

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06642

研究課題名(和文)新規自己抗体による高安動脈炎の病態解明と臨床応用

研究課題名(英文) Novel autoantibodies in Takayasu arteritis

研究代表者

白井 剛志 (Shirai, Tsuyoshi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20646997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：高安動脈炎における抗血管内皮細胞抗体(AECA)活性を測定し、SARFを用いて高安動脈炎における新規自己抗原の同定を行った。同定した2種類のAECAの測定系を確立し健常人、高安動脈炎患者、他膠原病患者における出現率を測定した。抗膜蛋白A抗体は高安動脈炎の36.9%で、抗膜蛋白B抗体は高安動脈炎の30.4%で検出された。他膠原病での検出はSLEにおいて4%程度で認めるのみで、これらの抗体は高安動脈炎に特異的な自己抗体であると考えられた。本検討では、巨細胞性動脈炎での検出は認めなかった。各自己抗体は比較的特徴的な臨床徴候を示しており、更にTNFによる血管内皮細胞活性化を増強させる効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We established a method to identify autoantigens expressed on the endothelial cell surface by using retroviral vector and flow cytometry (SARF), and identified two membrane proteins as novel autoantigens in Takayasu arteritis. Each of these novel autoantibodies were detected in 36.9% and 30.4% of patients with Takayasu arteritis. Meanwhile, they were rarely detected in other autoimmune diseases including giant cell arteritis, suggesting their high specificities in Takayasu arteritis. Each of these autoantibodies were correlated with specific clinical features and vascular lesions, thus it would be possible to subclassify Takayasu arteritis by these autoantibodies. Both of autoantibodies was further revealed to possess pathogenic roles including activation of endothelial cells upon stimulation by tumor necrosis factor (TNF).

研究分野：アレルギー・膠原病

キーワード：高安動脈炎 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

高安動脈炎は大動脈とその主要分枝に起こる慢性肉芽腫性血管炎であり、結果として大動脈の狭窄・閉塞・動脈瘤病変が形成され、生命予後に大きな影響を与える。罹患は若年女性に多く、特にアジア・東欧・南米における発症率が高いことが報告されており、他血管炎と比べても年齢・性別・地理的に特異的な特徴を有している。20%は単相性であるが、60%には慢性期であっても新規病変が出現、寛解後は20%に再燃がみられる。高安動脈炎は、症状、炎症反応、画像所見などにより総合的に診断されるが、疾患特異性のある血液検査はなく、炎症反応が陰性であっても病変が進行する事があることから、疾患活動性の判定が難しい。

現在考えられている高安動脈炎の病因としては、自然免疫細胞による急性炎症、Toll様受容体を介し活性化した樹状細胞において特定のMHCアレルのshared epitopeにより提示される抗原をT細胞が認識、Th1細胞がIFNを産生し巨細胞を形成、マクロファージを活性化し血管新生、血管平滑筋の遊走と内膜増殖することが挙げられる。更に、樹状細胞-B細胞の相互作用により抗血管内皮細胞抗体(anti-endothelial cell antibodies(AECA))が産生され、病変形成を促進していることが報告されてきた。現時点まで高安動脈炎におけるAECAの対応抗原は報告されておらず、この対応抗原を同定することにより、高安動脈炎の詳細な病態解析が可能となり、かつ疾患特異的な検査あるいは疾患活動性の評価へと臨床応用できる可能性が非常に高い。我々は膜蛋白自己抗原を特異的に同定できる発現クローニングシステム(SARF)を構築、高安動脈炎における自己抗体対応抗原の同定を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、同定した自己抗体による高安動脈炎の病変形成能の解明と、臨床応用に向けた自己抗体の病態・疾患特異性、活動性との相関を含む臨床的評価である。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーによる抗膜蛋白A、B抗体価測定系の樹立

