

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591458

研究課題名(和文) ベーチェット病の自己抗体の解析：好中球遊走能にかかわるコフィリンに対する抗体

研究課題名(英文) Autoantibodies to cofilin-1 in patients with Behcet's Disease

研究代表者

大岡 正道 (Seido, Ooka)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30367370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ベーチェット病は好中球の活性化に伴い、口内炎や陰部潰瘍、ぶどう膜炎をおこす難病である。コフィリン1は可溶性のタンパク質で、好中球の殺菌能と関連が報告されている。本研究はベーチェット病患者における抗コフィリン1抗体の好中球機能に対する影響を明らかにし、病態の解明をすることが目的である。本研究ではコフィリン1を3つの部分に分けて作成し、患者血清と反応性を確認した。60検体中11検体(18.3%)でコフィリン1に対する抗体を持っていた。そのうち45.5%は複数の部分に反応しており主要抗原であることが示唆された。抗コフィリン1抗体は赤血球沈降速度の軽度亢進とINF $\alpha$ 産生と関連している可能性があった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the autoimmunity in Behcet's Disease (BD), we surveyed autoantigens (autoAgs) in patients with BD and investigated prevalence and clinical significance of the identified autoantibodies (autoAbs). We prepared whole cofilin-1 and three fragments as fusion protein with maltose binding protein. The autoAbs to cofilin-1, were investigated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using fusion protein of cofilin-1 in 60 patients with BD. The autoAbs to cofilin-1 were detected by WB in 11 (18.3%) of the 60 patients with BD. Multiple epitopes on cofilin-1 were recognized by 45.5% of the anti-cofilin-1 positive serum samples. The autoAbs to cofilin-1 are probably produced by the antigen-driven mechanism. Clinically, the existence of the autoAbs to cofilin-1 correlated with the erythrocyte sedimentation rate and production of interferon alpha. Our data indicates that the generation of autoAbs to cofilin-1 may reflect common immunological disorders in BD.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：自己抗体 コフィリン

## 1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病は口内炎、陰部潰瘍、皮疹、ぶどう膜炎をきたす難治性炎症性疾患で、国内に約1万6千人の患者を有する。悪化すると失明にいたり、特殊型ベーチェット病では重篤な後遺症を残したりするが、いまだ原因はわかっていない。現在、病態の首座は好中球の機能亢進によることが知られている。

主任研究者は本来自己抗体が存在しないとされていたベーチェット病患者において、好中球遊走能の中心的役割を担うコフィリン1に対する自己抗体の存在を明らかにした(大岡正道ら、Microbiol Immunol. 2010)。

コフィリンは筋組織に多く分布する muscle type と非筋組織に多い non-muscle type にわかれるが、好中球に存在するのは主に後者で、コフィリン1と呼ばれている。

コフィリン1は細胞質に存在する可溶性のタンパク質で、刺激によって細胞膜領域へ移行する。好中球の活性化時においてコフィリン1の脱リン酸化、膜領域へ移行は、好中球の殺菌能である活性酸素産生とも関連が報告されている。

主任研究者が明らかにしたこのコフィリン1に対する自己抗体はこれらの制御に対して促進する機能をあたえる可能性があるため、抗コフィリン1抗体の機能を明らかにすることができれば、ベーチェット病のメカニズムの解明が大きく前進することが予測される。本研究は解明されていない抗コフィリン1抗体の基礎研究を完成させ、抗コフィリン1抗体を利用したベーチェット病の新たな診断方法や治療薬への臨床応用に展開が期待された。

## 2. 研究の目的

難病であるベーチェット病の主な病態は好中球の活性化に伴って、組織の破壊が起こることである。主任研究者は、本来自己抗体が存在しないとされているベーチェット病患

者において好中球の運動能にかかわるコフィリン1に対する自己抗体を発見し報告した(大岡正道ら、Microbiol Immunol. 2010)。本研究は抗コフィリン1抗体の好中球機能に対する影響を明らかにし、ベーチェット病の治療応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) コフィリン1の抗原性の解明

抗原性を明らかにすることによりコフィリン1が主要抗原(multiple epitope)であることを明らかにする。

コフィリン1を3つのパートに分割し、大腸菌(DH5)を用いてマルトースバインディングプロテインとのリコンビナント蛋白として作成する。

血清濃度を100倍に調整。作成したリコンビナント蛋白をセルロース膜に転写し、Western blotting法にて各パートに対する抗コフィリン1抗体の反応性を明らかにする。

