

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08998

研究課題名(和文) 自己抗原の翻訳後修飾異常を標的としたANCA関連血管炎の早期診断マーカーの開発

研究課題名(英文) Evaluation of alterations in post-translational modification of autoantigens as a novel early phase diagnostic marker for ANCA associated vasculitis.

研究代表者

永井 宏平 (Nagai, Kouhei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：70500578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ANCA関連血管炎患者の末梢血好中球における、自己抗原 Myeloperoxidase(MPO)の翻訳後修飾の解析を行った。ANCA関連血管炎患者8例と健常者8例の末梢血より好中球MPOを精製し、トリプシン消化した後に、高性能のLC-MSで解析した。その結果、MPO分子上の52種類の翻訳後修飾を同定することができた。そのうち、Carbamylationなどの複数の翻訳後修飾が患者群で有意に増加していることが示された。更に、翻訳後修飾を導入したマウスタンパク質をマウスに免疫することで、一時的に自己タンパク質に対する抗体価が上昇することを示し、翻訳後修飾異常と自己抗体産生の関係を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ANCA関連血管炎患者の体内の自己抗原タンパク質Myeloperoxidase (MPO) 上に、患者特異的な翻訳後修飾が存在することを初めて示した。更に、自己タンパク質の翻訳後修飾の異常が自己抗体を誘導しうることをマウスを用いた実験により示した。本研究結果は、ANCA関連血管炎における疾患発症機序の解明に寄与するだけでなく、MPOにおける患者特異的な翻訳後修飾が、自己抗体の産生に先駆ける現象として、ANCA関連血管炎の早期診断マーカーとして使用できる可能性を示したということで大きな社会的意義を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed post-translational modifications (PTMs) of autoantigen Myeloperoxidase (MPO) in peripheral blood neutrophils from patients with ANCA-related vasculitis. Neutrophil MPO was purified from peripheral blood of 8 patients with ANCA-related vasculitis and 8 healthy controls, digested with trypsin, and analyzed by high-performance LC-MS. Database search against human proteome database identified 52 PTMs on the MPO molecules. Among them, multiple post-translational modifications such as Carbamylation were significantly increased in the patient group. Furthermore, the immunization of mice with a post-translational modification-introduced mouse protein causes a temporary increase in the antibody titer against the self-protein. These results indicated the relationship between abnormal post-translational modification and autoantibody production.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：自己免疫疾患 ANCA関連血管炎 自己抗原 翻訳後修飾 膠原病 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎は、わが国で増加の著しい難治性疾患であり、全身の中小型血管の炎症と血中への自己抗体 ANCA の出現を特徴とする自己免疫疾患である。ANCA 関連血管炎には症状の異なる 4 疾患が含まれるが、日本では特に、好中球 Myeloperoxidase に対する自己抗体 (MPO-ANCA) の産生と微小血管の炎症を特徴とする顕微鏡的多発血管炎 (MPA) の患者数が多い。

近年、ステロイド剤と免疫抑制剤の併用療法などの治療法が確立され、ANCA 関連血管炎の予後は大きく改善された。そのため、ANCA 関連血管炎の発症初期に、他の炎症性疾患と鑑別して速やかに治療を開始することが、これまで以上に重要な意味を持ってきている。血中での ANCA の出現は、ANCA 関連血管炎の診断基準の一つとされているが、ANCA 陰性例も多く、特に発症初期で ANCA 陰性である場合には、他の炎症性疾患や血管疾患と区別して診断を確定することは非常に困難である。このため、従来の ANCA に加えて ANCA 関連血管炎の発症初期においても検出可能な早期診断マーカーが求められている。

2. 研究の目的

(1) 我々は、好中球 MPO が外来異物を排除するために ROS を産生すること、微生物感染が ANCA 関連血管炎の発症のきっかけとなる場合があることを考慮し、微生物感染により活性化された好中球内で MPO が自らが産生した ROS によって酸化修飾を受け、異常修飾 MPO が産生される。自己の免疫システムが、異常修飾を含む配列を外來異物と判断し、衣裝修飾 MPO に対する抗体を産生する。エピトープスプレッディングにより、正常な MPO も異物とみなされ MPO-ANCA が産生される、という説である。この仮説が正しければ、異常修飾 MPO は MPO-ANCA 産生に先立つ現象であることから、ANCA 関連血管炎の早期診断マーカーとして使用できる可能性がある。

