

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15379

研究課題名(和文) 血中の循環性免疫複合体の抗原解析法とその定量解析法の開発

研究課題名(英文) Development of antigen detection method of circulating immune complex in peripheral blood and its quantitative analysis

研究代表者

根木 真理子 (Negi, Mariko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70646108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、感染症と考えられていなかった疾患への微生物の関与が明らかになりつつある。本研究では免疫複合体が関与するとされる糸球体腎炎を対象として、免疫複合体を形成する溶連菌抗原の検出法を確立することを目的とした。検出系の作成にあたりまずモノクローナル抗体の作成を行ったが、現在までに本検出系で利用可能な抗体は得られていない。免疫原を工夫し現在も継続している状況である。また、ヒト血清を用いて溶連菌に対する抗体価の測定を行ったところ、IgG、IgAが健常人に比較してIgA腎症で高い結果が得られた。検出法に関してはサルコイドーシス研究で既に成功しており、有用な抗体ができれば応用が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a new detection method for the antigens derived from streptococcus forming immune complexes in peripheral blood, which is considered to be involved in the onset of poststreptococcal acute glomerulonephritis. To develop a detection system, we attempted to product a monoclonal antibody to the streptococcus, but we have not yet obtained useful antibodies so far. We continue to create better monoclonal antibodies by devising immunogens now. On the other hand, we measured antibody titer against streptococcus using human serum from patients with glomerulonephritis. As results, IgG and IgA showed higher titer in the samples from IgA nephropathy patients than the samples from healthy persons. We have already established this detection method from our research on sarcoidosis, so this method can be applied to the samples with using IgA nephropathy if useful antibodies are available.

研究分野：病理学

キーワード：血中免疫複合体 溶連菌 急性糸球体腎炎 モノクローナル抗体 ポリクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

近年、感染症と考えられていなかった疾患への微生物の関与が明らかとなりつつあり、急性糸球体腎炎では溶連菌が疾患の発症に関与することが想定されている。また、糸球体腎炎では特にその病態形成において免疫複合体の形成が重要とされている。従来、免疫複合体の検出はエピトープ競合等を含む手技上の問題があり定量系の作成は困難である。

申請者らはこれまでにサルコイドーシス研究の中で、血中における免疫複合体を形成するアクネ菌抗原の新規検出法を開発した。アクネ菌はサルコイドーシス患者の病変部から唯一培養された微生物であり、病変部からは本菌のDNA[1-3]や、菌体成分[4]が検出される。現在、想定している発症機序としては、潜伏感染していたアクネ菌が細胞内増殖し、本菌に対する過敏なアレルギー反応により引き起こされる可能性が考えられる[5]。常在菌であるアクネ菌に対しては、多くの成人において高い血中抗体価を有しており、アクネ菌の増殖が引き起こされた場合においては、免疫複合体が形成されうる。従来、血中免疫複合体の検出に関してはエピトープ競合や異種抗体に対する非特異反応等の問題があったが、申請者らは免疫複合体を形成する抗原から抗体を解離させる手法を考案し、新規定量系の開発に成功した。定量解析の結果、健常者と比較してサ症患者で高頻度にリポテイコ酸が検出され、このことから本法は病因論を裏付けるだけでなく、診断や病態解析への利用が期待されるものであった。また、この方法はアクネ菌に限らず免疫複合体を形成するであろう他の細菌に関してもその応用が期待されることから、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

現在、免疫学的に免疫複合体を検出した方法は複数報告されているが、現時点では直接的に免疫複合体のコア抗原を検出・定量する方法は確立されていない。また、自己免疫疾患などにおいて免疫複合体のコアとなる自己抗原を間接的に検出する報告はあるが、細菌感染が病態に関わる可能性が示唆される疾患において、菌体成分を免疫複合体のコア抗原として検出する試みは未だ為されていない。サルコイドーシス研究によって、新規開発した血中免疫複合体を形成するコア抗原の検出法は他の疾患への応用も可能であると考えられる。このことから本研究では急性糸球体腎炎をモデル疾患として、溶連菌の菌体成分に対する免疫複合体の検出系を作成し、新たな検査法の確立を目指す。

新たな検出系の開発に成功すれば、モデル疾患の臨床診断や病態解明に有益な知見を得ることが可能となる。また、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化、アレルギー性血管炎などは細菌感染との関与が近年注目を集め

ているが、本法はこれら疾患の診断・病態解明にも有用性が期待される。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、まず溶連菌に対する特異的なマウスモノクローナル抗体の作成を行った。モノクローナル抗体作成は Laboratory manual[6]のプロトコルを一部改変して行った。免疫原には、本教室で作成した菌破砕液を用いた。まず免疫原をマウスの皮下に合計4回感作免疫した。屠殺後、脾細胞を採取しマウスミエローマ(P3)細胞と細胞融合させハイブリドーマを作成した。その後96穴プレートにて2週間程培養を行いエライザおよびウェスタンブロット法にて選別した。

