

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591438

研究課題名(和文)フローサイトメトリーによる膠原病患者抗血管内皮細胞抗体の対応抗原の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of novel autoantigens against anti-endothelial antibodies from collagen disease patients by flowcytometry.

研究代表者

藤井 博司 (Fujii, Hiroshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30531321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病患者において抗血管内皮細胞抗体が出現することは知られていたが、膜表面抗原を特異的に分離、同定することは困難であった。今回我々は血管内皮細胞由来の自己抗原を特異的に分離同定する方法であるSARFを開発した。SARFにより全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、大動脈炎症候群患者血清を用いて新規膜型自己抗原を同定した(FLRT2, EphB2, ICAM-1, Pkなど)。これらの新規膜型自己抗原は新たな診断マーカーとして有用である可能性とともに、膠原病における血管病変形成機序の解明、特異的治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that anti-endothelial antibodies were detected in the sera of collagen disease patients, but it was difficult to isolate and identify cell surface auto-antigens derived from endothelial cells. In this study, we established a method to specifically isolate and identify cell surface autoantigens on endothelial cells, SARF (Serological identification system for autoantigens using a retroviral vector and flow cytometry). By SARF method, several novel cell surface autoantigens in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Takayasu arteritis, were identified (FLRT2, EphB2, ICAM-1, Pk etc.). These novel cell surface autoantigens could be a clue for the resolution of pathomechanism of vascular lesions and the development of novel therapy in collagen diseases.

研究分野：膠原病学

キーワード：抗血管内皮細胞抗体 自己抗体 全身性エリテマトーデス 血管炎症候群

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞抗体 (anti-endothelial cell antibody, 以下 AECA) は、血管内皮細胞表面に結合する自己抗体であり、それらが全身性エリテマトーデス (以下 SLE)、血管炎症候群、強皮症患者血中に存在することが報告されているが、細胞表面に存在する対応抗原は明らかにされていなかった。その対応抗原は膜表面に存在し、抗体が直接結合しうる自己抗原であるという点からも膠原病における AECA の意義は極めて興味深く、対応抗原の同定は膠原病患者における炎症や血管病変形成機序の解明に重要であると考えられている。免疫沈降法や 2次元電気泳動によるプロテオミクスを用いて同定された AECA の対応抗原も報告されているが、上記は細胞表面に存在する蛋白質を特異的に同定する方法ではなく、また、膜型蛋白の検出にはその可溶性にも影響を受けるといった技術的困難性もあることから、現在まで AECA の対応抗原としての膜型蛋白の報告はほとんどない。申請者はヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, 以下 HUVEC) より作成した cDNA ライブラリーをレトロウイルスベクターを用いて細胞に発現させ、フローサイトメトリーによる細胞ソーティングにより、細胞表面に自己抗原を発現する細胞を分離する方法を開発した。

2. 研究の目的

血管内皮細胞表面に結合する膠原病患者由来 IgG を用いて、血管内皮細胞表面に存在する新規自己抗原を同定する。抗血管内皮細胞抗体の対応抗原としての膜型蛋白を、レトロウイルスベクターを用いた発現ベクター系とフローサイトメトリーによる細胞ソーティングを用いてクローニングする系を確立する。その自己抗原としての病変形成における意義も明らかにする。

3. 研究の方法

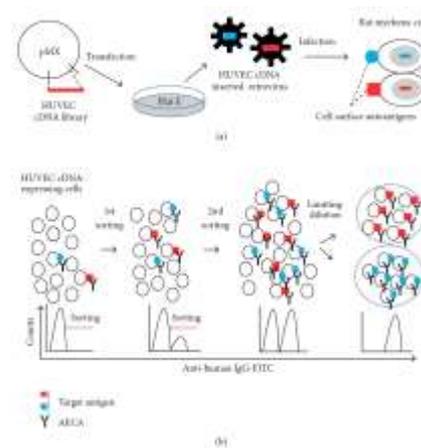
(1) 膠原病患者血清における抗血管内皮細胞抗体 (AECA) の測定

患者血清を一次抗体、FITC-抗ヒト IgG 抗体を二次抗体として、HUVEC への結合 AECA 活性として測定した。

(2) SARF 法

HUVEC より mRNA を精製、cDNA ライブラリー作成後、レトロウイルスベクター pMX に組み込む。それらを浮遊細胞の細胞株 (rat myeloma cell line) に感染させることにより HUVEC 由来 cDNA ライブラリーを細胞に発現させる。一次抗体として AECA 活性を有する患者血清、二次抗体として FITC-抗ヒト IgG 抗体で染色後、FITC 陽性細胞をフローサイトメトリーにて sorting し、limiting dilution にて細胞をクローン化する。患者血清 IgG に結合するクローンを選別後、細胞に導入された HUVEC 由来遺伝子を AECA の対応抗原として同定する。本方法(図 1)は、細胞表面に発現されている自己抗原を特異的に分離同定する方法であり、SARF 法と命名した。

