

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10890

研究課題名(和文) 自己免疫網膜症の分子解析とバイオマーカー探索による新しい診断法の開発

研究課題名(英文) Molecular analysis and discovery of a new biomarker for autoimmune retinopathy

研究代表者

菊池 孝信 (KIKUCHI, TAKANOBU)

信州大学・基盤研究支援センター・教授

研究者番号：50177797

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)：本研究計画の目的は、自己免疫網膜症患者血清が認識する網膜特異抗原タンパク質をプロテオーム解析法により網羅的に同定し、その発症機構を分子レベルで解明することにある。また、同定された抗原タンパク質に対する患者血清中の抗体価の変動と病態変化について検討し、バイオマーカーとしての有用性を検証する。

現在までに、既知の抗原タンパクを含め13個の抗原タンパク質をクローニングした。105例の患者血清についてこれらの抗原タンパク質との反応性を検討した。7例以上の患者血清が認識する6種類の抗原蛋白(既知の抗原を含め)を見出し、エピトープ解析のために、抗原タンパクの欠失変異体を作製している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the clinical and immunological characterization of autoimmune retinopathy (AIR) and to determine the retinal autoantigens recognized by sera of AIR patients. Serum samples obtained from 105 AIR patients were analyzed by Western blot and immunohistochemistry. We reported that AIR was associated with a variety of autoantibodies and the OCT and IHC findings showed some correlation. The 13 cDNA clones of retinal autoantigens were isolated from human retinal cDNA library by PCR and inserted into expression vector of E. coli. The recombinant proteins of retinal antigens were purified by affinity chromatography. The sera of AIR patients were examined reactivity against the recombinant proteins by WB analysis. We found that 6 retinal autoantigens were recognized with more than 7 sera from AIR patients. The retinal antigens may be a potential biomarker for diagnosis of AIR. Further investigations of the pathology associated with AIR are needed.

研究分野：眼科学

キーワード：自己免疫性網膜症 癌関連網膜症

1. 研究開始当初の背景

自己免疫網膜症 (AIR) の一つである癌関連網膜症 (CAR) は原発の悪性腫瘍の直接の浸潤や転移がないにもかかわらず、その遠隔作用により網膜の変性をきたす稀な症候群であることが 1976 年に初めて報告された (文献)。1982 年には患者血清中に網膜特異抗原を認識する自己抗体の存在が示唆され、自己免疫機構の関与が明らかとなった (文献)。1997 年には非腫瘍型自己免疫網膜症 (npAIR) の症例が報告され、AIR という用語が広く使われるようになった (文献)。しかし、その病態についてはその詳細は明らかになっていないのが現状である。ARVO の免疫グループの会議では網膜電位図 (ERG) とウエスタンブロット (WB) の結果で診断した AIR 患者に対して免疫抑制剤の投与試験の結果が報告され、その効果にかなりのばらつきがあることから診断基準の策定の必要性が議論されたが、現在までのところ診断基準は明確になっていない (文献)。

我々は過去 15 年間 CAR 患者血清が認識する網膜特異抗原遺伝子の同定とその遺伝子の網膜における生理機能について分子生物学、細胞生物学や組織形態学的研究を行ってきた (文献)。従来の ERG および生化学的検査 (WB と免疫組織化学) 等と高精度光干渉断層計 (SD-OCT) による患者網膜の詳細な形態学的観察と組み合わせることで総合的に診断することが自己免疫網膜症の確定診断において大変有用であることを報告した (文献)。

2. 研究の目的

本研究課題では、1) 患者血清が認識する網膜特異抗原タンパクを単離・同定し、2) その抗原タンパクの生理機能の解析、および 3) 網膜特異抗原に対する自己抗体が網膜組織・視機能に与える障害の有無・程度について電気生理学および組織形態学的な解析を行い、発症機構および病態を分子レベルで解明すること。また、これらの検討から得られる知見や経験をもとに、AIR に関する新しい診断法の確立に向けて、既知の抗原を含む本研究により同定された抗原タンパク質について WB 法や ELISA 法を用いて抗体価の定量分析を確立し、これら抗原タンパクの網膜障害に関するバイオマーカーとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者血清中に網膜特異タンパクに対す

る自己抗体の存在を検証するために、マウスの各臓器 (網膜、脳、腎臓、肝臓、脾臓) から抽出したタンパク試料を用い、WB を行った。また、これらの抗原タンパクの網膜組織内の局在を検討するために、マウス眼のパラフィン切片を用いた免疫組織染色を行った。

