

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17487

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎の自己抗原および自己抗体同定と特異的診断法の樹立

研究課題名(英文) Detection of autoantigen and autoantibody in patients with ulcerative colitis, and establishment of specific diagnostic system

研究代表者

宇座 徳光 (Uza, Norimitsu)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：30447958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の潰瘍性大腸炎の特異抗原および抗体の探索を行い、大腸腸管上皮に高発現するインテグリン V 6と血清中にこれに対する特異抗体インテグリン V 6抗体を同定した。抗インテグリン V 6抗体は感度92%、特異度94.8%と極めて高い診断能を有しているのみならず、治療経過中の疾患活動性とも有意に相関していた。また抗インテグリン V 6抗体は、インテグリン V 6の主たるリガンドである細胞外タンパクのフィブロネクチンとの結合阻害能を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで原因不明とされたきた潰瘍性大腸炎の病態解明にせまる発見である。この発見によって、これまで非特異的な項目から形成される既存の診断基準に対して、疾患特異的な診断マーカーになり得る。特にこれまでの診断項目の中には、患者に身体的および精神的負担を伴う下部内視鏡検査が含まれていた。抗インテグリン V 6抗体が診断基準に組み込まれば、下部内視鏡検査を用いずとも診断できる可能性がある。また炎症性腸疾患の非専門医でも簡便かつ特異的に診断ができる可能性があり汎用性が期待できる。さらに疾患の病勢とも相関しており、治療効果の判定にも有用な疾患活動性マーカーでもある。

研究成果の概要(英文)：We searched for specific antigens and antibodies for ulcerative colitis of unknown cause and identified integrin V 6, which is highly expressed in the intestinal epithelium of the colon, and anti-integrin V 6 antibody, a specific antibody against it in serum. The anti-integrin V 6 antibody not only had an extremely high diagnostic performance with a sensitivity of 92% and specificity of 94.8%, but also significantly correlated with disease activity during the course of treatment. The anti-integrin V 6 antibody also had the ability to inhibit the binding of fibronectin, an extracellular protein that is the main ligand for integrin V 6.

研究分野：病院自己抗原および抗体探索

キーワード：潰瘍性大腸炎 自己抗原 自己抗体 インテグリン 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) は若年者を中心に幅広い年齢層に発症し、大腸粘膜のびらんや潰瘍形成を主体とする炎症性腸疾患である。寛解と再燃を繰り返し、長期療養を余儀なくされ、患者 Quality of life の低下を招くのみならず、将来的に発癌のリスクを有する難治性疾患である (Ungaro R et al. *Lancet*. 2017)。患者数は本邦のみならず世界的に増加しており、これまで精力的にその病態解明を目的とした研究がなされてきた。しかしながら、未だに満足いく結果は得られていない。**最大の問題点は、その原因が不明あるということ**である (Mitsuyama K. *World J Gastroenterol*. 2016)。それゆえに、疾患特異的な診断法、疾患活動性マーカーおよび治療法がなく、自覚症状や内視鏡所見などを組み合わせた総合診断や非特異的治療法に頼らざるを得ないのが現状である。申請者らは、原因不明であった**自己免疫性膵炎の自己抗原および病因性自己抗体の発見** (Shiokawa et al. *Science Translational Medicine*. 2018) の経験を有している。そこで自己免疫性膵炎にしばしば UC の合併を認めることに着目し、UC においても同様に自己免疫的機序が関与しているとの仮説を立て解析を行った。その結果、**UC 患者の IgG が特異的に結合するタンパク質インテグリン V 6 を見いだした**。インテグリン V 6 は炎症刺激等で上皮細胞に発現することが知られている。大腸粘膜上皮を病変の主座とする UC で、インテグリン V 6 の発現が認められれば、UC の病態に大きく関与するタンパク質であることが推定される。予備実験として、UC 患者の切除大腸を用いて発現解析を行ったところ、UC 患者の大腸においてインテグリン V 6 の発現を認めた。注目すべきは、**遠位側腸管ほど発現が上昇**しており、これは **UC 患者の炎症が遠位側腸管で優位であることに合致する結果**であった。以上より、インテグリン V 6 が UC の病態形成に大きく関与していることが示唆された。これは**インテグリン V 6 が UC の自己抗原である可能性のみならず、疾患特異的な診断、活動性マーカーならびに治療標的となり得る可能性を示唆している**。自己抗原候補タンパク質であるインテグリン V 6 に焦点を当て解析を進めることで、UC の診療および研究面において大きな変化をもたらすことが期待できるため本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、**UC の自己抗原および病因性自己抗体を同定すること**と、これに基づいた**疾患特異的診断法と活動性マーカーの確立および治療標的としての可能性を探索すること**である。

