

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08622

研究課題名(和文)自己免疫性腎炎の病態に関係する細胞表面上の自己抗原複合体の解析

研究課題名(英文) Analysis of autoantigen complexes on the cell surface related to the pathogenesis of autoimmune nephritis.

研究代表者

三浦 恵二 (Miura, Keiji)

藤田医科大学・保健衛生学部・講師

研究者番号：20199946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：当初の計画では、自己免疫性腎炎患者のリンパ球から、EBウイルスを用いたリンパ芽球細胞株を株化すること、さらに自己抗体産生細胞のクローニングを外注予定だった。しかしサービスが中止となったため研究方法を変更した。古典的な免疫沈降法を採用した。患者血清からIgGを精製し、血管内皮細胞(HUVEC)の膜画分に反応させた。IgGに結合したタンパク質を回収し、プロテオミクス解析を行った。患者血清だけで検出されるタンパク質が73種類判明した。さらにProteome discoverer 解析により、局在が細胞膜と想定される7つのタンパク質を特定した。これらが新たな自己抗原かどうかの確認実験を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な自己免疫疾患には、それぞれ特徴的な自己抗原が同定され、各疾患の診断基準となる検査に使われている抗原も多い。しかしそれら自己抗原の多くが細胞内に局在するタンパク質であるのに対し、患者血清中には細胞表面に結合する自己抗体、例えば抗血管内皮細胞抗体(AECA)が検出されることも多く、その矛盾は長年の疑問である。

本研究では、自己免疫性腎炎患者血清中に存在する自己抗体の中に、血管内皮細胞表面に局在する膜タンパクに結合する抗体がある、という観点から、その膜タンパクを同定し、新規自己抗原として検査や病態解明に利用することを目的とした。現在までに、7つの候補タンパクが同定され、確認実験を実施中である。

研究成果の概要(英文)：The original plan was to strain lymphoblastoid cell lines from lymphocytes from patients with autoimmune nephritis using the EB virus, and to outsource the cloning of autoantibody-producing cells. However, the service was discontinued and the research methodology was changed.

Therefore, a classical immunoprecipitation method was employed. IgG was purified from several patient sera and reacted with the membrane fraction of vascular endothelial cells (HUVECs). Proteins bound to IgG were recovered and subjected to proteomic analysis. Seventy-three proteins were identified that were detected only in patient serum. Furthermore, seven proteins that are assumed to be localized to the plasma membrane were identified by Proteome discoverer analysis. We are now conducting experiments to confirm whether these proteins can be identified as new self-antigens.

研究分野：分子免疫学

キーワード：抗血管内皮細胞抗体 自己抗体 自己抗原 細胞表面抗原 血管炎

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者は、現在 1,330 万人(成人の 8 人に 1 人)と言われ、まさに国民病である。しかも、病気が進行し人工透析が必要な患者は約 32 万人、その医療費が年間一兆円にもなっており、国にとっても膨大な負担になっている。しかも、今後患者数の増加も想定され深刻な状況にある。腎臓病になると、狭心症・心筋梗塞や脳卒中などの発症率も高くなることから、腎臓病の早期診断、早期治療は、国民の健康を維持するために極めて重要な課題である。現在の腎臓病の検査で簡便なものは、尿タンパク量を測定する尿検査と、血液中のクレアチンを調べる血液検査が行われており、それらの検査で異常が見つかった場合、最終的な検査として腎生検が行われているが、患者にとって大きな苦痛を伴う検査でもある。簡便で、患者の苦痛が少なく、かつ早期発見できる検査、治療効果が判定できる検査、腎生検の回数を減らすことができる検査、予後予測ができる検査などの需要は非常に高いと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究代表者が開発した CSP-ELISA で自己免疫疾患患者血清を測定すると、IgG-AECA, IgA-AECA の陽性率が高いことがわかっている。特に、全身性エリテマトーデス (SLE)、混合性結合組織病(MCTD)、強皮症(SSc)の患者では、60-80%が陽性を示した。これら 3 疾患に共通し、しかも細胞表面に存在する自己抗原は知られておらず、新規自己抗原と考えられるが、まだ同定には至っていない。しかし、細胞表面に対する自己抗体を効率的に検出できているという結果は、CSP-ELISA 法の系を持っているからであり、独自性は高いと考える。また、細胞表面上のタンパクで、かつ比較的マイルドな変性処理で抗原性を失う自己抗原の存在を示すことができていることも独自性は高いと考える。

labile epitope と呼ぶことにしたこの性質を持つ自己抗原は、患者血清を用いたウェスタンブロット解析では検出できないことを意味し、CSP-ELISA で得られる抗原抗体反応の条件を免疫沈降法に適用することで、新たな細胞表面自己抗原の同定が期待できる。これまでは、細胞表面抗原に対する簡便でかつ多検体でも対応できる自己抗体検査法はなく、AECA を測定するための標準化された方法もなかった。細胞表面に存在することに焦点を絞って自己抗原を探索することは、自己免疫疾患の病態解明、治療の標的の絞り込みに繋がること、また新たなバイオマーカーを見つげ出すための強力な方法論になることが期待できるものであり、創造性は高いと考える。