(2) 特徴的な網膜内局在を示す患者血清について抗原タンパクの同定を LC-MS/MS 質量分析装置を用いたプロテオミクス解析法で行った。マウス網膜から抽出したタンパク試料を 2 次元電気泳動し、患者血清を用いた WB により抗原タンパクを描出する。同じ位置のタンパクスポットを切り出し、タンパク分解酵素によるゲル内消化を行った後、分解産物のペプチドを抽出し、LC-MS/MS にてペプチドのアミノ酸配列を推定する。得られたアミノ酸配列から抗原タンパクをデータベース検索により推定した。

(3) プロテオーム解析により推定された抗原タンパク質について、ヒト網膜由来の RNA から調整された市販の Marathon-Ready cDNA を用い、抗原タンパクの全翻訳領域を含む cDNA 断片を PCR 法により増幅し、大腸菌発現ベクターに挿入し、大腸菌で大量産生させた。この組換え融合タンパクには His-Tag 部位が存在するため、金属イオンアフィニティカラムを用いて一段階での精製を行った。90% 以上の純度の組換えタンパクを WB の試料とし、患者血清が認識する抗原であることを最終的に確認する。

(4) 確定した抗原タンパクについて組換え変異体を作製し、エピトープ部分の領域を確認する。狭めたエピトープ領域について合成ペプチドによりエピトープ部位を同定するとともに、合成ペプチドを用いた ELISA 法を確立する。

4. 研究成果

(1) 105 例の患者血清によるマウスの各組織から抽出したタンパク試料を用いた WB およびマウス眼のパラフィン切片による免疫染色等の生化学検査の結果から、網膜特異抗原が種々の分子量を示し、網膜内での局在も多様性を示すことが明らかとなった。現在までに、既知の抗原タンパクを含め 13 個の抗原タンパク質をクローニングした。105 例の患者血清についてこれらの抗原タンパク質との反応性を検討した。7 例以上の患者血清が認識する 6 種類の抗原蛋白 (既知の抗原を含め) を見出し、エピトープ解析のために、抗原タンパクの欠失変異体を作製している。また、WB で 82 kDa に強いバンドを描出し、免疫染色において両極細胞を認識する 2 例の患者血清について、抗原タンパクの同

定を行っている。これまでに報告された抗原タンパクと違っており、新しい CAR 抗原であることが推測される。

(2) 1例ではあるが、特定の抗原タンパク質(リカバリン)に対する異常に高い抗体価(32,000倍希釈)を示し、生命予後の悪い症例が見られた。通常、癌関連網膜症では生命予後は比較的緩やかであることが知られており、抗体価と生命予後との関係について精査する予定である。

本症例は79歳男性で、急激な両眼の視力低下を訴え、各種の検査を施行した。光干渉断層計では黄斑部網膜外層の著明な障害、網膜電図の平坦化を認めた。胸部レントゲン写真で右肺野異常陰影を認め、内科の気管支鏡検査で腺癌の診断となった。血清抗リカバリン抗体が強陽性であった。血清を用いたマウス網膜に対する免疫染色では網膜全体が染まり、視細胞内節・外節が強陽性となった。典型的なCAR症候群において、視力低下から6ヶ月、治療開始から4ヶ月未満での死亡となり、視力予後に加え、生命予後も不良であった。

<参考文献>

Sawyer RA, Selhorst JB, Zimmerman LE, et al. Blindness caused by photoreceptor degeneration as a remote effect of cancer. *Am J Ophthalmol* 1976; 81: 606-613.

Kornguth, S.E., Klein, R., Appen, R., Choate, J. Occurrence of anti-retinal ganglion cell antibodies in patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1982; 50: 1289-1293.

Mizener JB, Kimura AE, Adamus G, et al. Autoimmune retinopathy in the absence of cancer. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 607-618.

Peek R, Verbraak F, Coevoet HM, Kijlstra A. Müller cell-specific autoantibodies in a patient with progressive loss of vision. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 39, 1976-1979 (1998).

Forooghian F, MacDonald IM, Heckenlively JR, Heon E, Gordon LK, Hooks JJ, Detrick B, Nussenblatt RB. The need for standardization of antiretinal antibody detection and measurement. *Am J Ophthalmol*, 2008; 146: 489-495.