3. 研究の方法

(1) UC患者血清中の抗インテグリン V 6抗体のUC診断マーカーとしての検討

ヒトリコンピナント-インテグリン V 6 を用いた ELISA 法により、UC 患者血清中の抗インテグリン V 6 抗体の解析を行う。予備的検討では感度 92%、特異度 93%と良好な結果であったが、対象患者とコントロール群のさらなる集積を行い精度の高いものにしていく。コントロール群として、UC と同様に炎症性腸疾患の代表であるクローン病 (CD) 感染性腸炎や虚血性腸炎などを検討する。また抗インテグリン V 6 IgG のサブクラス解析を行う。

(2) UCの病型や疾患活動性と抗インテグリン V 6抗体との相関解析

抗インテグリン V 6 抗体価と、UC 患者の病型、既存の重症度分類、さらに欧米を中心に汎用されている疾患活動性指標との相関を解析する。これにより、抗インテグリン V 6 抗体が疾患活動性マーカーになり得るかを検証する。

(3) UC患者の治療経過における抗インテグリン V 6抗体の変動解析

(2)で解析した患者を追跡し、その後の治療経過における疾患活動性と抗インテグリン V 6 抗体価の変動を検討する。これにより、抗インテグリン V 6 抗体が治療効果判定のマーカーとなり得るかを明らかにする。

(4) 大腸粘膜上皮におけるインテグリン V 6の発現解析

UC 患者および健常者の大腸組織を用いて、インテグリン V 6 の発現および分布を Western blotting および免疫組織学的染色にて評価する。また抗インテグリン V 6 抗体の結合を評価する。

(5) 抗インテグリン V 6抗体による大腸粘膜障害メカニズムの解析

インテグリン V 6 は細胞外マトリックスタンパク質であるフィブロネクチンと結合することが知られている。フィブロネクチンは粘膜バリアの形成に必要な上皮-結合組織間の構築やシグナル伝達に必須の分子である。インテグリン V 6 の主たるリガンドがフィブロネクチンであることに注目し、UC 患者の抗インテグリン V 6 抗体がその結合を阻害する機能を有するとの仮説を立て、これを検証するために Solid phase binding assay を行う。

Solid phase assay は、リコンビナント-フィブロネクチンを固相化し、これに抗インテグリン V 6 抗体を投与することで、インテグリン V 6 とフィブロネクチンとの結合阻害作用を検証するものである。

(6) UCモデルマウスの確立

UC 発症メカニズム解析のためのモデルマウスの作製を試みる。申請者らは、自己免疫性膵炎モデルマウスを作製した経験から、インテグリン V 6 が UC の真の自己抗原である場合、リコンビナント-インテグリン V 6 をアジュバントと共に投与することで、UC 同様の腸炎を誘導する（免疫誘導モデル）可能性があると考えた。同時に、UC 患者血清より精製した抗インテグリン V 6 抗体をマウスに投与し UC 様の病態を誘導する（passive transfer モデル）ことでその病原性を証明することができると考えた。体重変化、腸管長、血便の有無、病理学的所見、各種サイトカイン産生、抗インテグリン V 6 抗体産生の解析を行い、UC モデルとしての妥当性を検証する。