そこで本研究では、ANCA 関連血管炎患者と健常者の好中球の MPO の翻訳後修飾を質量分析計で網羅的に解析し、患者特異的な修飾を発見を試みた。

(2) (1)の実験により MPO に患者特異的な修飾が発見されたとしても、その異常修飾が ANCA 産生に関わっているかどうかを証明したことにはならない。そこで本研究では、異常修飾自己タンパク質をマウスに免疫することで、自己抗体の産生を誘導できるかどうかを確認し、異常修飾と自己抗体産生の関係を証明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) ANCA 関連血管炎患者の好中球 MPO の網羅的な翻訳後修飾の解析

患者もしくは健常者の末梢血検体より常法により好中球を回収した。5% CTAB 含有酢酸緩衝液 (pH6.0) 内でホモジナイズし、全細胞抽出液を作成した後、透析によって CTAB を除去する。その後 ConA Sepharose カラムを用いて、糖タンパク質である MPO を粗精製した。粗精製画分中の MPO 量は、Western blot によるバンドの濃さを、MPO 標品の物と比較することで概算した。2.55 μg の MPO を含む粗精製画分をトリプシンで消化し、得られたペプチドを Ziptip を用いて脱塩・濃縮した。30 μL の 0.1% ギ酸溶液で溶解し、5 μL を LC-MS 解析に用いた。LC-MS 解析は、nanoLC に接続した TripleTOF 型質量分析計 (TripleTOF5600+システム, SCIEX 社) を用いて、Information-dependent analysis (IDA) 法による測定を行った。得られた MS データを、ProteinPilot ver 4.5 (SCIEX 社) を用いて、Uniprot human protein database に対して検索を行った。検索時には 300 種類以上の翻訳後修飾を考慮することで、網羅的な翻訳後修飾の同定を行った。

(2) 修飾導入した自己タンパク質の免疫による自己抗体産生の試み

マウス血清アルブミン (MSA) を PBS に 2.5 mg/mL となるように溶かした溶液に、2 μM の H_2O_2 と 10 μM の FeCl_2 を加え、37 度で 30 分間インキュベートすることで酸化修飾を導入した。その後アセトン沈殿によりタンパク質を沈殿させ風乾した後に、1 mL の生理食塩水に溶解した。調整された修飾導入 MSA を Freund コンプリートアジュバンドを 1:1 で混ぜてよく懸濁した後に、マウスに腹腔内に注射して免疫した。免疫するタンパク質量は 500 μg とした。1 回目の抗原投与をした日を day0 とし、day21 に 2 回目の抗原投与を行った。day0 の抗原投与前、day15, day30, day34 に採血を行い、血清を採取した。ELISA プレートに酸化 MSA、もしくは MSA を固相化した後に、希釈した血清を加え、血清中の抗酸化 MSA 抗体、抗 MSA 抗体価を HRP 結合抗ヒト IgG 抗体を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) ANCA 関連血管炎患者の好中球 MPO の網羅的な翻訳後修飾の解析

ヒト末梢血検体から、好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を ConA カラムを用いて粗精製し、トリプシン消化した後に高性能の nanoLC-MS 装置 (Sciex 社 TripleTOF5600+システム) で分析することで、カバー率 80%以上で MPO の配列を翻訳後修飾別に同定できるシステムを

構築することができた。本手法を用いて、MPO-ANCA 陽性患者 8 例と年齢と性別を合わせた健康者 8 例の MPO を解析した。その結果、すべての検体で 85%以上のカバー率で MPO の配列を解析できた。配列カバー率の平均は $88.3 \pm 1.5\%$ となり、検体による差がほとんど見られなかった。全部で 52 種類の翻訳後修飾が検出され、そのほとんどは Uniprot に登録されていない新規の修飾であった。また、52 種類の内には、19 種類の酸化修飾が含まれていた。ペプチドの検出回数 (カウント数) に基づいた判定量解析を試みた所、7 種類の修飾に有意な差がみられた。特に、Carbamyl 化は患者群でカウント数が 2 倍以上となり明白な差がみられた (図 1)。そこで、更に 2 本の Carbamyl 化ペプチド Carbamyl-QNQIAVDEIR、および、Carbamyl-FPTDQLTPDQER に注目し、親イオンの Extracted ion chromatography (XIC) のピーク面積 (図 2) を基に定量比較を行った。その結果、修飾ペプチド / 非修飾ペプチドのピーク面積の比率は、患者群で有意に増加していることが示された (図 3)。今後は、本 Carbamyl 化ペプチドの疾患マーカーとしての評価を更に進めると同時に、Carbamyl 化は腎機能生涯との関連が示されていることから、腎機能障害と ANCA 酸性との関連について研究を進める予定である。