フローサイトメトリー：膜蛋白A、BのcDNAをIRES-GFPベクターに挿入後、レトロウイルスを用いてラット骨髄腫細胞に移入することで、膜蛋白AまたはBを永続的に細胞表面に過剰発現する細胞を作成する。膜蛋白A、B発現細胞、非発現細胞両者を、希釈ヒト検体血清(1次抗体)、PE-抗ヒトIgG抗体(2次抗体)にて染色し、フローサイトメトリーにて蛍光強度を測定する。両者の相対的平均蛍光強度を算出し、基準抗膜蛋白A、B抗体

より作成した標準曲線を用いて自己抗体活性を測定する。

(2) 健常人、高安動脈炎、血管炎、膠原病患者での膜蛋白A、B抗体活性の測定

研究方法(1)に記載した系を用いて、高安動脈炎患者、他血管炎患者(巨細胞性動脈炎、結節性多発動脈炎、ANCA関連血管炎など)、他膠原病患者(SLE、シェーグレン症候群、筋炎、強皮症など)、健常人の血清中の抗膜蛋白抗体価を測定する。各々の群における各自己抗体の出現頻度、疾患活動性や臨床パラメーターとの相関の有無について解析する。

(3) 抗膜蛋白A、B抗体のリコンビナント蛋白による阻止試験とエピトープの同定

(4) (1)で樹立した測定系に異なる濃度のリコンビナント蛋白を添加し、抗膜蛋白A、B抗体の結合の特異性を確認する。より詳細なエピトープ決定を行うために、各ドメインを欠損する蛋白を作成する。

(5) 血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、免疫細胞における膜蛋白A、B発現の解析

膜蛋白Bは血管内皮細胞以外にも、マクロファージで重要な役割を果たしている事が知られている。このことより、抗膜蛋白A、B抗体が血管内皮細胞以外の細胞に作用することも十分に考えられるため、大動脈内皮細胞、腎糸球体内皮細胞といった内皮細胞の他に、血管平滑筋細胞、末梢血単核球、マクロファージにおいて、フローサイトメトリー、定量的PCRやウェスタンブロッティングを用いて細胞の膜蛋白A、B発現を定量する。

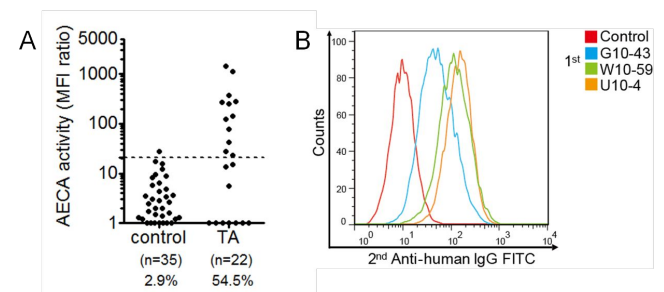
(6) 血管内皮細胞に対する抗膜蛋白A、B抗体の病的作用の解析

(7) 高安動脈炎における抗膜蛋白A、B抗体の病変形成能を検討するために、抗膜蛋白A、B抗体を血管内皮細胞と共培養することにより、血管内皮細胞機能(内皮細胞活性化(前炎症性サイトカイン分泌、接着分子発現、白血球遊走能)や血管新生作用)直接的な細胞傷害性、アポトーシス誘導の検討を行う。