図 1 SARF 法の原理



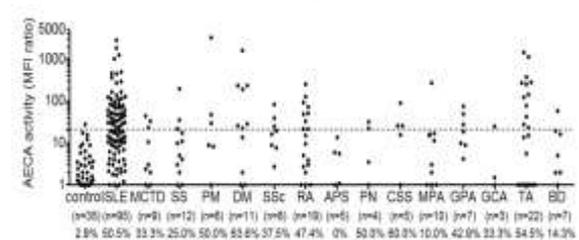
(3) 膠原病患者における SARF で同定された自己抗原 FLRT2 について、細胞増殖、細胞死、サイトカイン、接着分子の発現についての解析を行った。

4. 研究成果

(1) 膠原病患者における AECA

フローサイトメトリーによる抗血管細胞抗体価を測定した。SLE、関節リウマチ、高安動脈炎において高い AECA 値を有する患者が認められた (図 2)。

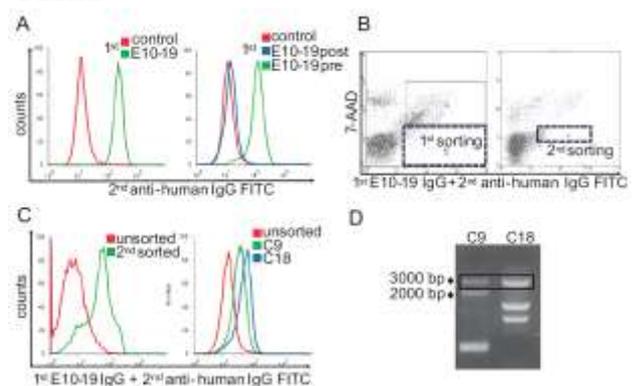
図 2 膠原病患者における AECA 活性



(2) FLRT2

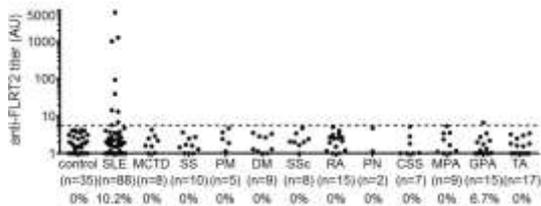
高い抗 AECA 活性を有するループス腎炎を有する SLE 血清(E10-19)由来 IgG を AECA のプロトタイプ (図 3A) として SARF により自己抗原の同定を試みた。2 回目の細胞ソーティングを行い (図 3B)、2 回目のソーティング後に有意な細胞群が認められ、限界希釈法により E10-19 IgG に結合する 2つの細胞クローン(C9, C18)を得た(図 3C)。C9, C18 にヒト由来の 3000bp の遺伝子が挿入されており(図 3D)、遺伝子配列決定により FLRT2 (fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2)と同定された。

図 3 SLE 患者由来 IgG に結合する膜蛋白 FLRT2 のクローニング



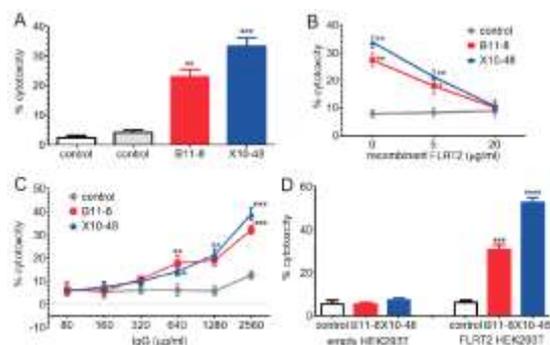
抗 FLRT2 抗体活性は SLE 患者においてのみ認められ、SLE 患者の 10.2% (AECA を有する SLE 患者の 21.4%)において抗 FLRT2 抗体活性が認められた (図 4)。

図 4 膠原病患者における抗 FLRT2 抗体活性



抗 FLRT2 活性を有する SLE 患者 IgG は量依存性に血管内皮細胞(図 5A,C)、FLRT2 発現 HEK293 細胞(図 5D)に対して細胞傷害活性を有し、可溶性の FLRT2 でその細胞傷害活性は阻害されたことから(図 5B)、抗 FLRT2 抗体はその標的に結合することにより細胞障害活性を有することが示された。