エライザに関しては、まず平底96穴プレートに溶連菌破砕液抗原を固相化した。固相化には炭酸水素塩緩衝液(pH9.6)を用い、37、60分固相化した。その後Tween-20加リン酸緩衝液(T-PBS)で5倍希釈したハイブリドーマの培養上清を37、60分反応させた。次に二次抗体としてビオチン標識マウスIgMノグロブリン抗体を室温で30分反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識ストربتアビジンを室温で30分反応させた。各段階の前後にプレートをT-PBSで洗浄した。その後0.3%オルトフェニレンジアミンジハイドロクロライド、0.012% H_2O_2 を含むクエン酸リン酸緩衝液(pH5.4)を室温15分(遮光下)反応させた後、25 μ lの2N-HClを加え反応を停止させた。最後にBio-Kinetics Readerで490nm波長を測定した。

ウェスタンブロット法に関しては溶連菌の超音波破砕液を1レーンあたり100 μ gアプライした。12%アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで展開し、Mini Trans-Blot cellでPVDF膜に転写した。その後ブロックエースを用いてブロッキングを行った。次に抗体を200倍希釈したものを室温で90分反応させ、さらにCy3標識ウサギ抗マウスIgG抗体(GEヘルスケア)を室温60分反応させた。各反応の前後にはT-PBSで洗浄を行った。最後にPVDF膜を乾燥させてMOLECULAR IMAGER FXを用いて検出した。

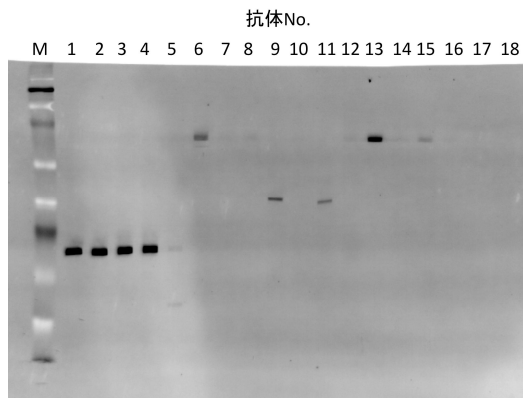
モノクローナル抗体の作成と並行してウサギポリクローナル抗体に関しても作成を行った。

(2) 患者検体の採取に関しては、本学腎臓内科の協力のもと、疾患バイオリソース・センターでの検体保存を行ったものを収集した。現在までに糸球体腎炎患者やその他の疾患を含め50例程が保存されている。抗体作成を進めるとともに、これらの患者血清を用い、溶連菌に対する血清抗体価をエライザにて測定した。まず平底96穴プレートにモノクローナル抗体作成と同様に溶連菌破砕液抗原を固相化した。その後血清を200倍に希釈したものを37で60分反応させた。次に二次抗体としてビオチン標識ヒトIgMノグロ

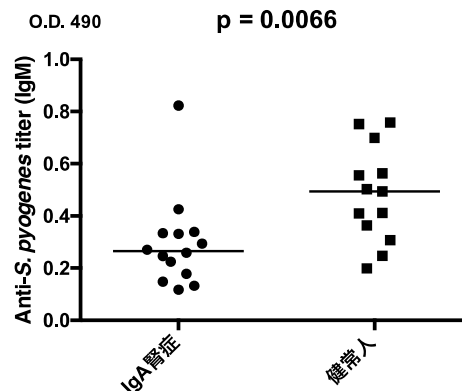
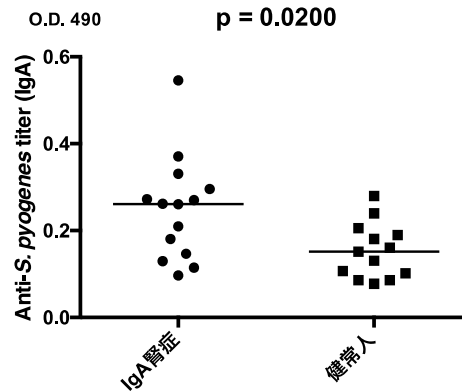
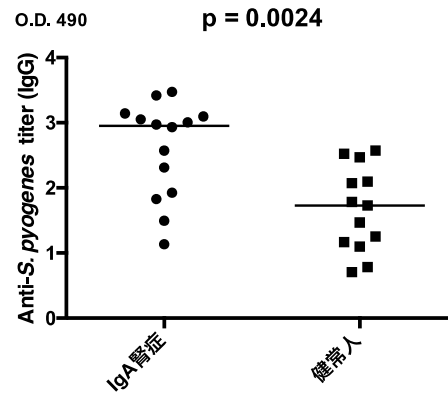
ブリン抗体 (IgG、IgA、IgM) を室温で 30 分反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で 30 分反応させた。以下は、モノクローナル抗体作成時の方法と同様である。

