

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659402

研究課題名(和文) 分泌発現系 cDNAライブラリを用いた細胞性免疫責任抗原同定への新しいアプローチ法

研究課題名(英文) The establishment of new screening method using the secretory protein expression system for the investigation of the causative antigen of the disease mainly composed cell-mediated immune response.

研究代表者

江石 義信 (Eishi, Yoshinobu)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70151959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：アクネ菌分泌発現系ライブラリを作製し、本菌感作マウス細胞を用いて細胞性免疫反応を指標としたスクリーニングを施行した。計1132クローンに対しリンパ球刺激試験を行った結果1陽性クローンを得た。この組み換え蛋白はサルコイドーシス患者細胞には反応せず、疾病素因を有する患者細胞でのスクリーニングの必要性が生じた。患者細胞で同様の系を行ったが細胞数の観点から難航し、患者血漿を用いたスクリーニングで抗原候補を選別した後に細胞性免疫を確認することとした。その結果得られた5つの候補蛋白はアクネ菌感作マウスにおいて細胞性免疫反応を誘導することが確認された。現在患者における反応性を検証している。

研究成果の概要(英文)：We made Propionibacterium acnes secretory protein expression system and performed the screening using the cells from animals immunized with P. acnes and that system. We performed lymphocyte stimulation test against 1132 clones and got one positive clone. This recombinant protein did not, however, show a positive result with the cells from patients with sarcoidosis. We needed to perform screenings with the cells from patients with disease susceptibility rather than using cells from immunized animals. We then carried out the same system with patients' cells, but we encountered some difficulties due to the limited number. Therefore we executed the screening with patients' blood plasma instead for the first screening to select candidates for antigen. As a result, we had found 5 antigen candidates and have confirmed its induction to cell-mediated immune response with P. acnes immunized mice. Currently, we are validating their reactivity with the sarcoidosis patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：液性免疫反応 細胞性免疫反応

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスや鳥関連過敏性肺炎などの細胞性免疫反応を主体とする一部の疾患では、その診断に苦慮することも少なくなく、診断・治療法の確立のために責任抗原の同定が切望されている。

2. 研究の目的

(1) 細胞性免疫反応が主体であるサルコイドーシスの責任抗原を、原因菌と想定されているアクネ菌(*Propionibacterium acnes*)の分泌発現系ライブラリを用いて同定する手法の確立を目指した。

(2) また上記手法によるスクリーニングが困難であることが判明した後は、本症患者および健常人の血漿を用いて本菌の菌体成分に対し液性免疫反応の観点から疾患特異的な反応を見せる菌体成分の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) アクネ菌の cDNA 分泌発現系ライブラリを pBE-S ベクターを用いて作製し、本菌感作マウス細胞を用いてリンパ球刺激試験によるスクリーニングを施行した。感作マウスの stimulation index が 2 以上であり、かつ未感作マウスとの比が 2 倍以上であったクローンを陽性とした。陽性クローンについては挿入遺伝子を解析し、組み換え蛋白を作製した。

(2) 東京医科歯科大学医学部附属病院にてサルコイドーシスと組織診断された患者(53 例)および健常人ボランティア(36 例)の血漿を用いてアクネ菌破砕液を抗原とした western blot を施行した。これらの臨床検体を用いた解析を行うにあたっては、東京医科歯科大学医学部研究倫理審査委員会の承認を受けた。Western blot でサルコイドーシス患者・健常人ともに高率に陽性を認めた分子量のバンドについて、CBB 染色したアクリルアミドゲルからバンドを切り出し、飛行時間型質量分析計を用いて質量分析を行った。同定されたアクネ菌由来の蛋白について、pHUE プラスミド発現ベクターを用いて組み換え蛋白を作製した。

これらの組み換え蛋白を抗原として、アクネ菌感作マウス・未感作マウス血清およびサルコイドーシス患者・健常人血漿を用いた ELISA および両マウスリンパ節細胞および患者・健常人末梢血単核球を用いた ELISPOT assay を施行した。

4. 研究成果

(1) 作製した分泌発現系ライブラリはアクネ菌由来の遺伝子が正確なフレームでクローニングされている確率、さらにその遺伝子がコードする蛋白が分泌される割合が低率であった。計 1132 クローンに対しリンパ球刺激試験を施行し、得られた陽性クローンは 1 クローンのみであった。この陽性クローンは「PTS system マンノース特異的 IIB 複合体

(IIBC)」と同定された。IIBC の組み換え蛋白を作製しサルコイドーシス患者でリンパ球刺激試験を施行した結果、細胞性免疫反応は誘導されなかった。

これは組み換え蛋白が大腸菌内でアクネ菌と異なる糖修飾を受けるなど本来の蛋白と抗原性が異なることも考えられるが、感作マウスにおいて抗原となりえた蛋白の可能性もある。

(2) Western blot における陽性バンドは患者・健常人ともに IgG, A, M 各クラスとも 30-50 kDa 付近に多く見られた。患者群に特異的なバンドはなかった。

