

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790368

研究課題名(和文) 関節リウマチの滑膜病変で産生される自己抗体の解析：「酵素抗原法」を活用して

研究課題名(英文) Analysis of the autoantibodies produced in the diseased synovial tissue in rheumatoid arthritis: The application of the enzyme-labeled antigen method

研究代表者

水谷 泰嘉 (Mizutani, Yasuyoshi)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：10546229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：「酵素抗原法」は、酵素やビオチンなどで標識した抗原を用いて、組織内の特異抗体産生細胞を可視化する組織化学的手法である。本研究では、酵素抗原法によって関節リウマチ病変滑膜における自己抗体産生細胞の証明を試みた。ヒトIgGに対する自己抗体を産生する形質細胞の可視化に成功した。一部のヒト抗原(FKBP4およびMAP1 LC3B)を免疫したラットのリンパ節で酵素抗原法を行ったところ、特異抗体産生細胞を確認できたが、ヒトのリウマチ滑膜では陰性だった。対象となる抗体産生細胞が病変部に局在していない可能性が示唆された。その他の自己抗原については病変部における抗体産生の可能性があるため、今後検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The enzyme-labeled antigen method is a histochemical technique that visualizes antigen-specific antibody producing cells in tissue sections with labeled antigens as probes. In the present study, we attempted to visualize the site of autoantibody production in the rheumatoid synovium with the enzyme-labeled antigen method. The plasma cells producing autoantibodies to human IgG were visualized in the synovial tissue sections. On the other hand, in the tissue sections of the lymph nodes of rats immunized with human autoantigens (FKBP4 and MAP1LC3B), the plasma cells producing antibodies to the immunized-antigens were visualized. But, in the synovial tissue, no positive cells were detected. These results suggest there are no plasma cells producing antibodies to autoantigens focused in the present study in the synovial tissues. Further studies are needed to demonstrate the plasma cells producing antibodies to the other autoantigens in the diseased synovial tissues.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：酵素抗原法 抗原特異的抗体産生細胞 関節リウマチ コムギ胚芽無細胞蛋白合成系 AlphaScreen

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチの真の原因は不明であり、治療には非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド、抗リウマチ薬、免疫抑制剤ないし抗 TNF- 抗体による対症療法が行われる。重度の関節障害では手術を要する場合があり、患者の生活の質を大きく低下させるため、原因解明と根治療法の確立が望まれる。

関節リウマチの病変滑膜局所には、多数の抗体産生細胞（形質細胞）が浸潤している。しかし、これらの形質細胞が産生する抗体が、どのような抗原に対するものなのかはほとんど明らかにされていない。病変局所に浸潤することから、自己抗体など、リウマチの病態に関連した抗体を産生している可能性がある。そのため、これら病変部で産生される抗体の標的抗原を明らかにすれば、関節炎の成因となる自己抗原の同定など、病態解明に貢献できる可能性がある。

研究代表者が所属する藤田保健衛生大学医学部堤寛研究室の代表的な研究テーマ「酵素抗原法」は、酵素やビオチンなどで標識した抗原をプローブとして組織切片と反応させることによって、組織内の特異抗体産生細胞を可視化する組織化学的手法である。標識抗体を用いる免疫染色（酵素抗体法）の裏返しの方法である。この方法により、病変局所における特異抗体の産生部位を証明することができる。本技法を関節リウマチの滑膜病変へ応用できれば、関節滑膜病変で産生される自己抗体を可視化できる可能性がある。

これまでに研究代表者は、愛媛大学プロテオサイエンスセンター澤崎達也研究室（愛媛大澤崎研）と共同研究を行ってきた。愛媛大澤崎研では、コムギ胚芽抽出物を利用した無細胞タンパク合成法（コムギ無細胞系）を確立している（Endo Y, Sawasaki T. *Biotechnol Adv* 21(8):695-713, 2003）。この技術により、一度に多種類のタンパクを、cDNA から直接、短期間、高収量に全自動で合成することが可能である。大腸菌や細胞を用いたタンパク合成法と比較して、効率的（ μg オーダー）にタンパクを合成でき、無細胞系であるためタンパク精製が不要であり、抗原検索性のタンパクライブラリ構築のための有用な抗原供給源となる。さらに、アルファスクリーン法を用いた、ビオチン標識タンパクと血清抗体との抗原抗体反応を検出する簡便かつ高感度なシステムも確立している（Matsuoka et al. *J Proteome Res* 9:4264-4273, 2010）。

