1.2 は比較的短い CDR3 配列を有しており、CP 中に含まれるなんらかの抗原に特異的に結合する抗体と予想された。これらの抗体(UT1.1、UT1.2、UT1.3)はいずれも HCV 抗原への反応性を有することがわかった。

ID	CDR3 amino acids
UT1.1	ARSGVDIAVISAAALHLEGDY <del>YYY</del> VDV
UT1.2	ARDGYNFV <del>PF</del> DY
UT1.3	ARNRDAV <del>FGW</del> SDNYMDV

V <sub>H</sub> germline V & J genes (Identities)	
IGHV3-21*04 (77.8%)	IGHJ6*03 (77.4%)
IGHV3-23*01 (94.1%)	IGHJ4*02 (87.2%)
IGHV1-69*01 (93.4%)	IGHJ6*03 (77.4%)
	IGHJ4*02 (83.0%)

Peptide hits (PEPs)
GTTIIVSSASTK (1.68e-50)
EVQIIESGGGIAQPGGSIR (5.77e-33)
TDYADSVK (1.46e-39)
NTIYIEMNSIR (0.039)
QVRIVQSGAEVK (2.64e-48)
IVQSGAEVK (9.71e-192)
IVQSGAEVKK (1.57e-5)

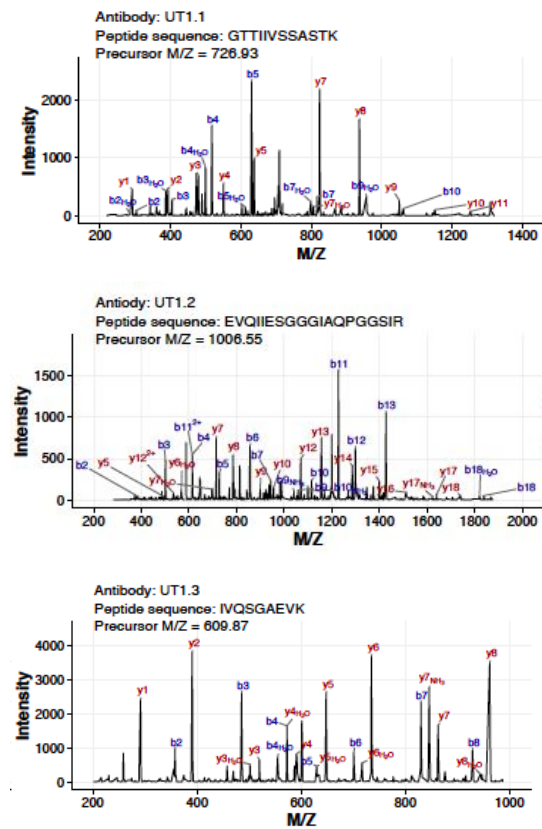


図1 患者血清から冷却により分離された免疫複合体への濃縮率の高かった3種類の自己抗体

さらに、ヒトプロテオームマイクロアレイを用いた網羅的検討から、これらの自己抗体が共通して認識する自己抗原候補として PAFAH1B3 を含むいくつかのヒトタンパク質が見出された。

また、クリオプレシピテート採取時に同時に採取した末梢血検体から Total RNA を抽出し、IgG, IgK, IgL (IgK と IgL は抗体軽鎖、IgG は抗体重鎖に相当する) の可変部領域の塩基配列を 5' -RACE 法により増幅し、次世代シーケンサー (Roche GS FLX+システム) を用いて患者固有の抗体シーケンズレパートリーを取得することができた。

この患者は標準治療であるダクラタスビル+アスナプレビル併用療法を受け、ウイルス排除に成功し、クリオグロブリンも消失した。治療後に関しても血清及び全血の採取を行い抗体シーケンズレパートリーに生じる変化について、分子系統樹から解析した。

治療前後でアミノ酸配列は大きく入れ替わっており、クリオグロブリンの消失に伴い、対応抗原に対する抗体が大きく減少したことに合致する結果である。

また、CDR3 配列類似性ネットワーク解析により、同定された 3 種類の自己抗体を含む一群の病的自己抗体クラスターが、抗ウイルス療法による HCV 除去に伴って経時的に消失することを見出した (図 2)。

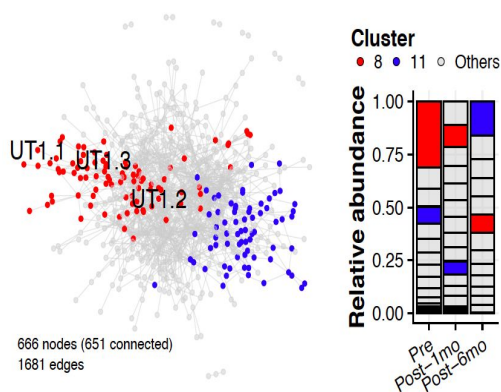


図 2 治療前後における自己抗体レパートアの変化

これらの結果は、CHC により産生が促進される自己抗体の HCV-CG における病的意義を示唆している。臨床検体から直接病的抗体を単離する本手法は、原理的には多彩な免疫疾患に応用可能である。

## 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 1 件)

Ogishi M, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K.

Delineation of autoantibody repertoire through differential proteogenomics in hepatitis C virus-induced cryoglobulinemia. Scientific reports 2017;6:1-10.

[学会発表](計 1 件)

Yotsuyanagi H, Ogishi M, Moriya K, Koike K.

Delineation of autoantibody repertoire through differential proteogenomics in HCV-induced cryoglobulinemia. 2017; Asia Pacific Digestive Week (APDW) Innovative Approaches to Gastroenterology. Kobe.

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

四柳 宏 (Yotsuyanagi, Hiroshi)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：30251234

(2)研究分担者

堤 武也 (Tsutsumi, Takeya)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：00726739

(3)連携研究者

( )  
研究者番号：

(4)研究協力者

( )