

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15373

研究課題名(和文) 病変組織に沈着した免疫複合体の網羅的解析法の開発と自己免疫疾患の組織解析への応用

研究課題名(英文) Immune complexome analysis of tissue-deposited immune complexes for application to tissue in autoimmune diseases

研究代表者

大山 要 (OHYAMA, Kaname)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：50437860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでに循環免疫複合体中のすべての自己抗原を質量分析装置で一度に同定するイムノコンプレキソーム解析法を開発し、関節リウマチ患者と変形性関節症患者の解析で RA 特異的な循環 IC を形成する自己抗原を特定している。本研究ではこの解析法を応用し「沈着免疫複合体の網羅的解析法」の開発を目指した。最適化の結果、組織で変性している抗原の抗原賦活化が予想よりも効率が悪く抽出後の再構成が進まないことがわかった。今後は組織表面から直接分析する、liquid extraction surface analysisなどの表面MS分析を駆使した免疫複合体の組織解析を検討する。

研究成果の概要(英文)：We have developed "immune complexome analysis", in which ICs are separated from whole serum and then subjected to direct tryptic digestion and nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. We have successfully used this method to identify disease-specific IC antigens in the sera of patients with autoimmune diseases. In this research, we aimed to develop "comprehensive analysis method of tissue-deposited immune complexes" by applying this analysis method. As a result of the optimization, it was found that reconstitution after extracting, which is less efficient than anticipated, is not advanced in antigen stimulation of metamorphic antigens in tissues. In the future, we will analyze tissue analysis of immune complexes using surface MS analysis such as liquid extraction surface analysis.

研究分野：臨床化学

キーワード：免疫複合体

1. 研究開始当初の背景

細胞変性などで生成される自己抗原は、抗体産生と免疫複合体 (IC) 形成により局所で処理されるが、その一部は血管内に侵入し抗体と補体が結合した循環 IC を形成する。自己免疫疾患やがんなどでは、循環 IC の濃度が上昇する。特に自己免疫疾患では循環 IC が組織に沈着する (沈着 IC の形成) ことで補体活性化・炎症が起き、組織が障害されると考えられてきた。しかし、「どのような自己抗原を含む IC が組織に沈着しているのか」を調べるには自己抗原候補を 1 つ 1 つ対応抗体で免疫組織染色するしかなく、ほとんどの自己免疫疾患で沈着 IC の自己抗原は特定されていない。そこで申請者は、沈着 IC を病変組織から抽出し、IC 中の自己抗原を質量分析装置で一斉に同定できれば、多くの疾患で沈着 IC の解析が進むと考えた。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに循環 IC 中のすべての自己抗原を質量分析装置で一度に同定するイムノコンプレキソーム解析法を開発し、関節リウマチ (RA) 患者と変形性関節症患者の解析で RA 特異的な循環 IC を形成する自己抗原を特定している (Clin Chem 2011; Ann Rheum Dis 2012)。本研究ではこの解析法を応用し「沈着 IC の網羅的解析法」を完成させる。

具体的には、病変組織 (パラフィン切片) の沈着 IC を形成する自己抗原と自己抗体の親和性を加熱処理で復活させ (賦活化)、組織から抽出した後に試験管内で IC を再構成させ、イムノコンプレキソーム解析法ですべての自己抗原を同定する。そして、患者数の多い RA (滑膜) とシェーグレン症候群 (SS、小唾液腺) の病変組織を解析して沈着 IC の自己抗原を特定し、その IC が血清中にあるのか調べる。本研究が成功すれば、病変組織上のすべての沈着 IC の自己抗原を一度に同定でき、さらにその中から循環 IC と一致する沈着 IC が特定できれば、この IC の形成を阻害する、疾患特異的な治療研究を将来展開できる。

3. 研究の方法

(1) 本研究ではまず、病原性の免疫複合体が組織に沈着しうることについて、検証した。具体的には、先の研究で RA 特異的な免疫複合体抗原として特定した TSP-1 が患者関節組織に沈着しているか調べた。また、TSP-1 刺

激に対する滑膜繊維芽細胞からのサイトカインの産生亢進の有無を調べた。

(2) 続いて、回収された抗原と抗体が試験管内で再度免疫複合体を形成する条件の検討を行った。

(3) これまでの検討結果をもとにミオグロビン-抗ミオグロビン抗体複合体 (モデル免疫複合体) を添加試料した試料をホルムアルデヒドに一晩浸してモデル組織を作製した。これを用いた最終検討を行った。

4. 研究成果

(1) TSP-1 が RA 患者組織に特徴的に集積することが認められた。また、TSP-1 刺激に対して、滑膜繊維芽細胞からの transforming growth factor-beta、interleukin-6、vascular endothelial growth factor の産生亢進は認められなかった。このため、免疫複合体を形成していない TSP-1 では炎症が亢進しないことがわかった。