4. 研究成果

(1) マウスモノクローナル抗体の作成に関しては、溶連菌に対して反応するものが少数ではあるが得られている。エライザにて強い反応を示したものを、ウェスタンブロットにて確認を行うと、得られた全ての抗体が 1 バンドを示していた。その結果の一部を下図に示す。これらの陽性バンドについては、タンパク分解酵素であるトリプシンにて消化した溶連菌破砕液では陽性を認めなかったことから、なんらかのタンパク抗原に対して反応しているものと思われる。本研究の目的である免疫複合体検出系の作成においては、サルコイドーシス研究で成功した方法の応用を想定している。この方法においては、低 pH の Buffer を用いることで抗原と抗体を解離させ、さらに煮沸による熱処理でタンパクである抗体を変性させるものである。グラム陽性細菌においては細胞壁成分であるリポテイコ酸は抗原性が高く、また菌種特異性が高い。本法での検出を確立出来たことの一つに目的とする抗原が非タンパクであるリポテイコ酸であったことがポイントであった。そのため溶連菌においてもリポテイコ酸やその他非タンパクの成分に対する抗体の作成が重要となってくる。現在、溶連菌に対するモノクローナル抗体の作成に関しては継続しており、免疫原を工夫した検討を行っているところである。免疫学的に免疫複合体を検出した方法は複数報告されているが、現時点では直接的に免疫複合体のコア抗原を検出・定量する方法は確立されていない。検出系の確立が可能となれば、本疾患の臨床診断や病態解明に有益な知見を得ることが可能となる。そのため、本実験は今後も継続して有用であるモノクローナル抗体を作成することは重要であると考えられる。



(2) ヒト血清を用いた溶連菌に対する抗体価の検討では、健常人を含め多くの検体で高い結果が得られた。IgA 腎症および健常人の血清での比較結果を右図に示す。測定に関しては、IgG、IgA、IgM に対して行った。IgG、IgA に関しては、IgA 腎症患者で有意に高い結果であった。特に IgG に関しては健常人においても高い抗体価を示す例もあり、血中に溶連菌抗原が存在する場合には免疫複合体を形成することが想定される。また、他のサブクラスにおいても健常人で溶連菌に対する抗体の存在が確認された。IgM に関しては IgA 腎症患者で低い結果となり、その現象に関して今後詳細に解析する必要があると考えられる。また、目的とする、モノクローナル抗体の作成に成功すれば免疫複合体を形成する抗原の検出系の確立が可能となり、これらの症例を解析するとともに、血清抗体価との関連性についても検討する必要があると考えられる。



<参考文献>

1. Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takemura T, et al. Eishi, Y., Suga, M., Ishige, I., Kobayashi, D., Yamada, T., Takemura, T., ... Ando, M. (2002). Quantitative Analysis of Mycobacterial and Propionibacterial DNA in Lymph Nodes of Japanese and European Patients with Sarcoidosis. Journal of Clinical Microbiolo. J Clin Microbiol. 2002;40: 198-204. doi:10.1128/JCM.40.1.198-204.2002
2. Yamada T, Eishi Y, Ikeda S, Ishige I, Suzuki T, Takemura T, et al. In situ localization of Propionibacterium acnes DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. J Pathol. 2002;198: 541-7. doi:10.1002/path.1243
3. Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. Lancet. 1999;354: 120-123. doi:10.1016/S0140-6736(98)12310-3
4. Negi M, Takemura T, Guzman J, Uchida K, Furukawa A, Suzuki Y, et al. Localization of propionibacterium acnes in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. Mod Pathol. Nature Publishing Group; 2012;25: 1284-97. doi:10.1038/modpathol.2012.80
5. Eishi Y. Etiologic aspect of sarcoidosis as an allergic endogenous infection caused by Propionibacterium acnes. Biomed Res Int. 2013;2013: 935289. doi:10.1155/2013/935289
6. Harlow, E. Lane D. Antibodies: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔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

根木 真理子 (NEGI, Mariko)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科
人体病理学分野・助教
研究者番号：70646108

(2)研究分担者

江石 義信 (EISHI, Yoshinobu)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科
人体病理学分野・教授
研究者番号：70151959

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

掛川 智也 (KAKEGAWA, Tomoya)
小川 智永 (OGAWA, Tomohisa)