Tubby-like protein 1 as an autoantigen in cancer-associated retinopathy. Kikuchi T., Arai J., Shibuki H., Kawashima H., Yoshimura N. *J. Neuroimmunol.*, 103, 26-33 (2000).

Molecular cloning and characterization of a new neuron-specific homologue of rat polypyrimidine tract binding protein. Kikuchi T., Ichikawa M., Arai J., Tateiwa H., Fu L., Higuchi, K., Yoshimura N. *J. Biochem.*, 128, 811-821 (2000).

Molecular cloning and characterization of human PTB-like protein: a possible retinal autoantigen of cancer-associated retinopathy. Tateiwa H., Gotoh N., Ichikawa M., Kikuchi T., Yoshimura N. *J. Neuroimmunol.*, 120, 161-169, 2001.

Role of PTB-like protein, a neuronal RNA-binding protein, during the differentiation of PC12 cells. Ichikawa M., Kikuchi T., Tateiwa H., Gotoh, N., Ohta K., Arai J., Yoshimura N. *J. Biochem.*, 131, 861-868, 2002.

Clinical and immunological characterization of paraneoplastic retinopathy. Makiyama Y, Kikuchi T., et al (8). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 5424-5431, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

- (1) 黒川 徹, 今井 弘毅, 宮原 照良, 村田 敏規 プラトー虹彩機序が一因と考えられた急性原発閉塞隅角症 眼科臨床紀要 10巻9号 721-725 (2017.09)(査読有)
- (2) 宮原 照良 眼アミロイドーシスの病態と治療法 医学のあゆみ 258巻6号 724-728 (2016, 08)(査読無)
- (3) 堀部 寛治, 中道 裕子, 中村 美どり, 高橋 直之, 宇田川 信之, 中村 浩彰, 菊池 孝信, 平野 隆雄, 佐藤 敦子, 太田 浩一 マコモタケ由来成分による抗炎症作用 松本歯学 42巻1号 10-15(2016.06) (査読有)
- (4) 宮原 照良 1 緑内障患者さんの疾患

発見から治療まで 眼科ケア 18 巻 3
号 214-223 (2016, 03)(査読無)

(5) 今井 弘毅, 太田 浩一, 菊池 孝信
長期にわたり視機能が安定した精巣腫
瘍関連網膜症の 1 例 あたらしい眼科
33 巻 3 号 Page435-438 (2016.03)(査
読有)

(6) Kido A, Ogino K, Miyake Y, Yanagida
K, Kikuchi T, Yoshimura N. Unilateral
negative electroretinogram
presenting as photophobia. Doc
Ophthalmol. 2016 Aug;133(1):71-79.
(査読有)

[学会発表](計 2 件)

(1) 太田 浩一, 佐藤 敦子, 千田 奈美, 福
井 えみ, 菊池 孝信, 野沢 修平, 石井 恵
子 生命予後が不良であった癌関連網
膜症 第 52 回日本眼炎症学会(東京、
2018.07)

(2) 黒川 徹, 菊池 孝信, 新井 純, 上野
晃弘, 山崎 正志, 村田 敏規 抗網膜
抗体が陽性であった視神経症の 1 例 神
経眼科 33 巻増補 1 116 (2016.10), 第
54 回日本神経眼科学会総会(宮崎、
2016.11.25)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菊池 孝信 (KIKUCHI, Takanobu)
信州大学・基盤研究支援センター・教授
研究者番号：5 0 1 7 7 7 9 7

(2)研究分担者

太田 浩一 (OHTA, Koichi)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：7 0 2 6 2 7 3 0

宮原 照良 (MIYAHARA, Teruyosi)
信州大学・学術研究院医学系(医学部附属
病院)・講師
研究者番号：8 0 3 6 2 1 3 5

(3)研究協力者

吉村 長久 (YOSHIMURA, Nagahisa)
京都大学・医学部・教授
研究者番号：7 0 2 1 1 6 6 2

菅原 麻紗子 (SUGAHARA, Masako)
京都大学・医学部・大学院生

亀谷 清和 (KAMETANI, Kiyokazu)
信州大学・基盤研究支援センター・技術専
門員

鈴木 佳代 (SUZUKI, Kayo)
信州大学・基盤研究支援センター・技術専
門員

石川 えり (ISIKAWA, Eri)
信州大学・基盤研究支援センター・技術員