

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591188
 研究課題名（和文） 膠原病患者血清中に存在する抗細胞表面抗体の対応抗原の解析と
 新たな検査法の確立
 研究課題名（英文） Analysis of target antigens of anti-cell surface antibodies
 in patients with collagen diseases and development of clinical assay
 研究代表者
 三浦 恵二（MIURA KEIJI）
 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
 研究者番号：20199946

研究成果の概要（和文）：72名の膠原病患者から提供された血清中に含まれる抗細胞表面抗体を、様々な性質の違う培養細胞を用いた Cyto-ELISA 法で検出した。患者の多くが、細胞表面に結合する性質を持つ抗体を産生していた。可溶性膜画分を用いた ELISA で、抗細胞表面抗体価を反映する系を確立し、全身性エリテマトーデスと強皮症の患者において高値を示す頻度が高いことがわかった。今後は、抗体が結合している抗原の特定を進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：Sera from 72 patients with collagen diseases were tested for antibodies against cell surface antigens by Cyto-ELISA with different cells as antigenic substrates. ELISA test with solubilized membrane fraction was developed for systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・ 膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：膠原病、自己抗体、自己抗原、細胞表面抗原、膜タンパク質、可溶性、ELISA

1. 研究開始当初の背景

各種膠原病において、それぞれに特徴的な自己抗体およびその対応抗原が見つかっており、すでに臨床検査に使用されているものも多い。例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）の DNA、強皮症の Scl-70（トポイソメラーゼ I）、混合性結合組織病（MCTD）の U1-RNP、シェーグレン症候群の SS-A、SS-B といったものである。これらも含め、膠原病

において知られる自己抗原の多くが、細胞内（核内）に局在する物質である。抗体は、通常生きた細胞の中には入ることができないため、細胞内局在物質に対する抗体が存在したとしても、どのような機構で細胞に異常がもたらされるのか？それは、長年大きな疑問であった。また、MCTD の抗 U1-RNP 抗体のように、病状が寛解になっても抗体価が高値のまま維持されるものもあり、それは、測

定可能な自己抗体価の高低と臨床症状とが直接関連していないことを意味している。即ち、膠原病患者の血清中に存在し、現在検出や測定が可能な自己抗体だけでは病態や病状を理解するにはまだまだ不十分だと考えられている。さらに話を複雑にする事実として、膠原病患者血清を用いた細胞染色やFACS解析では、細胞表面に結合する抗体の存在を示す論文も数多く発表されていることである。代表的なものは、血管内皮細胞の表面に結合することに焦点をあてたもので、抗血管内皮細胞抗体 (Anti-Endothelial Cell Antibodies; AECA) と呼ばれている。血管内皮細胞の表面に結合する抗体があることは、膠原病において高頻度に見られる血管炎の発症メカニズムにおいても関与が想定しやすいと考えられてきたのである。では、抗体が結合しているものは何か？細胞内局在物質だけに特異的に結合する性質を持つ抗体であるならば、細胞内局在物質そのものが細胞表面に出てきていることになる。しかし、抗体の交差反応を考慮すると、元々細胞表面に局在する、例えば受容体などのような別の分子に結合している可能性も考えられる。いずれにせよ、膠原病患者が産生する自己抗体で、細胞表面に結合する性質を示す抗体は何に結合しているのか？その解明は、膠原病の病態解明に繋がるものと考えられた。

2. 研究の目的

膠原病患者の血清中の自己抗体が結合する細胞表面上の自己抗原は何か？通常細胞内に局在する物質が細胞表面に出てきているのか？それとも細胞表面に局在するものか？それらを特定することは、膠原病の病態解明への手掛かりになると考えられる。さらに、新規自己抗原が特定できた場合には、そのリコンビナントタンパクを用いることにより、新たな臨床検査法の開発にも繋がるのが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 抗細胞表面抗体の検出と測定

現在の診断基準に基づき、各種膠原病と診断されている72名の患者から提供された血清を使用し、血清中に含まれる抗細胞表面抗体 (主にIgG) の量を測定した。これまでこの分野で知られている抗細胞表面抗体は、AECAであり、主にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する結合が測定されてきた。しかし、これまでの予備的な研究結果より、患者血清中には、血管内皮細胞に特異的なものだけでなく、様々な細胞の表面に結合する抗体が存在していることがわかってきた。そこで、いろいろな性質を持つ各種培養細胞を用いて、それらの細胞表面に結合する抗体の量を測定することにした。細胞が壊れること