患者・健常人で高頻度に認められたバンドについては MALDI TOF-MS 解析により 5 種類の蛋白を同定した。これらの蛋白については組み換え蛋白を作製し、アクネ菌感作・未感作マウスおよびサルコイドーシス患者・健常人における液性免疫反応と、感作・未感作マウスおよび患者・健常人細胞を用いて細胞性免疫反応を検証した。

液性免疫反応は ELISA 法にて各蛋白に対する抗体価を測定した。アクネ菌感作マウスは未感作マウスと比較し、5 種類の蛋白すべてに対し有意に高い抗体価を示した。ヒト血漿では 2 種類の蛋白に対して患者群で有意に高い抗体価を示した。細胞性免疫反応は ELISPOT assay にて評価した。アクネ菌感作マウスは未感作マウスに比べ IFN γ 、IL-2 ともに高い反応を示す中、3 種類については強い反応を示した。患者では 4 例中 3 例にマウスで強い反応を示した 3 種類のうち 2 種類に対する反応を認めた。

本研究では“患者特異的に液性免疫を誘導する”ではなく、ヒトに抗原性を有するアクネ菌由来の蛋白を液性免疫反応から選別し細胞性免疫反応を評価した。宿主要因が存在する疾病の病因解明研究においては患者細胞に限りがある以上本研究のような工程を踏む必要がある。当初目指した細胞性免疫反応を指標としたスクリーニング法の確立には至らなかったが、サルコイドーシスの責任抗原同定へは前進したものと考えられる。

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 8 件)

1. Eishi Y. Etiologic Aspect of Sarcoidosis as an Allergic Endogenous Infection Caused by *Propionibacterium acnes*. Biomed Res Int. 査読有. Epub 2013 Jun 16. DOI: 10.1155/2013/935289.
2. Eishi Y. Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. Respir Investig. 査読有. 51(2):56-68, 2013. DOI: 10.1016/j.resinv.2013.01.001.
3. Minegishi K, Aikawa C, Furukawa A,

- Watanabe T, Nakano T, Ogura Y, Ohtsubo Y, Kurokawa K, Hayashi T, Maruyama F, Nakagawa I, Eishi Y. Complete Genome Sequence of a *Propionibacterium acnes* Isolate from a Sarcoidosis Patient. *Genome Announc.* 査読有. Epub 2013 Jan 15. DOI: 10.1128/genomeA.00016-12.
4. Matsuo Y, Mizoguchi F, Kohsaka H, Ito E, Eishi Y, Miyasaka N. Tocilizumab-induced immune complex glomerulonephritis in a patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 査読有. Jul;52(7):1341-3, 2013. DOI: 10.1093/rheumatology/kes403.
 5. Asahina A, Miura K, Saito I, Oshikata C, Ishii N, Eishi Y. Cutaneous sarcoidosis with livedoid lesions: evidence of the involvement of *Propionibacterium acnes*. *J Dermatol.* 査読有. 40(6):501-2, 2013. DOI: 10.1111/1346-8138.12120.
 6. Satoh F, Morita H, Tayama H, Inoue Y, Eishi Y, Yoshimura A. Renal Sarcoidosis With Limited Lung Manifestations Expressing *Propionibacterium acnes* Antigens in the Affected Tubulointerstitium. *Am J Med Sci.* 査読有. Sep;346(3):250-2, 2013. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31828bdf9f.
 7. 永川 博康, 山口 哲生, 青山 眞弓, 小西 建治, 安積 隆, 江石 義信. 急性の呼吸器症状と下肺野の浸潤陰影を呈した肺サルコイドーシスの 1 例. *日本呼吸器学会誌. 日本呼吸器学会誌*. 査読有. 2(3):244-248, 2013
 8. 黒崎 史朗, 坂東 政司, 武村 民子, 間藤 尚子, 山沢 英明, 江石 義信, 杉山 幸比古. 関節リウマチにサルコイドーシスを合併した 1 例. *日本呼吸器学会誌*. 査読有. 2(2): 128-133, 2013
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. 萬 巴里子, 馬場健太郎, 掛川 智也, 小川智永, 内田佳介, 古川あすか, 鈴木好美, 古澤晴彦, 江石 義信. MALDI TOF/MS 法を用いたアクネ菌由来サルコイドーシス責任抗原の同定. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 2. 鈴木 好美, 鈴木高成, 笠間健嗣, 江石 義信. サルコイドーシスと *Propionibacterium acnes* の Peptidoglycan との関連性を探る. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 3. 伊藤 智里, 古川あすか, 江石 義信. 細胞壁欠失型アクネ菌のマクロファージ細胞内における形態観察. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 4. 峰岸 佳菜, 古川あすか, 江石 義信. アクネ菌サルコイドーシス患者分離株の Multilocus Sequence Type および Insertion Sequence に関するゲノム解析. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 5. 掛川 智也, 飯田忠恒, 内田佳介, 古川あすか, 千葉明子, 友恵瑠子, 米山晶子, 鈴木好美, 武村民子, 江石 義信. サルコイドーシス病理診断における PAB 抗体および新規結核菌抗体の有用性の検討. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 6. 中村 輝子, 古川あすか, 江石 義信. *Propionibacterium acnes* 感染マクロファージにおけるオートファジー誘導に関する検討. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 7. 江石 義信. アクネ菌病因説に基づくサルコイドーシスの治療戦略. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 8. 松風綾香, 白井剛, 古川あすか, 内田佳介, 古澤春彦, 宮崎泰成, 稲瀬直彦, 江石 義信. 鳥関連過敏性肺炎(鳥飼病)患者血清を用いたハト血清中責任抗原蛋白の同定. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25-26 日
 9. 浅川 直也, 榊原 守, 神谷 究, 山田 史郎, 吉谷 敬, 畑中 佳奈子, 筒井 裕之, 江石 義信. 臨床的に心サルコイドーシスを疑う症例における PAB 抗体陽性所見の検討. 第 61 回日本心臓病学会学術集会, 熊本, 2013 年 9 月 20-22 日
 10. 江石 義信. 全身臓器における適応とその破綻 サルコイドーシスのアクネ菌病因説. 第 17 回 日本適応医学会学術集会, 大宮, 2013 年 6 月 28-29 日
 11. 芝間 さやか, 宗次 太吉, 福山 國太郎, 西澤 綾, 井川 健, 横関 博雄, 三浦 圭子, 江石 義信. リベドを呈し、血管周囲性に肉芽腫を認めたサルコイドーシスの 1 例. 第 112 回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013 年 6 月 14-16 日
 12. 掛川 智也, 飯田 忠恒, 花尾 麻美, 井口 紘一郎, 古川 あすか, 内田 佳介, 鈴木 好美, 熊坂 利夫, 武村 民子, 江石 義信. 結核菌は抗酸性を失った状態で宿主免疫反応を回避している. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013 年 6 月 6-8 日
 13. 松永 佳子, 浅井 淳, 鈴木 沙和子, 油座 利貴, 田中 健一, 林 義満, 旭 浩一, 中山 昌明, 渡辺 毅, 江石 義信. 腎サルコ