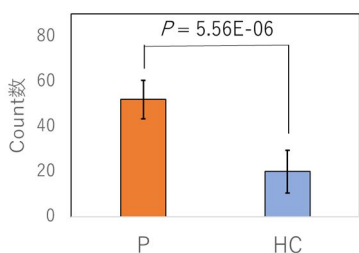


図1. Carbamyl化ペプチドのカウント数の比較。P: 患者、HC: 健康者

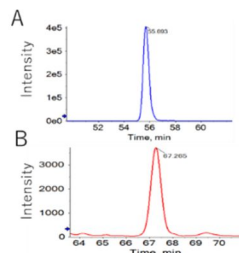


図2. XICによる修飾ペプチドの定量例
A: 非修飾MPOペプチドQNQIAVDEIR
B: Carbamyl化QNQIAVDEIR

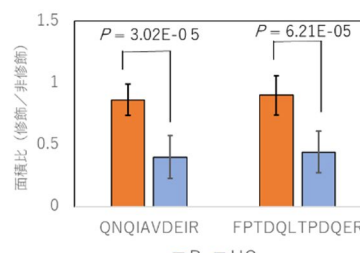


図3. Carbamyl化ペプチドの定量比較。P: 患者、HC: 健康者

(2) 修飾導入した自己タンパク質の免疫による自己抗体産生の試み

マウス血清アルブミン (MSA) と In vitro で酸化修飾を導入した MSA (酸化 MSA) を、それぞれ 5 匹の Balb/C マウスに免疫し、血清中の抗 MSA 抗体が産生されるかどうかを確認した。その結果、MSA を免疫した場合には抗 MSA 抗体の顕著な増加は見られなかったのに対し、酸化 MSA を免疫した場合には、一次免疫の直後に抗 MSA 抗体が顕著に増加し、MSA を免疫した場合と比べて有意な差が生じた。その後、2 回目の免疫によっても抗体価が上昇せず、Control 群との差は見られなくなった (図 4)。同じ実験を 2 回繰り返し、結果が再現されることが確認された。

ここから、酸化修飾 MSA をマウスの免疫システムが異物と見なしたことをきっかけとして、エピトープスプレディングがおき、一時的に自己抗体の産生が引き起こされたものの、その後自己免疫寛容のシステムが働き、自己抗体の産生が抑えられたと考えられた。本実験は、自己タンパク質の翻訳後修飾異常が自己抗体の産生を誘導しうることを示したことで重要な結果であると考えられる。また、一時的に増加した自己抗体価が減少していく過程で免疫システムに起きている現象を解析することで、自己免疫疾患の発症機構や、健康者と患者に存在する際を解析できる可能性がある。

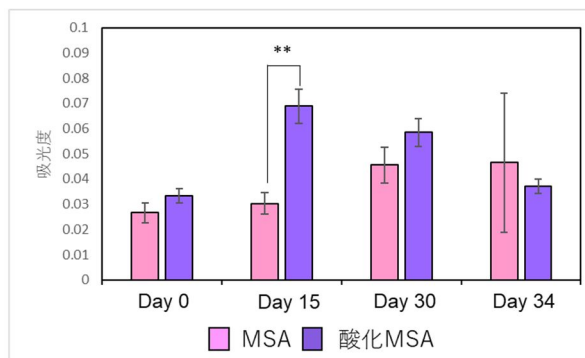


図4. 酸化MSAの免疫による抗MSA抗体価の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akane Hashimoto, Yutaro Onoue, Yukiko Jyogu, Megu Nishino, Manae S. Kurokawa, Tomohiro Kato, Kouhei Nagai
2. 発表標題 Identification and quantification of oxidative modifications that shifts isoelectric point of neutrophil myeloperoxidase
3. 学会等名 ConBIO2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木琳子, 永井宏平, 西端智也, 佐藤政秋, 佐藤利行, 黒川真奈絵, 加藤智啓
2. 発表標題 ANCA関連血管炎患者における自己抗原Myeloperoxidaseの翻訳後修飾の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	加藤 智啓 (Kato Tomohiro)		
研究協力者	黒川 真奈絵 (Kurokawa Manae)		