研究代表者らは、これら愛媛大澤崎研の技術と「酵素抗原法」を活用して、関節リウマチの病変滑膜で産生される抗体の標的抗原検索性の開発を行ってきた。具体的には、コムギ無細胞系により構築した 2183 種類のタンパクからなるビオチン化ヒト自己抗原ライブラリから、アルファスクリーン法によって、5 例の関節リウマチ患者の血清および滑膜組織抽出液が反応する自己抗原の同定を試みた。その結果、多数の自己抗原が組織抽

出液中の抗体と反応することが明らかとなった。それらの抗原のなかで特にシグナルの強い抗原 18 種類（ABCF1、FBX02、FKBP4、GABARAPL2、HIST1H1C、IMPACT、ING4、KCTD18、KIAA0409、MAP1LC3B、NOL1、PMVK、PNRC2、PRM2、S100A13、SRP19、TRIM21、ZNF207）をプローブとして、各患者の病変滑膜組織切片を対象に「酵素抗原法」を行ったところ、2 種類の抗原（TRIM21、FBX02）において、陽性形質細胞を認めた（Mizutani Y et al, *J Immunol method*, 31;387(1-2):57-70, 2013）。

これらの結果から、血清や組織抽出液を対象として、コムギ無細胞系、アルファスクリーン法および「酵素抗原法」を組み合わせることで、病変で産生される抗体の標的抗原の同定が可能であることを示すことができた。

しかしながら、アルファスクリーン法によってスクリーニングされた 18 種の自己抗原タンパクのうち、TRIM21 と FBX02 を除く 16 種のタンパクは、組織抽出液におけるアルファスクリーンの反応シグナルが高いにもかかわらず、滑膜組織において抗体産生細胞を確認できなかった。この原因については明らかにできず、さらなる検討が必要とされた。

2. 研究の目的

「酵素抗原法」は、酵素やビオチンなどで標識した抗原を組織切片と反応させて、組織内の特異抗体産生細胞を可視化する組織化学的手法である。本研究では、関節リウマチの病変滑膜における自己抗体産生細胞を「酵素抗原法」によって証明する。

これまでの検討でリウマチ性滑膜において抗体産生が示唆された自己抗原タンパクをビオチン標識プローブとする。病変滑膜に共通する抗体の標的抗原を検索する。リウマチ性滑膜に浸潤する抗体産生細胞が産生する抗体を、このような新しい視点から分析することを通して、診断や治療へ貢献することを到達目標とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫吸収試験の実施：これまでの研究において、酵素抗原法で陽性像の得られた抗原である TRIM21 および FBX02 について、未標識抗原と標識抗原の競合反応を利用した免疫吸収試験によって、各抗原に対する組織切片上の抗体の特異性を検証した。抗原タンパクのビオチン標識の検出には、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いた。

(2) 酵素抗原法の至適条件検索：先の吸収試験でアルファスクリーン用緩衝液により、染色性の改善が認められたことから、他の抗原でも染色性の改善が認められるかを検証した。対象抗原は、形質細胞浸潤が顕著な組織においてアルファスクリーンシグナルが比較的高値を示した HIST1H1C、KIAA0409、MAP1LC3B、PRM2 および SRP19 について実施し

た。

(3) 抗 IgG 抗体産生細胞の検索：関節リウマチでは、自己抗体として IgG 分子の Fc 部分に対する抗体、リウマトイドファクター (Rheumatoid factor) が血清中に高頻度に検出されることが報告されている。滑膜組織に浸潤する形質細胞の一部が、このリウマトイドファクターを産生している可能性が考えられた。そこで、このリウマトイドファクターの産生部位を可視化することを目的として、ビオチン標識したヒトガンマグロブリンおよび IgG をプローブとして酵素抗原法を行った。

