

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390260
 研究課題名（和文） 自己抗体と CLIP 置換型 Ii 鎖ライブラリーを利用した再生不良性貧血自己抗原の同定
 研究課題名（英文） Identification of novel auto-antibodies and corresponding antigens in patients with aplastic anemia using CLIP replacement Ii chain library
 研究代表者
 中尾 眞二（NAKAO SHINJI）
 金沢大学・医学系・教授
 研究者番号：70217660

研究成果の概要：

再生不良性貧血（再不貧）における新たな自己抗原を同定するため、造血幹細胞由来の蛋白を再不貧患者血清と反応させたところ、heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPK) に対する抗体が同定された。この抗 hnRNP 抗体は自己免疫性再生不良性貧血（再不貧）で高頻度に検出されることが明らかになった。この抗体は再不貧患者の約 30% に検出され、陽性患者では免疫抑制療法に対する反応性が、陰性患者に比べて有意に高かった。したがって本抗体は再不貧における免疫病態の良いマーカーと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2008 年度 | 5,800,000 | 1,740,000 | 7,540,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,300,000 | 3,990,000 | 17,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：再生不良性貧血，

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血（再不貧）は、造血幹細胞に対する T 細胞の攻撃によって発症する一種の自己免疫疾患と考えられているが、どのような抗原が自己免疫反応の標的となっているかは不明である。これが同定されれば、より特異的な免疫抑制療法の開発が可能となるだけでなく、自己抗体や抗原に特異的な T 細胞を検出することによって、再不貧や骨髓異形成症候群を含めた骨髓不全の免疫病態を正確に診断できるようになる可能性があ

る。われわれはこれまでに再不貧の自己抗原候補として、diazepam-binding inhibitor related sequence-1 (DRS-1) や、細胞膜裏打ち蛋白のモエシンを同定してきたが、これらの蛋白に対する自己抗体の陽性率は高々 20% 台であることから、さらに陽性率の高い自己抗体を同定する必要がある。また、もし造血幹細胞が優位に発現している蛋白が自己抗原として同定されれば、その抗原における CD4T 細胞のエピトープを CLIP 置換型 Ii 鎖ライブラリーを用いて同定できる可能性

がある。

一方、骨髄不全における免疫病態とマーカーとして最も信頼度が高いのは発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) PNH 型血球の増加であるが、この PNH 型血球が免疫病態のマーカーになり得るのは、骨髄不全が発症する前の骨髄において、*PIG-A* 遺伝子に変異を来した造血幹細胞が存在している例に限られる。このため、PNH 型血球の検出率が元々20%以下の小児例においては、PNH 型血球の検出を補完する別の免疫病態マーカーを同定する必要がある。

2. 研究の目的

再不貧における新たな自己抗原を同定するため、免疫病態が濃厚な発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 型陽性再不貧患者の血清と、白血病細胞株 UT-7 のライセートを用いて、造血血幹細胞由来の蛋白に対する自己抗体を検出する。

3. 研究の方法

白血病細胞株 UT-7 のライセートを二次元電気泳動で展開し、PNH 型血球陽性再不貧患者2例の血清を用いてウェスタンブロッティングを行い、患者血清中の IgG によって同定されるバンドを同定した。同定されたバンドを切り出し、質量分析を用いて蛋白を同定した。この蛋白の cDNA を用いてリコンビナント蛋白を作製し、ELISA により再不貧、骨髄異形成症候群 (MDS) 患者血清中の抗体価を測定した。同時に、DRS-1 とモエシンに対する抗体価も測定し、各抗体の相互関係を検討した。また、免疫抑制療法施行前の血清抗体価と、免疫抑制療法の奏効率との関係を検討した。

4. 研究成果

ウェスタンブロッティングの結果、患者血清と反応させたナイロン膜には、健康者由来の血清では認められない 65kD の特異的スポットが描出された (図1)。このスポットを切り出し、peptide mass fingerprinting によりアミノ酸配列を決定したところ、このス