- イドーシスの一例. 第56回日本腎臓学会
 学術総会, 東京, 2013年5月10-12日
14. 江石 義信. サルコイドーシス最新の病
 因論. 第53回日本呼吸器学会学術講演会,
 東京, 2013年4月19-21日
 15. 篠崎 友紀子, 田中 こずえ, 津田 浩昌,
 船田 信顕, 江石 義信. 筋生検で確定診
 断し得た脊髄サルコイドーシスの69歳
 女性例. 第54回日本神経学会学術大会,
 東京, 2013年5月29日-6月1日
 16. 新山 道大, 小野 昌美, 三木 伸泰, 鈴木
 薫, 渡辺 大輔, 森本 聡, 磯崎 収, 天野
 耕作, 小森 隆司, 岡田 芳和, 江石 義信,
 市原 淳弘. アクネ菌陽性の組織所見を伴
 った下垂体 Sarcoidosis の一例. 第86回
 日本内分泌学会学術総会, 仙台, 2013年
 4月25-27日
 17. 永田 健児, 丸山 和一, 米田 一仁, 江石
 義信, 木下 茂. 眼サルコイドーシスにお
 ける *Propionibacterium acnes* の関与に
 ついての検討. 第117回 日本眼科学会
 総会, 東京, 2013年4月4-7日

〔図書〕(計 7件)

1. Yoshinobu Eishi. Sarcoidosis. In Tech.
 Croatia. 290 pages, March 13, 2013
2. 江石 義信. アレルギー性内因性感染症
 としてのサルコイドーシスの病因論. 呼
 吸器内科. 科学評論社. 24巻3号,
 261-270頁, 2013年9月
3. 江石 義信. アレルギー性内因性感染症
 としてのサルコイドーシス. お茶の水医
 学雑誌. お茶の水医学会. 61巻3
 号, 259-276頁, 2013年8月
4. 江石 義信. 【間質性肺炎と周辺疾患-感染
 症から薬剤性まで-】サルコイドーシス
 の候補病原体としての
Propionibacterium acnes. 化学療法の
 領域. 医薬ジャーナル社. 29巻4号,
 649-658頁, 2013年3月
5. 江石 義信. サルコイドーシスの病因に
 ついて. 皮膚病診療. 協和企画. 35巻1号
 15-22頁, 2013年1月
6. 武村 民子, 江石 義信. サルコイドーシ
 ス 心・肺の病理学的特徴. 循環器内科.
 科学評論社. 74巻1号, 107-114頁, 2013
 年7月
7. 高瀬 博, 江石 義信. 【ぶどう膜炎の研究
 最前線 2013】あたらしい眼科. メデイ
 カル葵出版. 30巻3号, 313-319頁, 2013
 年3月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江石 義信 (EISHI YOSHINOBU)
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
 科・教授
 研究者番号：70151959