(4) 特異抗原免疫ラットを用いた酵素抗原法の至適条件の検討

免疫用抗原タンパクの調製

滑膜組織において、染色対象となる特異抗体の産生がないことが疑われたことから、ヒト自己抗原をラットに免疫して、そのリンパ節の組織切片を陽性コントロールとして酵素抗原法を実施することを計画した。

滑膜組織抽出液を用いたアルファスクリーンにおいて、シグナル高値を示したが、酵素抗原法で陰性となった抗原のうち、コムギ無細胞系でタンパク合成効率の高い抗原を免疫用の抗原として調製するために選抜した。なお、過去に精製蛋白調整のため、5' 末端に 6x ヒスチジン (His) タグおよびビオチンリガーゼ (bls) 認識ペプチド配列の遺伝子配列を付加した後に pDONR221 ベクターへクローニングした抗原を選抜対象とした。その結果、FKBP4 および MAP1LC3B を免疫抗原として選抜した。また、FBX02 は、背景染色が強く、その改善の検討に使用できると考えられたため、あわせて免疫抗原として調製した。その他の抗原は、蛋白合成効率が不良のため、免疫抗原調製が困難であった。

アルファスクリーンに使用したタンパクは、N 末端に His タグおよび bls 認識ペプチド配列が付加されたタンパクであった。当初、His タグおよび bls 認識ペプチド付加タンパクをそのまま免疫抗原として調製することを試みたが、コムギ無細胞系によるタンパク合成効率が不良であったため、免疫抗原作製のための大量合成には不向きであることが判明した。そこで、His タグおよび bls 認識ペプチドの代用として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ配列を付加したタンパクを合成したところ、合成効率の改善が認められた。そのため、GST タグ標識タンパクを免疫用抗原として合成・精製した。

免疫抗原の調製は、合成したタンパクをグルタチオンセファロースゲルによるバッチ精製により、精製・濃縮した。また、His タグおよび bls 認識配列に対する抗体が産生される可能性が予測されたことから、これらのタグを除去した。この場合、免疫応答により GST タグに対する抗体を産生する形質細胞が

出現する可能性があるが、染色時に His-blstags タグ抗原タンパクをプローブに用いることで、GST 抗体産生細胞への反応は回避することができるかと想定された。

ラットへの免疫操作と材料採取

精製・濃縮した抗原をフロイントアジュバントと混合してエマルジョンを調製した後、ラットの四肢足底部へ 3 回皮下投与した。免疫操作終了後、ラットをイソフルラン麻酔により安楽死させ、採血を行った後、腋窩リンパ節を採取した。採取したリンパ節を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後、凍結切片を作製した。なお、動物実験の実施については、藤田保健衛生大学動物実験委員会より承認を得た (承認番号: M2172)。

血清 IgG 抗体の確認

各種抗原に対する免疫応答の確認のために、免疫動物の血清を用いて、エライザ (ELISA、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法により血清中の抗原特異的抗体の確認を行った。

酵素抗原法の実施

作製した凍結切片に対して、His タグとビオチンを標識した抗原タンパクをプローブとして、酵素抗原法を実施した。抗原の結合の検出には、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いた。さらに、未標識抗原と標識抗原との競合反応を利用した免疫吸収試験により、切片上の抗体の特異性を検証した。

4. 研究成果

(1) TRIM21 および FBX02 に対する切片上の抗体の吸収試験

TRIM21 において、滑膜組織切片に非標識抗原を事前に反応させることで、標識抗原による反応シグナルが減弱したことから、滑膜切片上の抗 TRIM21 抗体の特異性が確認できた。一方、FBX02 においては、事前に未標識抗原を反応させることで、標識抗原による背景染色が増大してしまい、特異性が評価できなかった。シグナルが検出できたアルファスクリーンと反応条件を近づけるために、アルファスクリーンで使用した緩衝液 (0.1 mol/l Tris-HCl, pH 8.0, 0.01% Tween 20 および 0.1% ウシ血清アルブミン) で抗原を希釈して吸収試験に用いたところ、背景染色の減弱が確認され、反応シグナルの減弱が確認でき、組織切片上の抗 FBX02 抗体の特異性を確認できた。