4. 研究成果

高安動脈炎におけるAECA活性を測定し、自己抗原の同定を行うprototypeとなるAECAIgGを選択した。

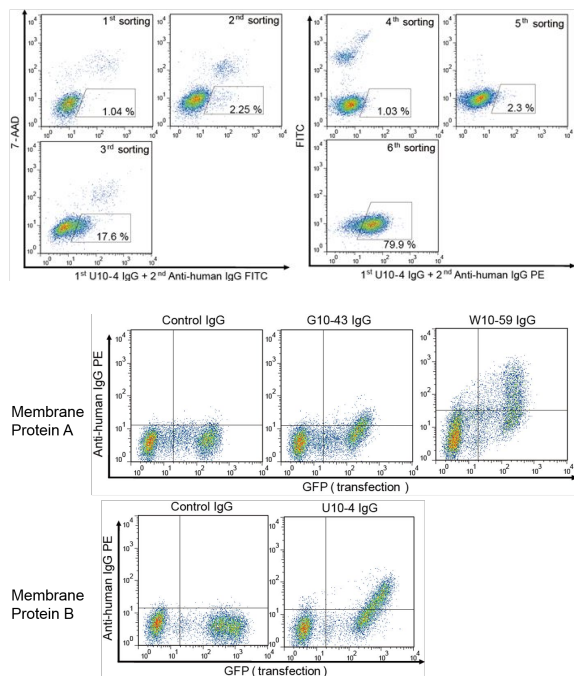
図1 高安動脈炎におけるAECA活性



続いて、SARFを用いて高安動脈炎における新

規自己抗原の同定を行った。

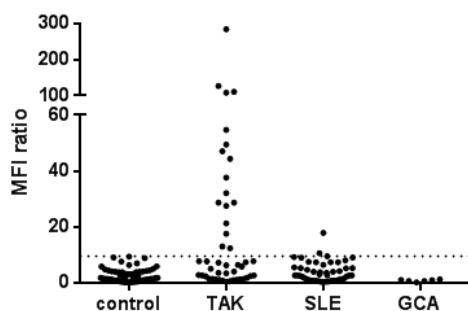
図2 SARF による高安動脈炎の同定



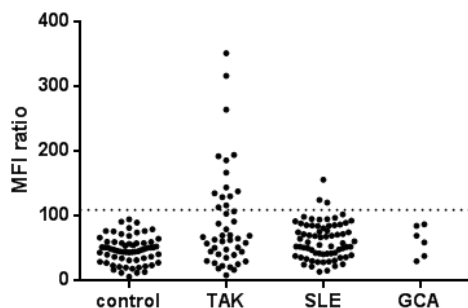
方法 に示す系を用いて同定した AECA の測定系を確立し健常人、高安動脈炎患者、全身性エリテマトーデス他、膠原病患者における AECA 活性を測定した。

図3 新規自己抗体の検出頻度

抗膜蛋白 A 抗体



抗膜蛋白 B 抗体



抗膜蛋白 A 抗体は高安動脈炎の 36.9%で、抗膜蛋白 B 抗体は高安動脈炎の 30.4%で検出された。他膠原病での検出は、全身性エリテマトーデスにおける 4%台以外では認めないことから、これらの抗体は高安動脈炎に特異的な自己抗体であることが考えられた。更に興味深いことに、大型血管炎の別系である、巨細胞性動脈炎での検出は認めなかった。現在、大型血管炎において、高安動脈炎と巨細胞性動脈炎の異同が議論されている。これらの自己抗体は、大型血管炎の分類においても重要な役割を果たす可能性が示唆される。

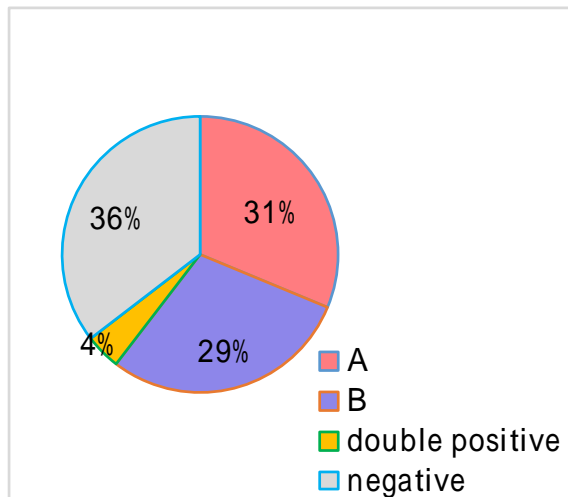


図4 高安動脈炎における自己抗体の割合

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 7 件) 全て査読有

1. Ishii Y, Shirai T, Hoshi Y, Fujita Y, Shiota Y, Fujii H, Ishii T, Harigae H. Nasal Septal Perforation in Propylthiouracil-Induced Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. Case Reports in Rheumatol. 2018, 8192021. Doi:10.1155/2018/819202.
2. Shirai T, Hanaoka R, Goto Y, Kojima I, Ishii Y, Hoshi Y, Fujita Y, Shiota Y, Fujii H, Ishii T, Harigae H. Takayasu Arteritis Coexisting with Sclerosing Osteomyelitis. Intern Med. 2018 Feb 9. doi: 10.2169/internalmedicine.0329-17.
3. Ishii T, Tanaka Y, Kawakami A, Saito K, Ichinose K, Fujii H, Shiota Y, Shirai T, Fujita Y, Watanabe R, Chiu SW, Yamaguchi T, Harigae H. Multicenter double-blind randomized controlled trial to evaluate the effectiveness and safety of bortezomib as a treatment for refractory systemic lupus