同様に作成したリコンビナント蛋白100µgを96穴プレートのウェルに固相化し、ELISA法を用いて、コフィリン1に対する反応性を明らかにする。ベーチェット病患者と疾患コントロールとして全身性エリテマトーデス、関節リウマチ患者各50人の血清を用いて、コフィリン1に対する抗体の陽性率を検定する。

### (2) 好中球機能に対する抗コフィリン1抗体の効果を明らかにする

好中球の機能の中心的な役割を担うコフィリン1に対して、抗コフィリン1抗体の影響を明らかにする。

#### 末梢好中球の分離

健常人よりヘパリン採血した静脈血をモノポリ分離液(Mono-Poly Resolving Medium)

に、重層し、室温 300×g にて遠心分離。ハ  
ンクス液 (HBSS) に浮遊させトリパンブルー  
染色により 95%以上の生存を確認して、以下  
の研究に使用する。

抗コフィリン 1 抗体の効果を明らかにす  
る

上記好中球に、患者血清より精製した抗コ  
フィリン 1 抗体を添加、好中球遊走能の低下  
を測定する。方法は Burnett らの方法による  
もので、Modified Boyden chamber にて遊走  
能の測定を行う。フィルターは 3.0µm を使  
用。5%CO<sub>2</sub>、37 にて 90 分間培養後、蛍光染  
色でフィルター下面に到達した好中球数を  
測定することにより行う。5 視野計測し、1  
mm<sup>2</sup>あたりの末梢好中球数として算出する。

好中球の活性酸素産生能の測定はチトクロ  
ーム C 還元法を用いて測定する。チトクロ  
ーム C (5mg/ml) を 0.1ml、および抗コフィ  
リン 1 抗体を添加、さらに Superoxide  
dismutase (SOD) (300 µg/ml) 0.05ml または  
HBSS 0.05ml を混和。37 で 15 分間振盪後、  
氷冷にて反応を停止させ、4 、3000rpm で  
10 分遠心後、上清を吸光度 550nm で測定する。  
SOD の混和による吸光度の差を活性酸素産生  
能とする。

好中球への抗コフィリン抗体のサイトカイン  
産生能への影響を見るために、抗コフィ  
リン 1 抗体を上記好中球に添加し上清に各種サ  
イトカインが発現していないかを確認する。

(3) 臨床所見に対する抗コフィリン 1 抗体  
の関係を明らかにする。

特に、ベーチェット病の特殊型 (神経、  
腸管、血管病変) について関連がないか  
検討する。

陽性者と臨床情報の相関を検定すること  
により、抗コフィリン 1 抗体の臨床上の  
意義について明らかにする。

#### 4 . 研究成果

(1) コフィリン 1 の抗原性の解明

コフィリンに対するベーチェット病患者  
における抗原性の確認と抗コフィリン抗体  
の好中球に対する影響について検討した。コ  
フィリン 1 を 3 つの Fragment に分割し、大  
腸菌 (DH5 ) を用いてマルトースバインデ  
ィング蛋白との融合蛋白としてリコンビナ  
ント蛋白を前年度までに作成した。作成した  
コフィリン 1 を固相化したプレートを用いて  
ベーチェット病患者 60 人の血清で ELISA を  
行い、抗原性を確認した。コフィリン 1 に対  
しては 11 人 (18.3%) の患者血清で 3 つの  
Fragment のうち少なくとも一つ以上の  
Fragment と反応した。ベーチェット病患者血  
清のうち 2 つ以上の Fragment と反応した患  
者血清は 5 検体 (45.4%) であった。以上のこ  
とから、ベーチェット病におけるコフィリン  
1 は複数のエピトープをもち、主要抗原の一  
つであると考えられた。

(2) 抗コフィリン 1 抗体の好中球の機能へ  
の影響の解明

2 つ以上の Fragment と反応したベーチェッ  
ト病患者血清の 5 検体からコフィリン 1 リコ  
ンビナント蛋白を用いて抗コフィリン 1 抗体  
を精製し、全血からの分離したヒト好中球に  
反応させることにより、抗コフィリン抗体の  
好中球に対する影響を検討した。遊走能につ  
いては 3µm 孔のポリカーボネート膜を用い  
て測定したが 5 つの検体から分離したすべて  
の抗コフィリン 1 抗体添加の有無によって有  
意差はなかった。活性酸素産生能に関しても  
有意差はなかった。