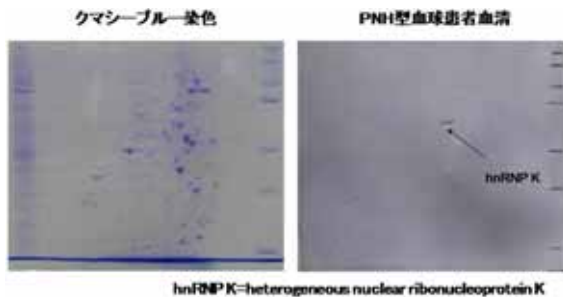


図1. ウェスタンブロッティングによる自己抗原の同定。スポットは heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP K) であることが判明した。hnRNP K の cDNA を用いてリコンビナントの hnRNP K 蛋白を作成し、この蛋白に対する患者血清中の特異的抗体の有無を ELISA

法により検討したところ、抗 hnRNP K 抗体は、発症後間もない PNH 型血球陽性骨髄不全 38 例中 13 例 (34.2%、再不貧 10 例、不応性貧血 3 例)、PNH 型血球陰性骨髄不全患者 53 例中 15 例 (30.6%、再不貧 8 例、不応性貧血 7 例) に検出された (図2)。

当初の研究計画では、新規に同定した自己抗原における T 細胞レセプターリガンドを、

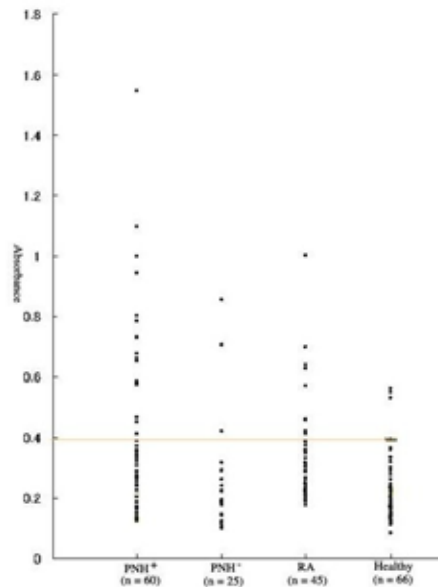


図2. ELISAによる抗hnRNP K抗体の検出

CLIP 置換型 li 鎖ライブラリーを用いて同定する予定であったが、同定した抗原蛋白が、多くの体細胞が発現している hnRNP K 蛋白であったため、計画を変更し、他の自己抗体との相互関係や、本抗体と骨髄不全の免疫病態との関係を検討することにした。

抗 hnRNP K 抗体の存在は、これまでにわれわれが同定した抗モエシン抗体 ($r=0.8318$)、抗 DRS-1 抗体 ($r=0.7206$) との間で有意な相関が認められた。抗 hnRNP K 抗体の有無を検索した 49 例 (再不貧 39 例、不応性貧血 10 例) が抗胸腺細胞グロブリン (ATG) とシクロスポリンによる免疫抑制療法を受けた。抗 hnRNP K 抗体が陽性であった 22 例は全例が治療に反応して改善したのに対し、抗 hnRNP K 抗体陰性の 27 例での奏効率は 37% であり、両群の間で免疫抑制療法に対する反応性に有意な差がみられた ($P<0.005$)。抗モエシン抗体、抗 DRS-1 抗体、抗 hnRNP K 抗体のうち、どれか一つでも陽性であった患者群における免疫抑制療法の奏効率は 95.6% であったが、いずれも陰性であった患者群の奏効率は 38.5% であった。

さらに抗 hnRNP K 抗体の存在が、PNH 型血球が検出されない骨髄不全例において、免疫抑制療法に対する反応性の予測因子になり得るかどうかを明らかにするため、PNH 型血球陰性の 32 例について、抗 hnRNP K 抗体の有無による免疫抑制療法の奏効率の差異と見たところ、抗体陽性例における奏効率は陰性例に比べて有意に高かった (図3)。