(2) モデルとして、TNF- α とその抗体を用いて、両者の存在比率や pH 条件の最適化を行った。また、再構成後の免疫複合体を回収については、Fab 抗体固定化ビーズを作製して期待通り回収し、検出可能であることを確認した。

(3) これまでの検討結果をもとに、リン酸緩衝液に浸したモデル組織を電子レンジで加熱して抗原賦活化し、破碎した後、界面活性剤 CHAPS で免疫複合体を含むたんぱく質を抽出して透析を行った。透析後、抗原賦活化されたミオグロビン抗原と抗体を試験管内で混ぜ、免疫複合体を再構成した後、Protein G 固定化磁気ビーズでの回収を行い、トリプシン消化で得られたペプチドの MS/MS 分析でミオグロビンの検出を試みたが、検出することができなかった。今回の結果から、組織で変性している抗原の抗原賦活化が予想よりも効率が悪く抽出後の再構成が進まないことがわかった。今後は組織表面から直接分析する、liquid extraction surface analysis などの表面 MS 分析を駆使した免疫複合体の組織解析を検討する。

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 4 件)

[1] N. Aibara, K. Ichinose, M. Baba, H. Nakajima, K. Satoh, R. Atarashi, N. Kishikawa, N. Nishida, A. Kawakami, N. Kuroda, K. Ohyama: Proteomic approach to profiling immune complex antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with central nervous system autoimmune diseases. *Clinica*

Chimica Acta, **484**, 26-31 (2018) (査読有)

[2] K. Ohyama, H. Yoshimi, N. Aibara, Y. Nakamura, Y. Miyata, H. Sakai, F. Fujita, Y. Imaizumi, A.K. Chauhan, N. Kishikawa, N. Kuroda*: Immune complexome analysis reveals specific and frequent presence of immune complex antigens in lung cancer patients: A pilot study. *International Journal of Cancer*, **140**, 370-380 (2017) (査読有)

[3] K. Ohyama, M. Baba, M. Yamamoto, M. Tamai, K. Ichinose, N. Kishikawa, H. Takahashi, A. Kawakami, N. Kuroda*: Immune complexome analysis of antigens in circulating immune complexes isolated from patients with IgG4-related dacryoadenitis and/or sialadenitis. *Modern Rheumatology*, **26**, 248-250 (2016) (査読有)

[4] T. Suzuki, N. Iwamoto, S. Yamasaki, A. Nishino, Y. Nakashima, Y. Horai, S. Kawashiri, K. Ichinose, K. Arima, M. Tamai, H. Nakamura, T. Origuchi, C. Miyamoto, M. Osaki, K. Ohyama, N. Kuroda, A. Kawakami: Upregulation of thrombospondin-1 (TSP-1) expression in synovial tissues and plasma of rheumatoid arthritis (RA): Role of transforming growth factor- β 1 toward fibroblast-like synovial cells. *Journal of Rheumatology*, **42**, 943-947 (2015) (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

[1] 相原希美, 蒲原千裕, Anil Chauhan, 岸川直哉, 中嶋幹郎, 黒田直敬, 大山 要: イムノコンプレキソーム解析法における免疫複合体抗原選択的な溶出法の検討. 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018 年 3 月

[2] 相原希美, 宮田康好, 安田拓司, 酒井英樹, 中嶋幹郎, 黒田直敬, 大山 要: 尿路癌の検知を目的とした尿中免疫複合体の網羅的解析. 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 熊本, 2017 年 11 月

[3] 日高匡章, 大山 要, 相原希美, 曾山明彦, 足立智彦, 大野慎一郎, 原 貴信, 岡田怜美, 濱田隆志, 金高賢悟, 高槻光寿, 江口 晋: 生体肝移植後、急性拒絶症例に

おける免疫複合体(イムノコンプレックス)の特徴(臓器横断的シンポジウム: 拒絶反応の診断法の進歩). 第 53 回日本移植学会, 札幌, 2017 年 9 月

[4] 中村洋一, 大山 要, 吉見春香, 杉山智英, 笠井 尚, 神山由香理, 池田喬哉, 山口博之, 中富克己, 迎 寛: イムノコンプレキソーム解析を用いた進行肺癌患者における自己抗原化タンパク質発現網羅解析の結果. 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 福岡, 2016 年 12 月

[5] 相原希美, 大山 要, 日高匡章, 岸川直哉, 黒田直敬: 肝臓移植患者の血清中免疫複合体の網羅的解析. 第 41 回日本医用マスペクトル学会年会, 名古屋, 2016 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/hospital/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 要 (OHYAMA, Kaname)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：50437860

(2)研究分担者

川上 純 (KAWAKAMI, Atsushi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号：90325639

(3)研究分担者

中村 英樹 (NAKAMURA, Hideki)
長崎大学・病院(医学系)・講師
研究者番号：10437832