は、細胞内物質が放出されるとともに、抗体が細胞内に侵入して反応することも考えられるため、なるべく死細胞が出ないように処理し、非固定の細胞表面に結合する抗体を、HRP 標識・抗ヒト IgG 抗体で検出する Cyto-ELISA 法により測定した。Cyto-ELISA 法においては、多サンプルを簡易的に処理できるように、フィルター法で行った。細胞は、血管内皮細胞、繊維芽細胞などの正常細胞の他、腎臓癌・肝臓癌・肺癌・膵臓癌・大腸癌・卵巣癌・白血病細胞などの各種癌細胞も含め、17種類の細胞を使用した。

(2) 臨床データと抗細胞表面抗体価を組み込んだデータベースの構築と患者のプロファイリング

Cyto-ELISA 法で検出した抗細胞表面抗体価と、各種臨床検査データを統合的、視覚的に表現するべく、ファイルメーカーによるデータベース化を行った。これにより、患者基本データ (性・年齢・服用薬などで、個人が特定できる情報は含まない)、疾患名、臨床検査データ、抗細胞表面抗体価を統合的に眺めることができるようにした。

(3) 新規細胞表面自己抗原の探索

Cyto-ELISA 法で高値を示すことは、用いた細胞表面には対応抗原分子が検出に十分な量が発現されていることを意味する。この段階では、細胞の由来や性質に拘らず、抗原を精製するための材料と考え、発現量の多い細胞を選択することとした。細胞表面に存在する新規自己抗原を特定するために、既存の生化学的・分子生物学的手法を考慮すると、患者血清を用いた免疫沈降法、電気泳動によるタンパクの分離、そして質量分析による分子の同定の3つのステップが常法となる。

しかし本実験においては、対応分子が膜タンパクであることを想定しているため、抗原を含んだ画分は界面活性剤による可溶化処理が不可欠となってくる。これまでの多くの膜タンパク研究においては、可溶化の条件など (細胞の破碎法、界面活性剤の種類、用法) が膜タンパクの構造や生理活性維持に大きく関わってくるのがわかっている。本実験においても、抗原の立体構造維持は、自己抗体の結合の有無に大きく関係すると考えられ、可溶化の条件決定を重ねる必要があった。

データベースを利用し、一人一人の患者血清において、より多くの自己抗原が精製・回収ができる細胞の組み合わせを選択し、また同様な Cyto-ELISA パターンを示す患者を同時に扱うことで、得られるデータの信頼性を高めるようにした。

自己抗原を含む画分、すなわち細胞膜タンパク画分の調製を以下に示す。まず大事な

ことは、細胞表面に存在していたことをマークするために、ビオチン化試薬 (Sulfo-NHS-LC Biotin) で、細胞表面のリジン残基をビオチン化した。細胞を低浸透圧ショックで破碎し、遠心分離で粗細胞膜画分を回収した。界面活性剤は、Triton X-100, CHAPS, n-Octyl-β-D-glucoside (OG), n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM) などを含む緩衝液で、細胞膜を可溶化し、膜画分とした。

可溶化膜画分を用いた ELISA の系を確立した。細胞を破碎せずに ELISA に用いるのが Cyto-ELISA であるが、最終的に対応抗原の特定をするためには、粗抽出膜画分を用いても Cyto-ELISA の結果を反映できる条件を見極める必要があった。界面活性剤が含まれるタンパク溶液では、界面活性剤の種類により ELISA カップに固相化しにくいこと、また、カップに直接固相化させることは、タンパクの立体構造を崩すことも想定されたため、ニュートラアビジンを介した固相化法を用いた。ニュートラアビジンは、アビジンの糖を除去したもので、アビジン同様にビオチンと強固に結合する性質がある。まず、ニュートラアビジン溶液で ELISA カップをコーティングし、そこに可溶化膜タンパク溶液を入れて、ビオチン化タンパクを捕捉させた。この方法では、界面活性剤の種類に関わらず固相化が可能であり、さらに直接固相化するのに比べて抗原の立体構造を維持しやすいと考えられた。その様に調製した ELISA カップに患者血清を反応させ、HRP 標識・抗ヒト IgG 抗体により、可溶化膜タンパクに対する自己抗体の反応性を確認することができた。

