

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05344

研究課題名(和文) 関節リウマチ特異的な免疫複合体のエピトープの精密特定と複合体形成制御薬の基礎開発

研究課題名(英文) Precise identification of epitope of immune complex antigen and development of inhibitory agent on their formation specific for rheumatoid arthritis

研究代表者

大山 要(OHYAMA, Kaname)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：50437860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫複合体抗原のエピトープ特定のため、免疫複合体から抗原のみを選択的に溶出する条件として、低pH溶出液で抗原を抗体から解離させ溶出する方法と、PapainでFabと抗原を溶出する方法を比較した。その結果、Papain溶出法が選択的に免疫複合体抗原を溶出できることがわかった。そして、エピトープ以外を免疫複合体から切り出すための酵素消化の検討を行った結果、トリプシンとLys-Cを用いた二段階消化が適していることがわかった。本研究で確立した条件・手順をもとに実際の患者検体からTSP-1免疫複合体を回収し、内標準を参考に関節リウマチでのエピトープの精密特定を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は関節リウマチでおきる異常な免疫反応の根本原因と考えられるタンパク質の異常部位(エピトープ)を全く新しい方法で決定することを目指している。具体的には、患者体内でできる免疫複合体(異常なタンパク質と抗体が結合したもの)を直接調べて、エピトープを特定する。このエピトープを特定できれば、病気の根治だけでなく、従来の免疫抑制療法で危惧される感染症のリスクを回避する治療法の開発につながる可能性がある。今回の成果で、免疫複合体に含まれる異常なタンパク質のエピトープを特定するための解析条件を決めることができた。今後は、実際の患者の体内にある免疫複合体を使って、病気の原因となるエピトープの特定を進める。

研究成果の概要(英文)：To selectively detect circulating immune complex-antigens with enhanced sensitivity, in this study we compared two methods (low-pH elution and tryptic digestion; papain-digestion, elution, and tryptic digestion). Comparison showed that papain-digestion method provided the most selective and sensitive detection of CIC-antigens. Then, we investigated the condition that can selectively elute peptides not including epitope. As a result, the digestion procedure successively using trypsin and Lys-C was appropriate for the selective elution. Now, the study that recovers TSP-1 immune complexes from the patients with rheumatoid arthritis and identify their epitope is on-going.

研究分野：臨床化学

キーワード：免疫複合体 関節リウマチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患はその多くが難治性である。国内患者総数は 170 万人 (全世界で 7 千万人) で、がん患者総数 (152 万人) より多く、そのうちの 100 万人を関節リウマチ患者が占める。

関節リウマチでは「自己抗原を認識する自己抗体が産生され、これらが免疫複合体を形成することで過剰な炎症がおき組織が破壊される」と考えられている。このため、関節リウマチに特徴的な自己抗体が診断に利用されてきた。しかし、これらは免疫複合体を形成していないフリーの自己抗体の中から見つかっており、実際に体内で複合体を形成し病原性をもつのかは不明である。一方、TNF- α などの炎症性サイトカインを標的とする抗体医薬が優れた抗リウマチ効果を示している。しかし、この抗体医薬は発病の最終段階でおきる過剰な炎症を抑える対症療法であり、その一方で免疫反応を低下させるため感染症のリスクが高まる。つまり、これまでの研究は「関節リウマチの発病の上流を抑える」という根本的な問題を解決できていない。

申請者が独自に考案したイムノコンプレキソーム解析法は、体内で形成された免疫複合体中の自己抗原を質量分析装置で一斉に同定するもので、疾患群と非疾患群の自己抗原を比較すれば、疾患特異的な免疫複合体をつくる自己抗原 (以下、特異的自己抗原) を特定できる。申請者は本解析法で関節リウマチ患者 60 名とそれ以外の自己免疫疾患患者の血清を解析して、関節リウマチ患者のみで特異的自己抗原 (TSP-1) が高頻度 (80%以上) に検出されること、TSP-1 が血液検査陰性の早期患者の半分以上で検出されること、を発見した。

2. 研究の目的

本研究では TSP-1 の自己抗原化の原因となるエピトープを特定する。このエピトープが研究のカギとなる創薬標的であるため、独自の方法で精密に特定することを目指す。

具体的には、TSP-1 免疫複合体を患者血中からとりだし、TSP-1 のアミノ酸変異 (シトルリン化、アミノ酸置換や翻訳後修飾) 部位と、その部位を含むエピトープ領域 (エピトープとその前後の数残基) のアミノ酸配列を質量分析装置で決定する。