(2) FBX02 の吸収試験において、アルファスクリーン用緩衝液を使用することで良好な染色像が確認できたことから、他の抗原についても、アルファスクリーン用緩衝液で染色性改善の可能性が期待された。しかし残念ながら、各抗原において染色性の改善は認めら

れなかった。

(3) 抗 IgG 抗体産生細胞の検出：関節リウマチではリウマトイドファクター・抗 IgG 抗体が血清中に検出されることが報告されている。そこで、ヒトガンマグロブリンをビオチン化して、これをプローブとして酵素抗原法を実施した。その結果、陽性シグナルを示す形質細胞が複数認められた。さらに、ビオチン化ヒト IgG をプローブとして酵素抗原法を実施したところ、滑膜組織上に陽性形質細胞を検出することができた。しかし、プローブとして用いた IgG の Fab 部分が形質細胞成分に反応した可能性や、リウマトイドファクターが IgG の Fc 部分に対する抗体であることから、今後、Fc 部分のみのプローブで検討を重ねる必要がある。また、吸収試験は実施できておらず、特異性の検証も必要であるが、リウマチ滑膜病変において、抗 IgG 自己抗体産生細胞を可視化することができたと考えられる。

(4) 抗原免疫ラットを用いた、酵素抗原法の至適条件の検討

ELISA による血清抗体測定

免疫した各抗原をウェルプレートに固相化した後、各抗原を免疫したラットの血清を反応させた。その結果、対応する抗原に対して高い反応シグナルが検出された(図1)。一方、免疫した抗原とは異なる抗原に対しても、弱い反応シグナルが検出された。これは、タンパク合成に使用したコムギ無細胞系のタンパクに対する抗体と考えられた。以上から、各種抗原に対する免疫応答が成立していることが確認された。

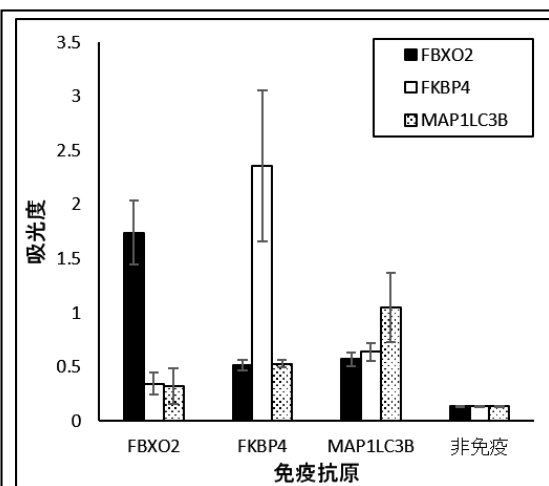


図1. 各種免疫抗原に対する血清 ELISA シグナル(n=3、平均値±標準偏差). 免疫抗原に対応する抗原で、反応シグナルが認められる。対応のない抗原においても比較的低いが反応シグナルが認められる。

また、本実験をとおして、コムギ無細胞系により合成したタンパクを固相化したエライザ解析が可能であることを示すこともで

きた。これは、今後のコムギ無細胞系を用いた研究へも応用できる手法である。

酵素抗原法および吸収試験の実施

各種抗原を免疫したラットリンパ節を対象に酵素抗原法を実施したところ、複数の陽性細胞が検出された(図2)。免疫抗原とは異なる抗原で酵素抗原法を行った場合は、FBXO2 では背景染色が見られたが、他の抗原では陽性細胞は検出されなかった。また組織切片上の抗体活性の賦活化処理として、これまでと同様に、プロテイナーゼK処理が有効であることが明らかとなった。

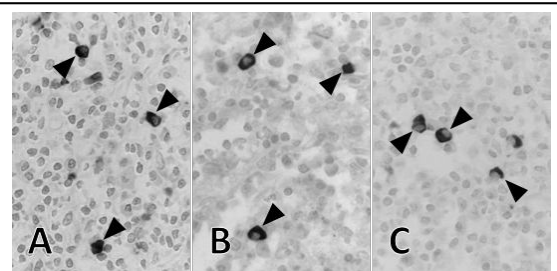


図2. 各種抗原をプローブとした酵素抗原法。(A) FBXO2、(B) FKBP4、(C) MAP1LC3B に対する抗体を産生する形質細胞が認められる。

一方、吸収試験として、各種標識抗原と対応する未標識抗原を混合して、ラットリンパ節で酵素抗原法を実施したところ、未標識抗原を混合しなかった場合と比較して、染色シグナルの減弱が確認された。したがって、各組織切片上の抗体の特異性を確認することができた。