免疫沈降法においては、まず患者血清をプロテイン G ダイナビーズ に反応、IgG-ダイナビーズ として準備した。IgG-ダイナビーズ と可溶化膜タンパク画分を反応し、洗浄後、グリシン塩酸溶液 (pH 2.0) で抗原を回収した。回収した抗原を、1次元あるいは2次元の SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離した。分離後、銀染色で検出できたバンドを切り出し、質量分析を行った。サンプルの一部は、ウェスタンブロットング法により HRP 標識ニュートラアビジンでビオチンを検出し、細胞表面に存在していたタンパクを確認した。

細胞表面タンパクの精製

提供され保存してある患者血清の量に限界があり、抗原精製のために多量の血清を使うことができないことから、膜タンパクだけの精製を試みた。血清は、検出のためだけに使用し、そのデータを重ね合わせることで、抗原の位置を特定する方法を採ることにした。

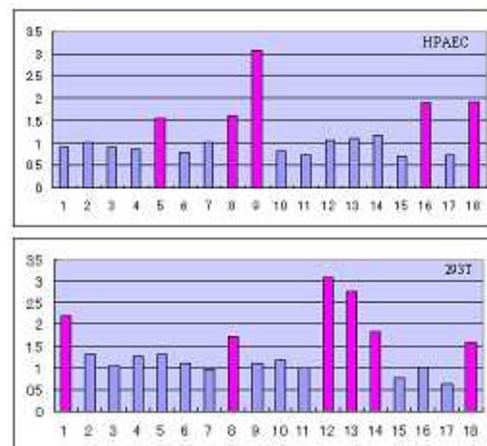
ビオチン化には、Sulfo-NHS SS Biotin を使用した。細胞表面をビオチン化、可溶化し、テトラリンクアビジンカラムで、ビオチン化タンパクを回収した。このビオチン化試薬を使用することにより、50mM DTT を含む緩衝液でビオチン化されていたタンパクだけを溶出することができた。この溶出操作でタンパクからビオチンが除去されているため、再び SH 基を Biotin-HPDP でビオチン化し、免疫沈降のプロープとして使用した。

質量分析

SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離・検出したバンド (スポット) を切り出し、トリプシンによるゲル内消化を行った後、ナノフロー HPLC, ESI-ion trap MS により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 図 1 は、18名の MCTD 患者血清を用いて、ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) と、ヒト腎癌由来細胞 (293T) に対しての IgG 抗体の結合をみた結果である。



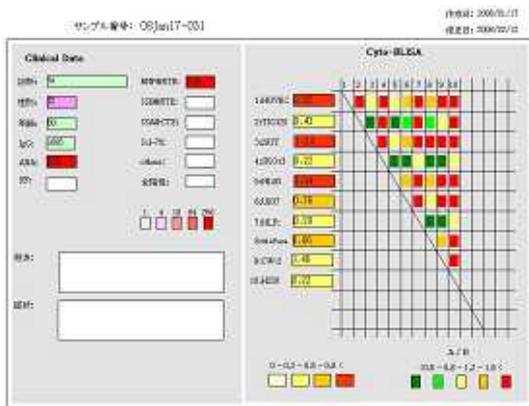
「図 1」 MCTD 患者の Cyto-ELISA

MCTD の診断基準の一つに、抗 U1-RNP 抗体価が高値になるという点があり、ここに示した 18 名も全員高値を示している。しかし、細胞表面に結合する抗体を検出してみると、持っている患者と持っていない患者がいることがわかった。この違いは何を意味するのか？ HPAEC に結合する抗体を持っていることが、肺高血圧症の原因に繋がる可能性はあるのか？今のところ、患者の症状に繋がる結果は得られていない。今後さらに多くの MCTD 患者で検討し、症状に繋がる抗体の性質を見極めたいと考えている。同じサンプル番号は同一の患者であるが、患者により、HPAEC と 293T において、細胞への結合性が違う抗体を持っていることがわかる。これは、一つには対応抗原の発現量が細胞によって変化していることに起因すると考えられるが、腎癌由来の

293T 細胞に結合することは、血管内皮細胞だけに特異的な結合を示す性質ではなく、抗細胞表面抗体と呼ぶべき性質を持っていることがわかった。世界的には、未だに AECA が話題になり研究対象になっているが、抗細胞表面抗体という名前を提案したいと思っている。抗細胞表面抗体は、特定の分子に結合しているのか？それとも、複数種類の分子に結合して加算的な結果を示しているのか？それについては、さらに多種多様な細胞を使うことで、結合性の違いが明らかになり、患者のプロファイリングが可能になると考えた。さらに患者血清と結合する対応抗原を高発現している細胞の組み合わせを見つけることが可能になり、抗原精製のための重要な情報になると考えた。