また、サイトカイン産生能については IL1、  
IL3、IL4、IL13、INF 、 、 TNF について  
検討した。これらすべてで産生に有意な増加  
を認めなかったが BD31 由来の抗コフィリン 1  
抗体で INF の増加している傾向 (10  
IU/mL, /1×10<sup>7</sup>) を認ため、機能性を有してい  
る可能性が考えられた。残念ながらその他の

4 血清では INF は検出されず、抗コフィリン 1 抗体としての再現性がなかった。測定した抗コフィリン 1 抗体陽性者が 5 名と少なく、サイトカイン産生能についての評価は今後の課題として残された。さらに、ベーチェット病におけるサイトカイン産生能の意味についても検討が必要である。

#### (3) ベーチェット病の活動性、臨床症状と抗コフィリン 1 抗体との関連の解明

抗コフィリン抗体および抗コフィリン Fragment 抗体と臨床症状との関連について検討した。症状については口内炎の有無、陰部潰瘍の有無、結節性紅斑の有無、ぶどう膜炎の有無、関節痛の有無、ベーチェット病特殊型（神経、血管、腸管）の病型、これらの臨床症状と抗コフィリン 1 抗体との間には優位な関連は認めなかった。また、臨床データとしては WBC 数、好中球数、クレアチニンキナーゼ、C 反応蛋白、血清銅、IgG、IgM、IgA、IgD、について抗コフィリン 1 抗体との間に有意な関連は認めなかった。有意差はないものの 2 つ以上のコフィリン 1 Fragment に対して反応する抗体を持つ患者では赤血球沈降速度が亢進する傾向（5 検体中 3 検体が軽度亢進）があった。

#### (4) その他の解析

当初の計画では予定されていたコフィリン 1 抗体機能の抑制試験について機能検査で好中球の機能に対して優位な影響が認められなかったため、今後の研究課題として残された。

#### (5) まとめ

全体として一部のベーチェット病患者においてコフィリン 1 は複数のエピトープを持つことから主要抗原の一つであり、抗コフィリン抗体の存在が好中球に影響を与えている可能性が示唆された。今後の課題として好

中球機能に対する抗コフィリン抗体の影響では、抗コフィリン抗体の陽性者が少なかったため、さらなる症例数蓄積と検証が必要である。

#### 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 4 件)

1: Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol. 査読あり 2014 Jul-Aug;32(4 Suppl84):S9-19.

2: Uchida T, Nagai K, Sato T, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Kurokawa MS, Suematsu N, Okamoto K, Ozaki S, Kato T. Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. 査読あり J Proteomics. 2013 Oct 8;91:259-69. doi:10.1016/j.

3: Nagai K, Arito M, Takakuwa Y, Ooka S, Sato T, Kurokawa MS, Okamoto K, Uchida T, Suematsu N, Kato T. Altered posttranslational modification on U1 small nuclear ribonucleoprotein 68k in systemic autoimmune diseases detected by 2D Western blot. 査読あり Electrophoresis. 2012 Jul;33(13):2028-35. doi: 10.1002/elps.201200058.

4: Nakano H, Ooka S, Shibata T, Ogawa H, Ito H, Takakuwa Y, Tonooka K, Maeda A, Yamasaki Y, Kiyokawa T, Nagafuchi H, Yamada H, Ozaki S. Cutaneous polyarteritis nodosa associated with HLA-B39-positive undifferentiated spondyloarthritis in a Japanese patient. 査読あり Mod Rheumatol. 2012 Sep;22(5):783-6. doi: 10.1007/s10165-011-0576-7.

〔学会発表〕(計5件)

大岡正道、Autoantibodies to cofilin-1 in patients with Behçet's Disease : 16th International Conference on Behçet's Disease. 2014 9月18日、Paris, France.

大岡正道、甲状腺疾患における low density lipoprotein receptor-related protein2 に対する抗体のエピトープ検索 : 日本リウマチ学会総会 57 回、2013.4.18、国立京都国際会館・京都府

大岡正道、ベーチェット病患者における HLA-B27 関連 HLA 因子とその長期経過観察 : 日本リウマチ学会総会 57 回、2013.4.20、国立京都国際会館・京都府

大岡正道、プロテオミクスによるヒノキチオールのヒト細胞に対する影響の網羅的解析 : 日本リウマチ学会総会 56 回、2012.4.27、グランドプリンスホテル新高輪及び国際館パミール・東京

大岡正道、血管炎に対するミコフェノール酸モフェチルの有用性 : 日本リウマチ学会総会 56 回、2012.4.27、グランドプリンスホテル新高輪及び国際館パミール・東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大岡 正道 (OOKA, Seido)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 30367370