

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591179

研究課題名（和文） 膠原病における抗転写因子抗体の網羅的解析を用いた新規治療戦略の開発

研究課題名（英文） A New treatment strategy using analysis of anti-transcriptional factors antibody in connective tissue diseases.

研究代表者

齋藤 和義 (SAITO KAZUYOSHI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30279327

研究成果の概要（和文）：

転写因子に対する抗体とリウマチ性疾患の臨床病態との関連につき、その網羅的な解析をこころみた。96種類の細胞増殖周期、恒常性維持などに重要な機能をもつ、種々の核内因子をGST融合蛋白として調整し1枚のDEAEシートにブロットングした。SLE10例をはじめとした患者血清中の対応抗原の検索を行った。血管炎症候群の血清の一部でHMG1に対する抗体が検出された。一方、SLEではPCNAに対する抗体が2例で検出されたが、その他の多数の抗原にも反応しており、疾患特異性や病態への関与などを示す傾向は認められなかった。抗原をアセチル化、メチル化して翻訳後修飾を受けた核内蛋白への血清の反応も検討したが、翻訳後修飾を行うことで新たに得られた陽性結果や陰性化などの変化は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

We developed a new detection system for anti-body against transcriptional factors in connective tissue diseases. Ninety six nuclear factors that involved in cell cycle and homeostasis were blotted on the DEAE paper and incubated with serum from the patients with connective tissue diseases including SLE, dermatomyositis, polyangitis. Anti-HMG1 antibody was detected in 2 patients with polyangitis. Antibody against PCNA was observed in 2 SLE but the serum reacted with a lot of nuclear factors irrelevant with organ specificity. Acetylation and methylation of nuclear factors did not affect on the result of detection of auto-antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医科学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学・抗転写因子抗体

1. 研究開始当初の背景

代表的な全身性自己免疫疾患である全

身性エリテマトーデスでは、抗核抗体がほぼ100%に検出され、抗原との複合物が腎、

肺、血管などに沈着し重篤な臓器障害を引き起こす。対応抗原は核内にあるのは明らかであり、二本鎖 DNA、リボ核蛋白質、ヒストン、RNA ポリメラーゼ、トポイソメラーゼ I、スプライシング因子、DNA 複製・修復因子、セントロメアの蛋白質、ヒスチジル tRNA 合成酵素などの核酸およびその代謝・維持に関わる蛋白成分である。しかしながら、抗原が明確である疾患は少なく、また、循環血液中に存在しない抗原に対してどのように免疫反応が生じたのか、核内の構造や核ドメインの分子が標的となる機序や疾患を特徴付ける自己抗体の産生がどのようにして生じるのかも明らかでない。

核内因子の中でも遺伝子の転写調節にかかわる転写因子は液性因子、細胞表面機能分子などの発現調節に関わり自己免疫疾患の根底に関わる可能性が示唆されてきた。最近、数個の転写因子に対する抗体とリウマチ性疾患の臨床病態との関連が示されたが、その網羅的な解析は行われていない。

2. 研究の目的

申請者らは、既に作成した膨大な核内因子の発現ライブラリーを用いて、転写因子を含む抗核内因子抗体を網羅的に検出・解析するシステムを確立し、抗転写因子抗体の臨床病態や病因との関連解析、さらには抗原特異的抗体除去療法など治療応用することを目的とした。

研究期間内に転写因子を中心とした核内因子に対する抗体の網羅的検出システム構築を試みた。抗核抗体陽性患者血清（必ず対応抗原が核内に存在する）を中心として患者血清 100 μ l を用いて、一度に 96 種類程度の核内転写因子に対する抗体を検出するシステムを構築した。また、翻訳後修飾（メチル化、アセチル化、ユビキチン化など）を受けた転写因子に対する自己抗体をも検出する系を構築した。抗転写因子抗体のプロファイルと自己免疫疾患あるいは病態特異性を持つのか検討した。

3. 研究の方法

研究方法の概要

目的を達成するための方法は研究開始当初以下のように定められた。

(1) 転写因子を中心とした核内因子に対す

る抗体の網羅的検出システムを構築

(2) 転写因子の翻訳後修飾（アセチル化、脱アセチル化など）と自己抗体に関する検討

(3) 抗転写因子抗体の発現と疾患・臨床病態における特徴の検討

(4) 抗転写因子抗体測定系の樹立

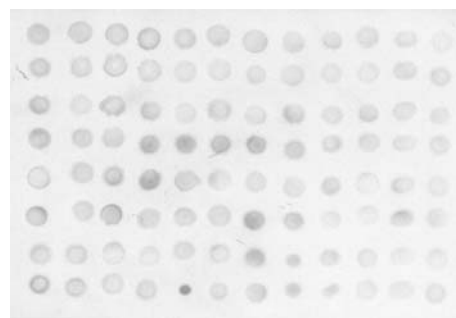
(5) 抗転写因子抗体の病態形成との関連解析

(6) 抗原特異部位の決定とアフィニティークラムで特異的抗核内因子抗体除去など治療応用

4. 研究成果

細胞増殖周期、恒常性維持などに重要な機能をもつ、種々の核内因子を GST 融合蛋白として *in vitro* で調整した。96 種類の転写因子を中心とした下記の核内因子を 1 枚の DEAE シートにスポットしてブロッティングした。

