

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790555

研究課題名(和文)自己免疫性膵炎・胃炎における新しい疾患マーカー自己抗体の探索同定と検査法の開発

研究課題名(英文) Identification of Autoantibodies in Patients with Autoimmune Gastro-Pancreatitis and Development of Screening Assay System

研究代表者

栗崎 宏憲 (KURISAKI, HIRONORI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70403962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で、Aire KOマウスの膵臓外分泌細胞に発現しているpdia2に対する自己抗体を同定した。そこで、Aire KOマウスの胸腺におけるpdia2のmRNA発現量を検討したが、pdia2を検出することは困難であった。一方、その他の標的抗原の探索を行い、複数の臓器に自己抗体と反応するタンパク抗原を確認できたため、今後、その抗原を同定する予定である。

ヒトの抗PDIA2自己抗体を検出する系を確立するため、ヒトPDIA2タンパク発現ベクターを作成し、目的とするタンパク発現ベクターを得ることができた。今後、より効率的なタンパクの大量精製の技術を確立する予定である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we identified an autoantibody for pdia2 which is expressed in pancreatic exocrine cells in Aire deficient mice. Although the expression level of pdia2 gene in the thymus of Aire deficient mice was studied, the expression of pdia2 gene was not detected. Other candidate target antigens for autoantibodies except pdia2 were detected using western blot analysis in brain, heart, liver, kidney, stomach and pancreas. We are further studying to identify the amino acid sequences of those target antigens.

In humans, in order to develop the system of anti-PDIA2 autoantibody, an expression vector of PDIA2 was constructed. By using several kinds of vectors and competent cells, an aimed protein expression vector was obtained. However, because there are problems on the efficiency of the purification method, additional experiments to improve the system in achieving a large amount of human PDIA2 antigen are underway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：自己免疫性膵炎 Aire

## 1. 研究開始当初の背景

近年、病因や病態に何らかの自己免疫現象の関与が示唆される膵炎の存在が明らかになってきており、ヒト自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis ; AIP) が注目されてきている。自己抗体の存在に関して、その標的細胞や標的抗原は未だ明らかになっていないが、膵管上皮細胞や腺房中心細胞レベルにおける膵管・腺房細胞が標的細胞である可能性や、標的抗原については疾患特異性に欠けるが、臨床例や動物モデルの検討から膵管上皮に分布する carbonic anhydrase (CA-)、腺房細胞に分布する lactoferrin や -fodrin, plasminogen binding protein (PBP) 等の可能性が示唆されている。このように自己免疫性膵炎患者であっても、多種多様な組織抗原が標的となっていると考えられており、自己免疫性膵炎の検査法および治療法の確立は難しいのが現状である。

また、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉性ジストロフィー (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy : APECED) は、常染色体劣性遺伝形式をとり、自己免疫疾患としてはきわめて珍しく単一の遺伝子異常によって発症する自己免疫病である。自己免疫調節遺伝子 (autoimmune regulator : AIRE) はこの疾患の原因遺伝子であり (K. Nagamine, et al, Nat Genet, vol. 17, 393-398, 1997)、この Aire ノックアウト (KO) マウスは、ヒトの APECED に類似した臓器特異的自己免疫疾患をきたすことが知られている。現在、BALB/cJ、C57BL/6J、SJL/J、NOD などの様々な系統で Aire KO マウスが作成されており、遺伝的背景により臓器障害の表現型が異なっていることが報告されている。

一方、これまでは BALB/cJ 背景の Aire KO マウスの膵臓における炎症像および自己抗体はないと報告されていた (Wenyu Jiang, et al, J. Exp. Med, vol.202, No.6, 805-815, 2005)。しかし、BALB/cAnN 背景 Aire KO マウスにおける病理組織学的観察の結果、4、6、12、24 週齢のいずれも著明な膵腺房組織へのリンパ球の浸潤や膵外分泌細胞の空胞化が観察され、ヒト自己免疫性膵炎に類似する病変およびこの病変が自己免疫に起因すると強く示唆される結果を得ることができた。

そこで western blot を実施した結果、BALB/cAnN 背景の Aire KO マウス血清中に膵臓・胃の組織抗原に特異的な自己抗体の存在が示唆された。続いて、western blot により検出された Aire KO マウス血清中の自己抗体の標的抗原を同定するため MALDI-TOF/TOF 法による質量分析を実施した。その結果、標的抗原は Protein disulfide isomerase A2 (pdia2、PDIP) である可能性がきわめて高いことが示唆された。さらに自己抗体陽性のマウス血清において高頻度に抗 pdia2 抗体が検出され、pdia2 は標的抗原であることが同

定された。

そこで pdia2 について、自己免疫性膵炎患者血清中に pdia2 に反応性をもつ自己抗体が検出される可能性があり、今後の臨床的な検討により、Aire KO マウスは自己免疫性膵炎のモデルマウスとしての意義が見いだされる可能性が高く、自己免疫性膵炎の発症メカニズムの解明に寄与できる可能性が高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究より、マウスにおける自己免疫性膵炎・胃炎の新しい候補マーカー自己抗体を見出した。そこでマウスにおけるさらなる標的抗原の探索と、ヒトに応用するべく患者検体のスクリーニング実施計画を立案した。

(1) Aire KO マウス血清中の自己抗体の標的抗原は、質量分析法で pdia2 と同定されており、その他にも存在が推察される標的抗原を探索。

(2) ヒトの自己免疫性膵炎・胃炎の新マーカーとしての自己抗体 (抗 PDIA2 抗体) を検出する系の確立とスクリーニングの実施。

## 3. 研究の方法

### (1) Aire KO マウスにおける検討

胸腺における pdia2 の mRNA 発現量の変化  
Aire KO マウスおよび WT マウスにおける胸腺での pdia2 mRNA 量を測定比較する。これまでに Aire KO マウスの胸腺における末梢組織特異的遺伝子群の異所性発現リストはすでに報告されており (Mark S. Anderson, et al. Science, vol.298, No.15 1395-1401, 2002)、その報告に基づき、RT-PCR 法で比較検討する。

その他の標的抗原の探索

pdia2 を探索した場合と同様の方法で他の臓器におけるバンドについても質量分析法を用いて実施し、新たな標的抗原を探索する。

### (2) 患者血清を用いたスクリーニング

ヒト PDIA2 タンパクの精製  
ヒト PDIA2 タンパク発現ベクターを作成し、スクリーニングを実施する際に使用可能な抗原タンパクを入手する。また、発現タンパクの精製のために His タグもしくは GST タグを付加し、タンパクの精製を簡便に行えるようにする。

患者検体中の自己抗体検出方法の確立  
スクリーニング法として western blot もしくは ELISA の検出系の開発を行う。

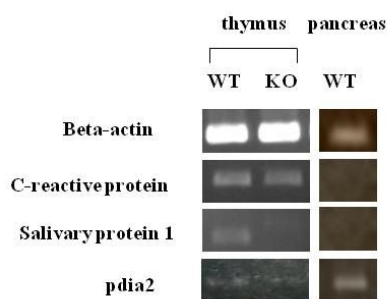
スクリーニングの実施

## 4. 研究成果

### (1) Aire KO マウスにおける検討

胸腺における pdia2 の mRNA 発現量の変化  
末梢組織特異抗原の異所性発現を調べるため、Aire KO および WT の胸腺、膵臓の RT-PCR

を実施した。PCR 反応系のコントロールとして、 $\beta$ -actin、C-reactive protein、salivary protein 1 を用いた。

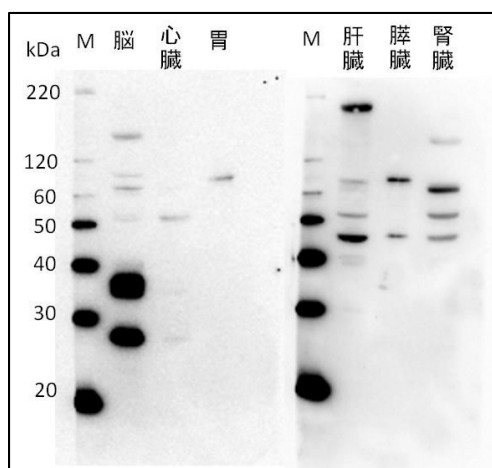


(Hironori Kurisaki, Yukihiko Nagao, Seiho Nagafuchi, Masao Mitsuyama, Autoimmune Gastro-Pancreatitis with Anti-Protein Disulfide Isomerase-Associated 2 Autoantibody in Aire-Deficient BALB/cAnN Mice, PLoS ONE, 8(8), 2013, DOI 10.1371)

これらの遺伝子のうち、 $\beta$ -actin と C-reactive protein は胸腺において KO、WT ともに発現があり、salivary protein 1 は KO では発現が認められず、WT でのみ発現しており、Anderson らの報告通りの結果となった。しかし、pdia2 は膵臓で確認されたが、胸腺においては KO、WT ともに発現量が非常に低く、またその差も認められなかった。そのため、BALB/cAnN マウスにおける pdia2 は、胸腺依存の中枢性トレランスというより末梢性トレランスが大きく関与しているのではないかと考えられた。

#### その他の標的抗原の探索

7 週齢の BALB/cAnN マウス (WT) を解剖し、脳、心臓、肺、胸腺、胃、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、卵巣の 10 臓器を HEPES および protease inhibitor 存在下でホモジナイズし、遠心分離した上清を臓器サンプルとして使用した。western blot では、24 週齢 Aire KO マウス血清 16 種からプール血清を作成し、これを 1 次抗体として使用した。



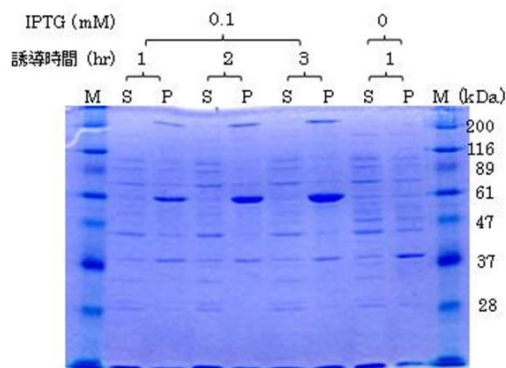
胃および膵臓においては、pdia2 と考えられるバンドの他に複数のバンドが確認され、その他の臓器である、脳、心臓、肝臓、腎臓にもバンドが確認された。

そこでこの各臓器で検出された自己抗体の標的抗原を同定するために、それぞれの臓

器サンプルを SDS-PAGE で分離し、一方を CBB 染色、もう一方は PVDF 膜を用いた western blot を実施した。今回、標的抗原の部分 8 種類を CBB 染色したゲルより切り出し、MALDI-TOF/TOF MS 分析を依頼した。その結果、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triosephosphate isomerase, carbamoyl-phosphate synthase, mitochondrial precursor, Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2, pancreatic carboxypeptidase B1 precursor, unnamed protein 等が新たに推定された。今後、これらのタンパク質が自己抗体の標的抗原であるか同定する必要性が出てきており、現在検討中である。

#### (2) 患者血清を用いたスクリーニング ヒト PDIA2 タンパクの精製

Gateway technology を用いてヒト PDIA2 cDNA を含む発現ベクター (pENT223.1) を pET300/NT-DEST ベクターに組み換えた。この発現ベクター (pET300/PDIA2) を competent cell へトランスフォーメーションし、Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) でタンパク質発現誘導を行った。いくつかの competent cell を用いて、IPTG の添加濃度、および誘導時間も含めて、検討を行ったところ、BL21 でタンパク質発現が確認された。



この発現誘導サンプルを western blot にて市販の Anti-PDIA2/PDIP 抗体を用いて検出すると、約 60 kDa 付近に PDIA2 の誘導を確認できた。また、発現タンパク質は His タグをつけて発現させているため、Ni カラムを利用して精製が可能であった。そこで ProBond™ Purification System (Life Technologies) を用いて精製を実施したが、精製効率が非常に低く、回収率の低下が認められた。したがって、Ni カラムの洗浄・溶出条件を検討する必要性があると考えられた。あるいは、最初の段階 (発現ベクターの選択、発現ベクターに適合した宿主の選定、組み換え大腸菌の培養と誘導条件) からの再検討も必要と考えられ、現在さらなるタンパク質発現に適した条件の検討を行っている。

患者検体中の自己抗体検出方法の確立およびスクリーニングの実施

で精製できたヒト PDIA2 タンパク質を用いて、western blot 法もしくは ELISA 法での検出方法を検討し、これまでに保存している、膵炎患者に限らず、各種疾患における患者血清を用いて、広くスクリーニングを行うことが、今後の検討課題として残されている。

#### 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1件)

Hironori Kurisaki, Yukihiro Nagao, Seiho Nagafuchi, Masao Mitsuyama, Autoimmune Gastro-Pancreatitis with Anti-Protein Disulfide Isomerase-Associated 2 Autoantibody in Aire-Deficient BALB/cAnN Mice, PLoS ONE, 査読有, 8(8), 2013, DOI 10.1371

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

栗崎 宏憲 (KURISAKI HIRONORI)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：70403962