### 3. 研究の方法

CSP-ELISA で高値を示した患者血清は、その反応・洗浄条件などが抗原抗体反応に適していたことを意味しており、その条件を踏襲すると、免疫沈降法で抗原の精製が可能になる。得られた患者特異的なバンドを切り出し、質量分析を行ってきた。IgG を使った免疫沈降法では、55kDa 付近に患者特異的なバンドが検出されることが多く、その実体はビメンチンであることが判明している。しかしながら、精製されたビメンチンタンパクを用いた ELISA では、一部の患者しか陽性にならない結果となっている。この結果は、患者の血清中には、複数の自己抗体が存在し、抗ビメンチン抗体以外の自己抗体によりビメンチンが免疫沈降されていると考えている。すなわち、ビメンチンを含めた複合体が自己抗原の実体と判断している。IgA については、これまで免疫沈降法を行ったことがない。抗ヒト IgA 抗体を固相化したアフィニティカラムを用いて患者血清中より総 IgA の精製を行う。次に NHS 活性化タイプの磁気ビーズに対して反応し IgA を固相化する。ビオチン化膜画分添加以降の実験方法は、上記 IgG の場合と同様である。

患者血清を用いた複合体の解析は困難が予想される。それは、患者血清中の自己抗体が複数種類の混合物であると考えられ、さらにそれぞれの存在比率が不明、結合する分子も不明だからである。そこで、患者の体内に存在する抗体産生細胞をクローン化し、抗体遺伝子をクローニングすることにより、モノクローン抗体を取得することを計画している。患者から 10ml 程度の血液を提供していただき、B 細胞を分離し、EB ウイルスを感染させてリンパ芽球様細胞株を樹立する。EB ウイルスによる細胞株樹立の実験は、(株)イーベック社に外注する予定である。イーベック社によると、10ml の血液から平均的には 50,000 個程度の抗体産生細胞株が得られるとのことである。自己抗体産生細胞がその 0.1%としても、50 個程度のクローンの取得が期待できる。96 ウェルプレート 2 枚に分けて培養し、その培養上清を使用して抗細胞表面抗体価を測定すると、陽性になったウェルには 1 種類の自己抗体産生細胞が存在すると期待できるため、そのクローンだけを少量選別することができる。その細胞から、抗細胞表面抗体遺伝子を PCR により増幅し、scFv 抗体を作成することで、個々の自己抗体のモノクローン抗体が使用可能になる。

### 4. 研究成果

本研究の実施予定では、患者より提供していただいたリンパ球を元に、EB ウイルスを用いたリンパ芽球細胞株を株化し、さらに自己抗原に結合する抗体を産生する細胞株のクローニン

グまでを、株)イーベック社に外注する計画であった。ところがイーベック社がその受託サービスを中止してしまい依頼できなくなってしまった。また、外注を予定していた実験の一部である、EB ウイルスによるリンパ芽球細胞株の受託については他社でも見つかったが、予定した予算よりはるかに高額なため依頼することが出来ず、研究方法を再考する必要に迫られた。

そこで、古典的な方法ではあるが免疫沈降法を実施した。患者血清から IgG を精製し、それを血管内皮細胞 (HUVEC) から調製した膜画分に反応させ、IgG に結合したタンパク質を沈降させて回収した。そして、回収したタンパク質のプロテオミクス解析を行った。患者血清だけでなく、健常人血清でも同様の実験を行い、患者血清の方で2倍以上検出されたものを選び出した。最終的には、健常人血清では検出されず、患者血清だけで検出されたタンパク質が73種類判明した。

さらにタンパク質の解析ソフト Proteome discoverer の解析により、タンパク質の局在が細胞膜と想定されるものを7つ特定した。これらのタンパク質が検出されたことが、患者血清中の IgG が特異的に結合して回収されたことによることを確認するため、それぞれのリコンビナントタンパク質と抗体を用意し、サンドイッチ ELISA で患者血清中の IgG が結合することを確認している段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|