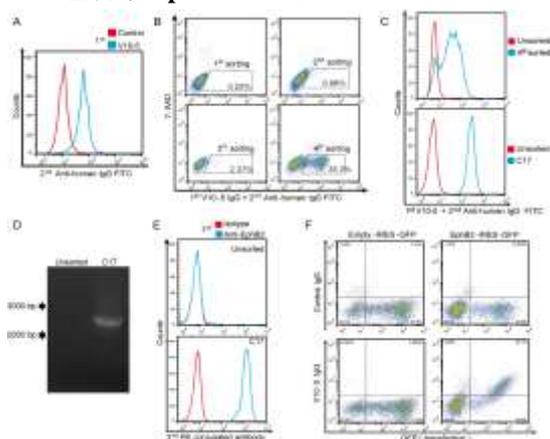
図 5 抗 FLRT2 抗体による細胞傷害活性



(2) EphB2

SLE に合併した急性壊死性脳症 (ANE; acute necrotizing encephalopathy)患者血清 (V10-5) に、高い AECA 活性が認められた (図 6A)。SARF を用いて、本患者 IgG に結合する自己抗原の同定を行った。4 回目の細胞ソーティング時に有意な細胞集団が認められ(図 6B)、限界希釈法により V10-5 IgG に結合する細胞クローン(C17)を得た (図 6C)。C17 にはヒト由来の約 2500bp の遺伝子が挿入されており (図 6D)、その遺伝子配列から EphB2 (ephrin type B receptor 2)と同定した。C17 は細胞表面に EphB2 を発現しており(図 6E)、V10-5 IgG は EphB2 強制発現 HEK293 に結合した(図 6F)。

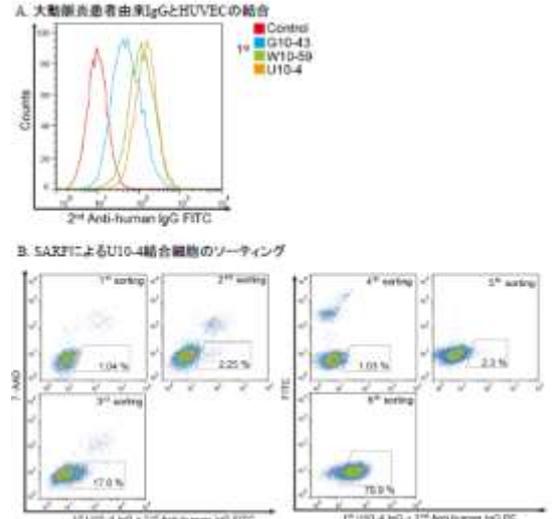
図 6 SLE, ANE 患者 IgG に結合する新規膜型自己抗原 EphB2 の同定



(3) 大動脈炎症候群患者由来 AECA の対応抗原

大動脈炎患者の 54.5%が AECA 活性を有し (図 2)、G10-43, W10-59, U10-4 を大動脈炎症候群患者由来 AECA のプロトタイプ (図 7A) として、SARF 法にて対応自己抗原の同定を行った。6 回目の sorting 後に有意な細胞集団として認められ (図 7B) 限界希釈法による細胞クローン樹立後、挿入されたヒト由来遺伝子の解析により膜蛋白 A, 膜蛋白 B を得た。

図 7 大動脈炎症候群患者由来 IgG に結合する自己抗原の分離同定



(4) その他

SARF 法により関節リウマチ患者 IgG より ICAM-1 を SLE 患者 IgG より CD77 を分離同定した。

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 3 件)

① Shirai T, Fujii H (他 7 名)、A novel autoantibody against ephrin type B receptor 2 in acute necrotizing encephalopathy.

J Neuroinflammation. 査読有, 2014

10:128.doi:10.1186/1742-2094-10-128

② Shirai T, Fujii H (他 4 名)、An innovative method to identify autoantigens expressed on the endothelial cell surface: serological identification system for autoantigens using a retroviral vector and flow cytometry (SARF).

Clin Dev Immunol. 査読有

2013;2013:453058.doi:10.1155/2013/453058

③ Shirai T, Fujii H (他 7 名)、A novel autoantibody against fibronectin leucine-rich

transmembrane protein 2 expressed on the endothelial cell surface identified by retroviral vector system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 査読有, 2012, 14(4):R157

〔学会発表〕(計7件)

- ① Fujii-H, An innovative method to identify autoantigens expressed on the cell surface: SARF, 15th International Congress of Immunology, 2013年8月24日、Milan (Italy)
- ② 白井剛志、発現クロニングシステム(SARF)を用いた高安動脈炎における新規膜タンパク自己抗原2種の同定、第57回リウマチ学会総会、2013年4月19日、京都国際会館(京都府京都市)
- ③ Fujii-H, Retroviral Vector System Identified FLRT2 As a Novel Cell Surface Autoantigen of Anti-Endothelial Cell Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus., Cell Symposia Human Immunity, 2012年8月20日、Lisbon, Portugal
- ④ 白井剛志、Retroviral vector system identified FLRT2 as a novel cell surface autoantigen against anti-endothelial cell antibodies in lupus、第40回日本免疫学会総会、2012年11月28日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 博司 (FUJII, Hiroshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 30531321