(2) Cyto-ELISA 法で検出した抗細胞表面抗体価のデータベース化

図 2 は、1 サンプル（一人の患者血清）についての情報を入力したカード型データベースの一枚を示している。左半分に自己抗体価などの臨床検査データを、右半分に Cyto-ELISA のデータを入力している。

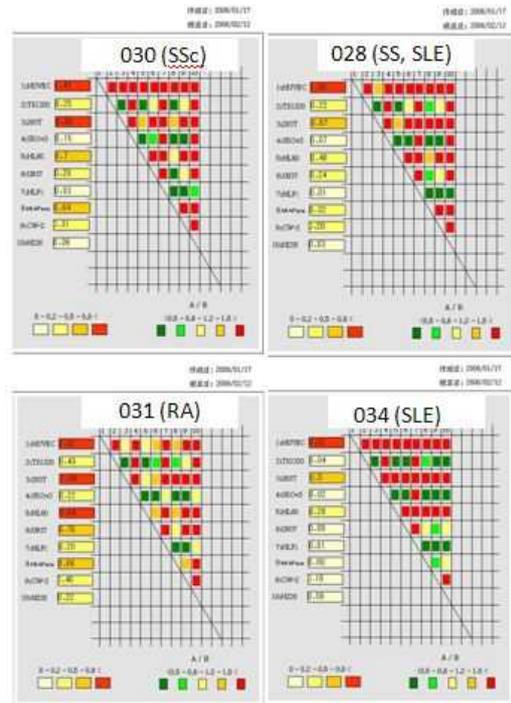


「図 2」患者血清のデータベース

Cyto-ELISA は、10 種の培養細胞に対する反応値と、さらに細胞間での比を計算し、値により色分けしている。この表現により、一人の患者血清中に存在している抗細胞表面抗体の性質のパターン化が可能になった。これまでに 72 名の患者をデータベース化した。今後さらに増やすことにより、臨床検査データ・症状と Cyto-ELISA データとの間に関連性を見つけたいと考えている。このようなアプローチは世界的にも行われておらず、独創的な研究と考えている。

例えば、図 3 は、臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に強く反応する 4 人の患者についての Cyto-ELISA の結果である。上の二人 (No.30 強皮症および 28 シェーグレン症候群、SLE) のパターンは似ているが、下の二人 (No.31 関節リウマチおよび 34 SLE) は違うことがわかる。同じ SLE でも違ったパターンを示して

いることになる。ここには示さないが、逆の場合もあり、別の疾患と診断されながら、似たパターンを示すケースも見つかっている。Cyto-ELISA の結果において、抗体価が同じでも中身が同じ性質を持つ抗体とは限らないが、結合している対応抗原がそれぞれ明らかになれば、現在行われている診断とは違った基準で、診断や患者のプロファイリングができると考えている。



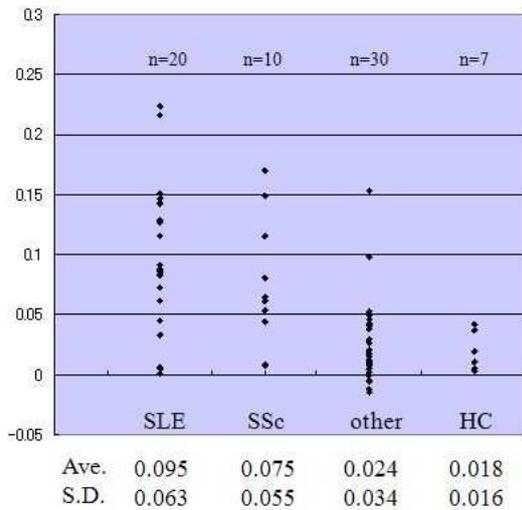
「図 3」Cyto-ELISA のパターン比較

(3) 可溶性膜画分を用いた ELISA

ビオチン化した細胞から膜画分を粗抽出し、それを界面活性剤で可溶化した膜画分を、ニュートラアビジンを介して ELISA カップに固相化し、患者血清を反応させる ELISA を行った。(論文・特許準備中のため詳細は省略) その結果、SLE と強皮症患者において、陽性を示す率が高いことがわかった。(図 4) 統計処理上では、感度 47.4%、特異度 88.6% という値が得られた。特異度が約 90% を示したことは、他の疾患においては陽性を示しにくいことを意味している。また感度が約半分ということは、SLE あるいは強皮症と診断されていても患者の何らかの性質により半々に別れることを意味している。これが症状によるのか？あるいは別の要因か？そのあたりについてもさらに患者数を増やすことで検討していきたい。