ATF2, ATF3, ATF4, BAF180FR1, BAF180FR2, BAF180FR3, BAF180FR4, BAF57, BMAL1, BRAF35 (HMGX2), Akt1, dbpA, Akt2, Ets2, FBL4, Akt3, Grm19, H1A, H1B, H1C, H1D, H1E, H10, H1X, Heterochromatin alpha, Heterochromatin beta, Heterochromatin gamma v1, AR, HIF1 alpha, HIF2alpha, HMG1, HMG2, HMGX1, huRNPA1, CLOCK, Kinesin12, Ku70, Ku80, MBD1, MBD2, MBD3, cMyc, MeCP2, CTF2, MSH2, MSH6, E74, NRF1, NRF2, Nth1, Oct1, ER, PCAF, PCNA, PDCD4, PRDX1, ER81, GATA3, HP1- γ , PRDX5, Rad23A, Rad23B, Rad51A, KLF4, MYH, Sirt1, SMIF, NK21, NK28, p53, STAM, TBP, Tip60, TRX, p73, UBF, UBXD1, SGK, XPA, XPC, YB-1, ZNF143, Sp1, p300, Foxo3a, NRF2 α , Sp3, S6K, PGC1, KLF2, KLF3, KLF5, TWIST1, TWIST2



ポジティブコントロールとして免疫沈降法にて抗 HMG1 抗体陽性を確認した血管炎候群患者血清を用いて、同シートにおける HMG1 ブロッティング陽性を確認した。

96 の抗原をブロッティングしたシートの Western blotting のゲルをスキャナーで取り込み、格 intensity を GST のみのネガティブ

コントロールのバックグラウンドで差し引いた後に発現パターンを解析する系を確立した。

通常の臨床検査にて抗核抗体陽性と確認された全身性エリテマトーデス10例をはじめ、血管炎症候群、皮膚筋炎・多発性筋炎、強皮症血清を希釈してこのブロッティングシートを用いて対応抗原の検索をした。この際、GST蛋白をバックグラウンドとした。

血管炎症候群の血清の一部でHMG1に対する抗体が検出されたが、罹患臓器との関連には症例の追加を要する。一方、全身性エリテマトーデスではPCNAに対する抗体が2例で検出されたが、その他の多数の抗原にも反応しており、疾患特異性や病態への関与などを示す傾向は認められなかった。

翻訳後修飾を受けた核内蛋白にのみ反応する抗体の存在も考えられ、GST蛋白からの精製蛋白をさらにin vitro acetylation (GST-CBP (HAT) またはGST-PCAF (HAT) と Acetyl CoA添加), in vitro methylation (Yan Zou et al: Biochemistry, 46, 2007.) などの修飾をおこなった後にブロッティングして、また、核内蛋白をあらかじめブロッティングしたシートごとアセチル化、メチル化などを行い解析したが、修飾を行うことで新たに得られた陽性結果や陰性化などの変化は認めなかった。

今後の発展に関して：

複数の抗原に対する抗体が存在する可能性が十分に考えられ、発現パターンと病態特異性、重症度、予後などとの関連解析には症例の積み重ねが必要である。さらに精査を加える意義のある抗原が特定された場合には、高感度抗転写因子抗体測定系 (ELISA) を樹立して疾患活動性との関連解析を行い、治療効果の判定などの指標にならないか検討する。また、病態形成関わる抗体であれば、抗原特異部位の検索を行い、アフィニティーカラムでの抗核内因子抗体の特異的除去による自己抗体選択的除去療法の可能性を検討する。

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6件)

- ①Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Yamaoka K, Nawata M, Yukawa S, Hanami K, Fukuyo S, Kubo S, Miyagawa I, Tanaka Y: Phenotypic Changes of Lymphocytes in Patients with Systemic Lupus Erythematosus who are in the long-term remission After B Cell Depletion Therapy with Rituximab Journal of Rheumatology 38(4):633-41, 2011 査読有
- ②Iwata S, Saito K, Yamaoka K, Tsujimura S, Nawata M, Hanami K, Tanaka Y. : Efficacy of combination therapy of anti-TNF- α antibody infliximab and methotrexate in refractory entero-Behçet's disease. Mod Rheumatol. 21(2):184-91, 2011 査読有
- ③Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y : Etanercept overcomes P-glycoprotein-induced drug resistance in lymphocytes of patients with intractable rheumatoid arthritis. Modern Rheumatology, 20(2):139-146, 2010 査読有
- ④Suzuki K, Saito K, Tsujimura S, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamukai N, Iwata S, Nawata M, Nakano K, Tanaka Y. : Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, overcomes treatment unresponsiveness mediated by P-glycoprotein on lymphocytes in refractory rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 37(3):512-520, 2010 査読有
- ⑤Takahashi M, Shimajiri S, Izumi H, Hirano G, Kashiwagi E, Yasuniwa Y, Ying W, Han B, Akiyama M, Nishizawa S, Sasaguri Y, Kohno K.: Y-box binding protein-1 is a novel molecular target for tumor vessels. Cancer Sci., 101:1367-1373, 2010. 査読有

©Iwata S, Saito K, Yamaoka K, Tsujimura S, Nawata M, Suzuki K, Tanaka Y. : Effects of anti-TNF-alpha antibody infliximab in refractory entero-Behecet's disease. Rheumatology 48(8):1012-1013, 2009 査読有

[学会発表] (計1件)

①Saito K, Hanami k, Nawata M, Yunoue N, Tanaka Y. : Humanized anti human Interlukin-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab (TCZ) increases high molecular weight adiponectin (HMW-AN) in the patients with rheumatoid arthritis (RA): result from The ESCORT study
The 11th Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2010年6月16日
Roma(Fiera Rome)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 和義 (SAITO KAZUYOSHI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30279327

(2) 研究分担者

河野 公俊 (KOHNO KIMITOSHI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：00153479

(3) 連携研究者

田中 良哉 (TANAKA YOSHIYA)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：30248562