- erythematosus. *Mod Rheumatol*. 2018 Feb 15:1-7. doi: 10.1080/14397595.2018.1432331.
- Ojima Y, Sawada K, Fujii H, Shirai T, Saito A, Kagaya S, Aoki S, Takeuchi Y, Ishii T, Nagasawa T. Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis (AAV) Restricted to the Limbs: A Case Report. *Intern Med*. 2018 May 1;57(9):1301-1308. doi: 10.2169/internalmedicine.9848-17.
 - Ikeda T, Fujii H, Nose M, Kamogawa Y, Shirai T, Shiota Y, Ishii T, Harigae H. Bortezomib treatment induces a higher mortality rate in lupus model mice with a higher disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2017 Aug 11;19(1):187. doi: 10.1186/s13075-017-1397-7.
 - Watanabe R, Shirai T, Namkoong H, Zhang H, Berry GJ, Wallis BB, Schaefgen B, Harrison DG, Tremmel JA, Giacomini JC, Goronzy JJ, Weyand CM. Pyruvate controls the checkpoint inhibitor PD-L1 and suppresses T cell immunity. *J Clin Invest*. 2017 Jun 30;127(7):2725-2738. doi: 10.1172/JCI92167. Epub 2017 Jun 12.
 - Shirai T, Fujii H, Saito R, Nasu K, Kamogawa Y, Fukuhara N, Fujita Y, Shiota Y, Ishii T, Harigae H. Relapsing Polychondritis Complicated by Myelodysplastic Syndrome Is Resistant to Immunosuppression: Comment on the Article by Dion et al. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Mar;69(3):682-683. doi: 10.1002/art.39969. Epub 2017 Feb 2.

〔学会発表〕(計 4 件)

- Tsuyoshi Shirai, Hiroshi Fujii, Yuko Shiota, Tomonori Ishii and Hideo Harigae. Four-Distinct Phenotypes of Patients with Necrotizing Arteritis of Medium and Small Artery. 2017 ACR/ARHP Annual Meeting. 2017 年 11 月 7 日。サンディエゴ(アメリカ)
- 白井剛志、藤田洋子、城田祐子、藤井博司、石井智徳、張替秀郎。中小動脈を首座とする血管炎 47 例の臨床的検討。第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2017 年 4 月 22 日。福岡国際会議場/福岡国際センター(福岡市)
- Tsuyoshi Shirai, Hiroshi Fujii, Tomoyuki Muto, Yuko Shiota, Yoko Fujita, Tomonori Ishii, Hideo Harigae. Establishment of a Powerful Method to Identify Autoantigens Expressed on the Cell Surface. 2016 ACR Annual

Meeting. 2016 年 11 月 13 日。ワシントン(アメリカ)

- Tsuyoshi Shirai. An effective method to identify autoantigens expressed on the cell surface: SARF. The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity. 2016 年 10 月 11 日。ウエスティン都ホテル京都(京都市)

〔図書〕(計 1 件)

- 白井剛志、石井智徳。全身疾患における ANCA 測定の意義。ENTONI 217 号, 17-22, 2018。

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 高安動脈炎の診断方法、診断マーカー及び診断キット
発明者: 白井剛志、藤井博司、石井智徳、張替秀郎
権利者: 東北大学
種類: 特許
番号: 110000796
出願年月日: 平成 30 年 3 月 26 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
血液免疫病学分野ホームページ
<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
白井 剛志 (SHIRAI, Tsuyoshi)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 20646997