これらの結果から、自己免疫性の再不貧においては複数の自己抗原に対する免疫寛容

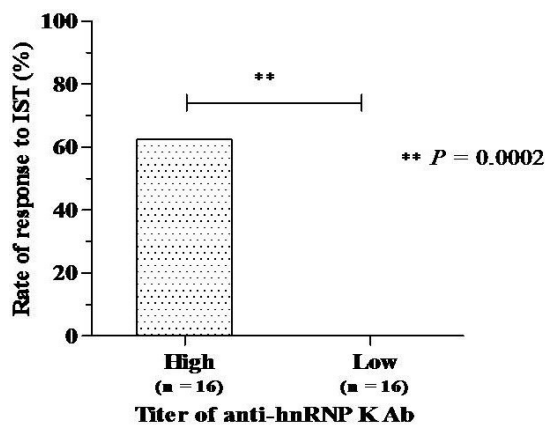


図3. PNH型血球陰性例における免疫抑制療法の奏効率

の破綻が生じており、これらの抗原に対する自己抗体の検出は免疫病態を診断する上で有用と考えられた。その中でも抗 hnRNP K 抗体の検出は、PNH 型陰性症例における免疫抑制療法の反応性予測に特に有用と考えられた。

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6件)

Sugimori N, Kondo Y, Shibayama M, Omote M, Takami A, Sugimori C, Ishiyama K, Yamazaki H, Nakao S

Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome: a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis

Eur J Haematol, 82, 54-60, 2009, 査読有

Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z,

Okawa K, Nakao S

Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma.

J Immunol, 182, 703-710, 2009, 査読有

Mochizuki K, Sugimori C, Qi Z, Lu X,

Takami A, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H,

Okumura H, Nakao S

Expansion of donorderived hematopoietic

stemcells with PIGA mutation associated with late graft failure after allogeneic stem cell transplantation.

Blood, 112, 2160-2162, 2008, 査読有

Sugimori C, Yamazaki H, Feng X, Mochizuki K, Kondo Y, Takami A, Chuhjo T, Kimura A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S
Roles of DRB1 *1501 and DRB1 *1502 in the pathogenesis of aplastic anemia.

Exp Hematol, 35, 13-20, 2007, 査読有

Teramura M, Kimura A, Iwase S, Yonemura Y, Nakao S, Urabe A, Omine M, Mizoguchi H.

Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan.

Blood, 110, 1756-1761, 2007, 査読有

Yamazaki H, Sugimori C, Chuhjo T, Nakao S.
Cyclosporine therapy for acquired aplastic anemia: predictive factors for the response and long-term prognosis.

Int J Hematol, 85, 186-190, 2007, 査読有

[学会発表](計2件)

Zhirong Qi, Nakao S, et al
Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in bone marrow failure syndromes.

The American Society of Hematology 50th Annual Meeting, December 6-9, 2008
San Francisco, CA, USA

Sugimori, C., Nakao S, et al.
Donor-Cell Derived Aplastic Anemia (AA) with Small Population of CD55-CD59- Blood Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Evidence for the Immune System Attack Against Normal Hematopoietic Stem Cells in AA.

The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, December 8-11, 2007
Atlanta, Georgia, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 眞二 (NAKAO SHINJI)

金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70217660

(2)研究分担者

高見 昭良 (TAKAMI AKIYOSHI)
金沢大学・附属病院・准教授
研究者番号：80324078

近藤 恭夫 (KONDO YUKIO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：10322116

千住 覚 (SENJYU SATORU)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号：50274709

山崎 宏人 (YAMAZAKI HIRIHITO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：50361994

高松 博幸 (TAKAMATSU HIROYUKI)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：70401932

(3)連携研究者
なし