4. 研究成果

(1) UC ならびに CD や感染性腸炎を含めたコントロール群の症例を蓄積し Screening Cohort とし、さらにこれとは別の集団からなる Validation cohort を用いて検証した結果、UC に対する抗インテグリン V 6 抗体の診断感度および特異度は、それぞれ 92%および 94.8%と極めて良好な診断能を有していた。今後、抗インテグリン V 6 抗体が簡便かつ汎用性の高い有望な診断マーカーになり得ることが期待される。また IgG のサブクラス解析の結果、抗インテグリン V 6 抗体の主体は IgG1 であった。

(2) インテグリン V 6 抗体価は、UC の疾患活動性の指標で、日常臨床で汎用されている Mayo score と有意な相関を認めた。以上より、抗インテグリン V 6 抗体は、診断マーカーのみならず疾患活動性を評価するバイオマーカーとしても有望な指標であることが示された。

(3)(2)で検討した UC 患者のインテグリン V 6 抗体価は、その後の経過においても疾患活動性と良好な相関を認めた。よって抗インテグリン V 6 抗体価は、診断および疾患活動性のマーカーのみならず治療効果判定のマーカーにもなり得る可能性を示した。

(4) コントロール患者の大腸上皮においてもインテグリン V 6 の発現を認めたが、UC 患者

の大腸組上皮ではその発現は有意に上昇していた。また炎症が高度になるにつれてその発現は上昇していた。さらに UC 患者 IgG が、大腸上皮のインテグリン V 6 に結合することを確認した。

- (5) Solid phase binding assay によって、UC 患者の抗インテグリン V 6 抗体は、インテグリン V 6 とそのリガンドであるフィブロネクチンの結合を有意に阻害し、その阻害効果は用量依存的かつ抗体価と有意に相関していた。これにより、抗インテグリン V 6 抗体は、診断、疾患活動性のマーカーのみならず、病因抗体にもなり得るものと考えられる。
- (6) UC 発症メカニズム解析のためのモデルマウスの作成を試みているが、確立には至っていない。リコンビナント-インテグリン V 6 免疫マウスや抗インテグリン V 6 抗体 passive transfer モデルにおける条件検討や、さらにはハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体を作成し、これによるモデルマウス作製も検討中である。

以上より、抗インテグリン V 6 抗体は UC の有用な診断および疾患活動性マーカーとなること、その病態形成に関与することが示唆されたため、その結果を論文報告した (Identification of an anti-integrin V 6 autoantibody in patients with ulcerative colitis: Gastroenterology. 2021 Jun; 160(7):2383-2394)。また、これを臨床応用すべく、UC 診断キットを作製すると同時に、学会や班会議の協力を得て診断基準に組み込むことを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshi Kuwada, Masahiro Shiokawa, Yuzo Kodama, Sakiko Ota, Nobuyuki Kakiuchi, Yasuhito Nannya, Hajime Yamazaki, Hiroyuki Yoshida, Takeharu Nakamura, Shimpei Matsumoto, Hirokazu Okada, Saiko Marui, Toshihiro Morita, Tomoaki Matsumori, Yoshihiro Nishikawa, Kazuyoshi Matsumura, Norimitsu Uza, Tsutomu Chiba, Hiroshi Seno	4. 巻 160
2. 論文標題 Identification of an Anti-Integrin α 6 Autoantibody in Patients With Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 2383-2394. e21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2021.02.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Kuwada
2. 発表標題 New Autoantibody in Patients with Ulcerative Colitis
3. 学会等名 AOCC2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 柴田威
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における新規自己抗体の検討
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 柴田威
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における抗インテグリン α 6自己抗体の検討
3. 学会等名 第12回日本炎症性腸疾患学会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 潰瘍性大腸炎患者における抗原同定と同抗原に対する自己抗体の測定	発明者 妹尾浩、千葉勉、児玉裕三、塩川雅広、栗田威	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、京大6336	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 潰瘍性大腸炎患者における抗原同定と同抗原に対する自己抗体の測定	発明者 妹尾浩、千葉勉、児玉裕三、塩川雅広、栗田威	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、京大6336	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------