3. 研究の方法

患者の TSP-1 免疫複合体から、エピトープ領域 (エピトープとその前後の数残基) 以外を酵素消化で除去した後、エピトープ領域を抗体から解離・溶出させ、その領域のアミノ酸配列を質量分析装置で決定し、アミノ酸変異 (シトルリン化やアミノ酸置換) を調べる。なお、本実験は複数のエピトープの存在と翻訳後修飾の影響を想定して進める。具体的な方法を以下に記す。

TSP-1 とその既知の配列を認識するモノクローナル抗体 (作製済) でモデル免疫複合体を作製し、エピトープ領域決定の条件検討を行う。具体的には、抗体と結合しているエピトープ領域以外の配列が酵素消化される条件と、抗体からエピトープ領域を溶出させる条件を調べ、既知のエピトープを含む領域が検出できることを確認する。また、消化酵素は特定のアミノ酸で結合を切断するため、1 つの酵素で解析を進めると、エピトープ領域が長くなり、後の実験が煩雑になる可能性がある。よって、TSP-1 に多く含まれるアミノ酸 (K, R, D, E, F) で結合を切る複数の消化酵素を使い、検出された各エピトープ領域のアミノ酸配列の共通部分から最終的なエピトープ領域を決定する。なお、エピトープ領域以外の酵素消化に成功した論文 (Przybylski, PNAS 1990; Nat Med 2002) を参考に進める。最後に、モデル免疫複合体を添加した血清から既知のエピトープ領域が検出されることを確認する。

イムノコンプレキソーム解析で TSP-1 陽性となった患者 (50 例) のうち、TSP-1 由来ペプチドが 5 個以上検出された患者 (28 例、免疫複合体の量が多いと予想) の血清から TSP-1 免疫複合体を取り出し、実際のエピトープ領域、アミノ酸変異部位とその変異の種類を決定する。関節リウマチではタンパク質のシトルリン化 (アルギニンが非コードアミノ酸のシトルリンに変換) が自己抗原化の要因とされるが、実際に疾患につながるかは不明である。TSP-1 のエピトープ領域にシトルリンがあれば、病原性シトルリン化自己抗原が同定されたことになる。

4. 研究成果

免疫複合体抗原のエピトープを特定するには、免疫複合体抗原をより選択的・高感度に検出するために免疫複合体から抗原のみを選択的に溶出できる必要があると考えた。そこでまず、回収した免疫複合体の抗原部分のみを選択的に溶出させる溶出条件の検討を行った。具体的には、従来法 (A) に加え、過去の文献 (Yarmush, Biotechnol Prog 1992; Moorhouse, J Pharm Biomed Anal 1997) を参考に pH の低い溶出液を用いて抗原-抗体を解離させ抗原を溶出する方法 (B) と、パパインで抗体のヒンジ部分を切断し、Fab と抗原を溶出する方法 (C) を比較検討した。なお、ここでの検討には免疫複合体モデル (Myoglobin, 抗 Myoglobin 抗体) とヒト血清を用いた。

免疫複合体モデルの結果から Papain 溶出法 (C) が最も選択的に免疫複合体抗原を溶出することがわかった。さらに、ヒト血清での検討においても、Papain 溶出法 (C) が多量に

含まれるタンパク質の影響を受けることなく、最も選択的に免疫複合体抗原を溶出し、これまで検出できなかった微量な免疫複合体抗原も検出できることが分かった。この検討結果を検証する目的で、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の唾液検体の解析を行ったところ、既知の免疫複合体抗原に加え、未知の免疫複合体抗原を検出することに成功した。また、脳脊髄液の解析でも疾患特異的な免疫複合体抗原を特定することができた。一連の結果から、タンパク量が非常に少ない検体からでも免疫複合体抗原を検出できることが示された。

ここまでの基礎検討を踏まえ、TSP-1ならびにThrombin・Albumin(内標準)のエピトープを特定する検討を行った。免疫複合体中で抗体と結合する抗原のエピトープ領域以外を切断する消化酵素にはトリプシン、Lys-CおよびGlu-Cを採用し、これらを一度に使用する一斉消化、またはそれぞれの酵素消化を段階的に行う多段階消化について比較検討した。このなかで多段階消化については、使用する消化酵素の順番についても検討した。なお、ここでの検討は既報(Przybylski, PNAS 1990; Nat Med 2002)も参考に行った。その結果、エピトープ領域以外を消化し、ここで断片化されたエピトープ領域以外のペプチドを免疫複合体から除去するには、トリプシンとLys-Cの組合せが適していることがわかった。続いて、抗体の抗原決定基付近にあると予想されるエピトープ領域ペプチドの溶出を試みた。得られたトータルイオンクロマトグラムとベースピーククロマトグラムを確認したが、質量分析装置の検出感度以上のペプチド(エピトープに相当)シグナルは得られなかった。上記の基礎検討で認められた検出感度を考慮すると、モデル複合体の量が不十分であった可能性が考えられた。