免疫ラット組織では、プロテイナーゼK処理で良好な染色像を観察できたにも関わらず、同様の染色手法でリウマチ滑膜では陰性となることから、FKBP4 および MAP1LC3B においては、これら抗原に対する抗体産生細胞が滑膜組織内に浸潤していない可能性が強く示唆された。

(5) 研究の総括と今後の展望

ラットでの検討により、今回対象とした FKBP4、MAP1LC3B については、滑膜組織における抗体産生細胞が局在していない可能性が示唆された。しかし、その他の抗原については、滑膜組織における抗体産生細胞の局在の可能性は否定できていない。これまでの検討において、アルファスクリーンで比較的高値を示し、酵素抗原法では背景染色が強かった自己抗原タンパクである HIST1H1C や KIAA0409、PRM2 などは、コムギ無細胞系におけるタンパク合成効率が低かったため、免疫用に抗原を調製するのは困難であった。そのため、これら抗原については、酵素抗原法で滑膜組織が陰性となる原因が、組織内に対象となる抗体を産生する形質細胞が存在しないためなのか、染色条件の問題なのか、未だに明らかにできていない。

現在、愛媛大澤崎研の協力を得て、新規タグを用いた酵素抗原法の増感法を検討中である。これまでは、組織切片上の形質細胞に結合したタンパクのビオチン標識を、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで検出する方法（間接法）を採用してきた。しかしながら、この方法では合成タンパクへのビオチンの標識効率が100%ではないことや、現在用いている検出方法が間接法という比較的低感度な手法のため、総合的な検出感度が低いと考えられる。アミノ酸ポリマー法など、より高感度な検出系に切り替えることができれば、現在、酵素抗原法で陰性の抗原タンパクや背景染色が強すぎて判別困難となっている抗原タンパクについて、良好な陽性反応を検出することができるようになるかもしれない。

増感法の検証は、今回の研究で作製した抗原免疫ラットの組織切片を陽性コントロールとして用いた検討が可能である。現在、これらラット組織組織を用いて、新規タグを付加した抗原タンパクをプローブとした酵素抗原法を検討中である。うまくいけば、臨床材料へ応用する予定である。パラフィン切片へも応用できる可能性があり、酵素抗原法の応用範囲を一気に拡大できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mizutani Y, Matsuoka K, Takeda H, Shiogama K, Inada K, Hayakawa K, Yamada H, Miyazaki T, Sawasaki T, Endo Y, Yutaka Tsutsumi. Novel approach to identifying autoantibodies in rheumatoid synovitis with a biotinylated human autoantigen library and the enzyme-labeled antigen method. J Immunol Method. (査読有) 387:57-70, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.09.011>

〔学会発表〕(計3件)

堤寛、水谷泰嘉。「酵素抗原法」～ビオチン標識抗原で特異抗体産生細胞の局在をみる！～.第54回日本組織細胞化学会総会・学術集会.2013年9月27、28日.航空会館(東京都)

水谷 泰嘉、塩竈 和也、尾之内 高慶、稲田 健一、堤 寛.感染病変局所に浸潤する特異抗体産生細胞の解析：酵素抗原法による抗病原菌抗体産生形質細胞の局在証明.第102回日本病理学会総会.2013年6月6～8日.ロイトン札幌(札幌市)
Mizutani Y, Shiogama K, Onouchi T, Inada KI, Tsutsumi Y. Visualization of Plasma Cells Producing Disease-specific Antibodies with the Enzyme-labeled Antigen Method. 14th International Congress of

Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2012), August 26-29, 2012, Kyoto, Japan. Young Histochemist award.

〔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〕

ホームページ等

藤田保健衛生大学医学部第一病理学ホームページ:

<http://info.fujita-hu.ac.jp/pathology1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷 泰嘉(MIZUTANI, Yasuyoshi)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号:10546229

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし