

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670461

研究課題名(和文) AIRE研究を基盤とした新たな自己抗原(DI)に対する自己抗体の臨床的意義

研究課題名(英文) Clinical significance of anti-disulfide isomerase based on the AIRE research

研究代表者

永淵 正法 (Nagafuchi, Seiho)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00150441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫調節遺伝子(Aire)欠損マウスにおいて、自己免疫性膵炎が発症し、その標的抗原が、Disulfide Isomerase(DI)である知見(Plos One 2013)を基に、ヒト自己免疫性疾患患者血清を用いた大規模スクリーニングを実施した。人工的に作成したヒトDI抗原を用い、Western Blot法により自己抗体の検索を行った、自己免疫性膵炎、ブドウ膜炎、慢性胃炎(抗胃壁細胞抗体+)、慢性胃炎、GVHD、原発性胆汁性肝硬変、シェーグレン症候群、橋本病を合計200例検討したが、自己抗体の存在を検出することは、できなかった。今後、検査法の感度、特異度の改善が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Since we found auto antigen in Aire knockout mice associated with autoimmune pancreatitis was disulfide isomerase (DI), we conducted human anti-DI antibody detection study in various autoimmune diseases, including autoimmune pancreatitis, gastritis, primary biliary cirrhosis, sjogren syndrome and autoimmune retinitis. We developed western blot system as well as enzyme linked immunosorbent assay. we screened 200 cases, however, we could not detect any autoantibody. It was suggested improvement of assay system to detect anti-DI is essentially important and the study should be continued to solve the problems.

研究分野：臨床内科学

キーワード：自己免疫調節遺伝子 自己抗体 自己免疫疾患 Disulfide Isomerase

1. 研究開始当初の背景

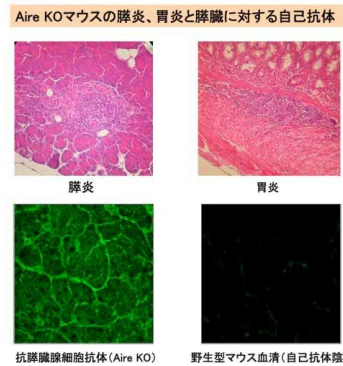
自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉性ジストロフィー (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy : APECED) は、常染色体劣性遺伝形式をとり、自己免疫疾患としてはきわめて珍しく単一の遺伝子異常によって発症する自己免疫病である。自己免疫調節遺伝子 (autoimmune regulator : AIRE) はこの疾患の原因遺伝子であり (Nat Genet 1997)、胸腺およびリンパ節に発現することから、中枢および末梢の免疫応答調節にかかわると推測されている。また AIRE 遺伝子は、免疫系の中核器官である胸腺の髄質上皮細胞において、末梢組織特異的遺伝子群の異所性発現に重要な役割を果たすことにより、自己免疫の制御に関わっていることが明らかとなった (Science 2002, Nat Immunol 2003)。

一方、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。その自己抗体の標的細胞や標的抗原は未だ明らかになっていないが、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 等を標的としている可能性が示唆されている。しかしながら、特異的疾患マーカーとしての自己抗体、また病態の解明は進行していない。また、多くの自己免疫疾患群や移植後の移植片対宿主応答病の対応抗原は明らかになっていない。

Aire ノックアウト (KO) マウスは、ヒトの APECED 類似の臓器特異的自己免疫疾患をきたすことが知られてるが、マウスの系統により臓器障害の表現型が異なり、従来、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 (JEM 2005)。

しかし今回、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および胃へのリンパ球の浸潤や膵外分泌細胞の空胞化を認め、ヒト自己免疫性膵炎・胃炎に類似する病変が存在していた (左図)。つまり、これまでの報告にはない、BALB/cAnN 背景の Aire KO マウ

ス膵臓と胃において、外分泌腺組織実質に及ぶ炎症像と著明な脂肪変性を確認できたため、この病変は、自己免疫に起因することが強く示唆された。

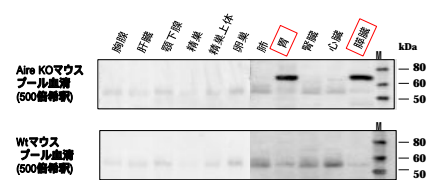


そこで Aire KO マウス血清中の自己抗体を検索することを目的に、マウスの各組織 (胸腺、肝臓、顎下腺、

精巣、精巣上体、卵巣、肺、胃、腎臓、心臓、膵臓) を抗原として用い Westernblotting を実施した。その結果、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 (下図)。

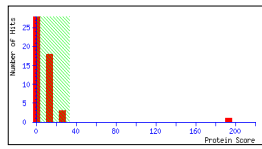
続いて、Westernblotting により検出された Aire KO マウス血清中の自己抗体の標的抗原を同定するため MALDI-TOF/TOF 法による質量分析を実施した。その結果、標的抗原は Protein Disulfide Isomerase A2 (Pdia2、PDIP) である可能性がきわめて高いことが示唆された (下図)。さらに自己抗体陽性のマウス血清において高頻度に抗 Pdia2 抗体が検出され、Pdia2 は標的抗原であることを確定することができた。

Western Blottingによる多臓器での自己抗体の検討



2次抗体: Anti-Mouse IgG(H&L) HRP-linked Antibody (Lot.15, Cell Signaling) 20,000倍希釈

## MALDI-TOF/TOF法による標的抗原の同定



検出された候補タンパクのなかで、信頼性のあるタンパクは一つのみであった。

候補として挙げられたタンパクの数とそのProtein Score

1	MDKQLLPLLL	LLLCVNSGNG	QCEPFGCPSE	VLPSFEPTCEE	VPRKNGILVL
51	NHRTLSLAQL	EHSALMVEFY	APWCGCKEL	AFVYSAAAL	LAESAVTL
101	AKVDCGALPE	LKKEEVGCV	PTLKPQNGN	ETNPERYAG	STARGDAWL
151	RKVPVCSYTH	LEKEDVQAL	MAWMDVYGF	PRGCDQMTF	LALAKVLDL
201	TYGFDQPOL	FERGELKDT	VVLFKRFDEG	RAQDFVQRY	GLDGLSERF
251	LRHSNHEHT	LEKEDVQAL	PAKULNHEL	LPYNDL	ASRHELLTQYR
301	APFRGQVLF	VMDVAADNS	HVLYNYGLKA	EGAPTELIN	VETTKVAPT
351	GHVATFAAN	AKCFVAWLR	EKRLVLSGE	IPFWQDQPP	KCLSKNSFR
401	VAFRETKVNF	VKPYAPACSH	CKEMAPAWA	LAERKRDRE	LVIAELDIA
451	VELEAFNPLG	VFFLEKFPAC	PKMVAIDVKS	TRDLETYRF	LDGGHLPRK
501	EPKPEAASAF	EQANSTLGP	KEEL		

質量分析の結果、標的抗原は PDIA2 (Protein disulfide isomerase A2) と強く推定される。

検出された peptide sequence  
Sequence coverage: 12%

## 2. 研究の目的

ヒト自己免疫性膵炎・胃炎は、自己抗体の存在は確認されるものの、標的細胞や標的抗原の全貌やその意義の詳細は、未だ明らかになっていない。一方、申請者は、Aire 欠損マウスにおいてこれまで報告のなかった自己免疫性膵炎と胃炎を新たに観察し、その標的抗原として Pdia2 (protein disulfide isomerase A2) を同定した。従って Aire KO マウスは自己免疫性膵炎および胃炎の優れた動物モデルであると考えられた。そこで、マウス実験結果をもとに、Pdia2 抗原に対する自己抗体がヒト自己免疫性膵炎・胃炎における新しい疾患マーカー自己抗体となりうる可能性が高と考えられ、また、より広く、そのほかの自己免疫疾患あるいは移植片対宿主応答を示す患者も対象に、血清を用いてのスクリーニングを行い、抗 Pdia2 自己抗体の疾患マーカーとしての意義、さらに発症メカニズムの解明を行うことを目的とした。

## 2. 研究の方法

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作製、精製する。なお、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しておく。その後、スクリーニング法として Western blot、ELISA、もしくは Immunoblot 法の検出系の開発を行う。抗 PDIA2 抗体測定法を確立するための検討を行った。

## 1. プール血清を用いた自己抗体の基礎的検討

### DI 抗原 (10ng)



予備的な検討として、精製した Disulfide Isomerase (DI) 抗原を 10ng、患者検体は 5  $\mu$ l、2 次抗体の希釈倍率 10000 倍の条件で、自己免疫膵炎、自己免疫肝炎、自己免疫疾患、骨髄移植を受けた血液腫瘍 (移植片対宿主病) など 100 例をプールした血清を用いてスクリーニング的な検討を行った。

その結果、western blot 法を用いて、55kDa に特異的と推定される自己抗体同定することができた (左図)。今後、自己抗体検査システムの改善とともに、特定の疾患別に DI 特異的自己抗体の探索・同定が必要であると考えられた。

## 2. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)、Western blot 法、Immunoblot 法

上記の予備的な検討結果から、既に開発を完了した、western blot 法による PDIA2 に対する自己抗体検査法に加えて、網羅的な抗体検査が可能であり、抗体のクラス、サブクラス検索が容易である酵素抗体法、あるいは、イムノプロット法による、多検体検査システムを開発する。抗 PDIA2 自己抗体検査システムとして、適切な検査系を確立するための実験を遂行した。

さらに、前年度開発したヒト PDIA2 スクリーニング法を用いて、特定の疾患群、および、幅広く、患者検体約 200 例のスクリーニングを実施した。対象として用いる血清は全て既に保存済み血清を用いた。具体的には、主たる対象のヒト自己免疫疾患患者については、九州大学病院肝臓・膵臓・胆道内科、松山赤十字病院内科、山口赤十字病院内科よりヒト膵炎患者血清 26 例の供与を受けた。一方、ヒトではマウスと標的臓器が異なる可能性もある。そこで、他の疾患でも、抗 PDIA2 抗体が認められる可能性を考慮して、自己抗体を検討する対象疾患の範囲を拡大し、内分泌疾患、また、自己免疫疾患や骨髄移植患者については、九州大学病院免疫・膠原病・感染症内科、血液・腫瘍内科入院患者保存血清約 1000 例を

使用して、大規模な自己抗体スクリーニングを行うことを目指した。

### 3. 研究成果

患者血清を用いた大規模スクリーニングを実施。作成した Disulfide Isomerase (DI) 抗原を 10ng/lane 用い、10%ポリアクリルアミドゲルの SDS-PAGE を実施。さらに、PVDF 膜へ転写し、これに一次抗体として、患者プール血清を用いて反応させた。この際、1 検体あたりの血清量は 5 $\mu$ l とし、各疾患毎にプール血清を作成。その後、希釈倍率を合わせた(1 検体あたり  $\times$  400 希釈相当)。なお、この時の疾患群として、自己免疫性膵炎、ブドウ膜炎、慢性胃炎(抗胃壁細胞抗体+)、慢性胃炎、GVHD、原発性胆汁性肝硬変、シェーグレン症候群、橋本病を合計 200 例程度選択した。二次抗体には、Amersham ECL Anti-Human IgG, Horse radish peroxidase-linked species-specific whole Antibody を  $\times$  10,000 希釈にて使用した。

今回の実験条件では、二次的スクリーニングは全例陰性という結果となった。用いた一次抗体がプール血清の状態であるため、一次抗体としての血清量(もしくは抗体力価)が不足、もしくは抗原としての DI 量が不足が考えられる。対処策としては、これらの Western blotting の条件設定の改善もしくは、Dot Blot 法へスクリーニング方法を変更することも検討すべきだと考えられる。さらにこの結果をうけて、高感度検出法である ELISA の検査系確立の重要性が認識されたため、この検査系を改善し、感度、特異度の優れた検査法の開発に取り組んでいる。

### 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)

Kurisasi H, Yukihiro Nagao Y, Nagafuchi S, Mitsuyama M.

Autoimmune gastro-pancreatitis with anti-protein disulfide isomerase-associated 2 autoantibody in Aire-deficient BALB/cAnN mice. PLoS One 8:e73862, 2013.

[学会発表](計3件)

1. Morita Y, Oda Y, Matsuo T, Kurisaki H, Katsuta H, Nagafuchi S. The role of TNF $\alpha$  pathway and microRNA in regulating autoimmune regulator gene expression and translation. Immunology 2013, The 100th Annual Meeting of the American Association of Immunologist (AAI) Honolulu, Hawaii, U.S.A. 2013.5.4

1. 森田賢史、栗崎宏憲、勝田仁、永淵正法. ヒト胸腺および末梢血における AIRE 遺伝子・蛋白の発現とその制御メカニズム. 第 54 回日本臨床ウイルス学会. 倉敷市. 2013.6.9

2. Morita Y, Matsuo T, Oda Y, Noguchi Y, Kurisaki H, Katsuta H, Nagafuchi S. Regulatory mechanisms of autoimmune regulator (AIRE) gene and protein expression in central and peripheral immune system. 73rd Annual Meeting of the American Association of Diabetes (ADA), Chicago. 2013.6.23.

[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

<http://www.shs.kyushu-u.ac.jp/nagafuchi/>

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

永淵 正法 (NAGAFUCHI, Seiho)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 00150441