今後は本研究で確立した条件・手順をもとに実際の患者検体(複合体量がより豊富な可能性のある)から再度、TSP-1免疫複合体を回収し、内標準を参考に関節リウマチでの疾患エピトープの精密特定を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- [1] N. Aibara, C. Kamohara, A.K. Chauhan, N. Kishikawa, Y. Miyata, M. Nakashima, N. Kuroda, K. Ohyama: Selective, sensitive and comprehensive detection of immune complex antigens by immune complexome analysis with papain-digestion and elution. *Journal of Immunological Methods*, **461**, 85-90 (2018), 査読有, doi: 10.1016/j.jim.2018.06.021
- [2] N. Aibara, K. Ichinose, M. Baba, H. Nakajima, K. Satoh, R. Atarashi, N. Kishikawa, N. Nishida, A. Kawakami, N. Kuroda, K. Ohyama: Proteomic approach to profiling immune complex antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with central nervous system autoimmune diseases. *Clinica Chimica Acta*, **484**, 26-31 (2018), 査読有, doi: 10.1016/j.cca.2018.05.026
- [3] N. Aibara, K. Ohyama, M. Hidaka, N. Kishikawa, Y. Miyata, M. Takatsuki, S. Eguchi, N. Kuroda: Immuno complexome analysis of antigens in circulating immune complexes from patients with acute cellular rejection after living donor liver transplantation. *Transplant Immunology*, **48**, 60-64 (2018), 査読有, doi: 10.1016/j.trim.2018.02.011
- [4] K. Ichinose, K. Ohyama, K. Furukawa, O. Higuchi, A. Mukaino, K. Satoh, S. Nakane, T. Shimizu, M. Umeda, S. Fukui, A. Nishino, H. Nakajima, T. Koga, S. Kawashiri, N. Iwamoto, M. Tamai, H. Nakamura, T. Origuchi, M. Yoshida, N. Kuroda, A. Kawakami: Novel anti-suprabasin antibodies may contribute to the pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, **193**, 123-130 (2018), 査読有, doi: 10.1016/j.clim.2017.11.006
- [5] K. Ohyama, H. Yoshimi, N. Aibara, Y. Nakamura, Y. Miyata, H. Sakai, F. Fujita, Y. Imaizumi, A.K. Chauhan, N. Kishikawa, N. Kuroda: Immune complexome analysis reveals specific and frequent presence of immune complex antigens in lung cancer patients: A pilot study. *International Journal of Cancer*, **140**, 370-380 (2017), 査読有, doi: 10.1002/ijc.30455

〔学会発表〕(計 4 件)

- [1] 大山 要: 臨床系教員が薬学の強みを意識して考える医師・薬剤師との共同研究(シ

ンポジウム:臨床系教員による基礎と臨床双方向からの研究アプローチ-次世代を担う臨床系教員の研究のあり方-), 日本薬学会第 139 年会, 千葉, 2019 年 3 月

[2] 大山 要:強みを生かせばできる!基礎-臨床双方向の研究展開(シンポジウム:臨床系教員の研究の深化は可能か?-調査研究から“実験研究”への広がりを目指して-)(オーガナイザー、シンポジスト), 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018 年 3 月

[3] 相原希美, 蒲原千裕, Anil Chauhan, 岸川直哉, 中嶋幹郎, 黒田直敬, 大山 要:イムノコンプレキソーム解析法における免疫複合体抗原選択的な溶出法の検討, 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018 年 3 月

[4] 相原希美, 大山 要, 日高匡章, 岸川直哉, 黒田直敬:肝臓移植患者の血清中免疫複合体の網羅的解析, 第 41 回日本医用マスペクトル学会年会, 名古屋, 2016 年 9 月

〔図書〕(計 1 件)

[1] N. Aibara, K. Ohyama: Immune complexome analysis for identifying antigens in immune complexes, *Immunoproteomics: Methods and Protocols, Second Edition (Methods in Molecular Biology)*, Ed. by K.M. Fulton, S.M. Twine, Springer, in press

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

特になし。

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 稲嶺 達夫

ローマ字氏名: (INAMINE, Tatsuo)

所属研究機関名: 長崎大学

部局名: 医歯薬学総合研究科(薬学系)

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 00549628

研究分担者氏名: 一瀬 邦弘

ローマ字氏名: (ICHINOSE, Kunihiro)

所属研究機関名： 長崎大学
部局名： 医歯薬学総合研究科（医学系）
職名： 講師
研究者番号（8桁）： 60437895

研究分担者氏名： 岸川 直哉
ローマ字氏名： (KISHIKAWA, Naoya)
所属研究機関名： 長崎大学
部局名： 医歯薬学総合研究科（薬学系）
職名： 准教授
研究者番号（8桁）： 90336181

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。