可溶性膜画分を固相化した後に、1%SDS, 37 度 1 時間の処理を行うことで、抗体の反応性が低下する患者が多いことがわかった。SDS

による変性処理で抗原の構造変化が起これ、抗体が結合できなくなった可能性、あるいは抗体が複合体に結合する性質を持ち、複合体が分解したために抗原性がなくなった可能性が考えられた。歴史的には自己抗原を検出するための方法としては、ウェスタンブロッティング解析法が使用されてきたが、SDS ポリアクリルアミド電気泳動によりタンパクの立体構造は大きく変化してしまう。つまり、この ELISA により検出できた抗体の場合は、ウェスタンブロッティング解析法では検出できなかったことを意味している。可溶性膜画分 ELISA 法は、その問題点を解消できる新たな方法として有効だと考えている。



「図4」可溶性膜画分 ELISA の結果

(4)免疫沈降実験

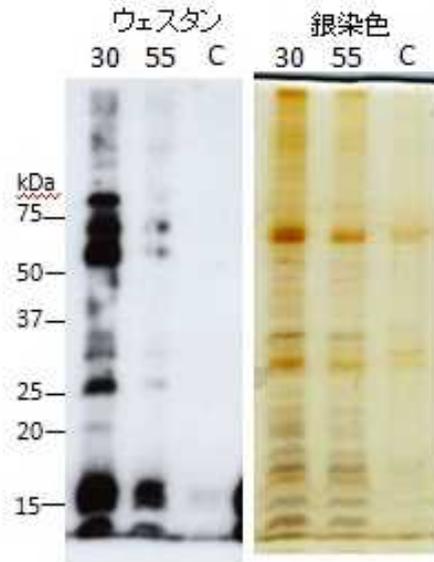
患者血清中に含まれる IgG を結合させたプロテイン G ダイナビーズと可溶性膜画分を反応させ、抗体が結合するタンパクを回収し、電気泳動で分離した。ウェスタンブロッティング解析で、ビオチン化タンパクを検出すると、80, 70, 60, 30, 25, 15kDa 付近にバンドが検出される患者が見つかった。(図5)

銀染色では、ウェスタンブロッティングのバンドに対応するところに、強く染色されたバンドはなかったが、対応する位置にあった薄いバンドを切り出し、質量分析を行った。しかし、有意なデータを得ることができず、タンパクを特定することはできなかった。保存されている患者血清の量にも限界があり、スケールを大幅に増加することができないため、次に示す の実験方法を採用することにした。

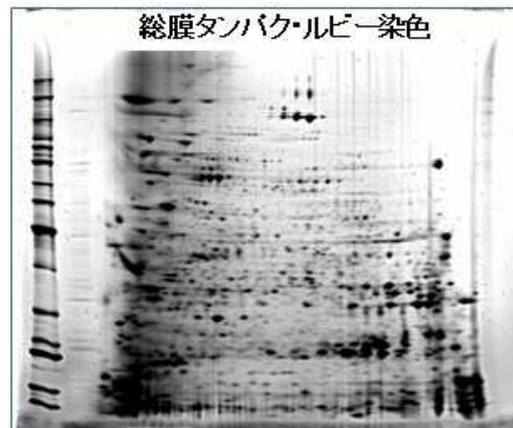
膜タンパクの精製と免疫沈降

Sulfo-NHS SS Biotin でビオチン化された細胞表面膜タンパクを、テトラリンクアビジンカラムで精製し、DTT 処理で溶出した。2

次元電気泳動により分離し、ルビー染色したところ、細胞総タンパクの染色パターンと大きく違い、膜タンパクが積極的に濃縮できたと考えられた。(図6)



「図5」患者血清を用いた免疫沈降



「図6」総膜タンパクの分離

調製した総膜タンパクにはビオチンの付加がないため、再度 SH 基を Biotin-HPDP でビオチン化し、免疫沈降実験を行った。方法は、と同様に、このビオチン化総膜タンパクと患者血清 IgG を結合させたプロテイン G ダイナビーズとを反応させ、抗体に結合したタンパクを回収し、2次元電気泳動で分離、ウェスタンブロッティング解析でビオチン化タンパクを検出した。(図7)

ある SLE 患者血清において、等電点はほぼ中性域、分子量は 70, 60kDa 付近に複数のスポットが確認できた。このウェスタンブロッティング陽性スポットと総タンパクルビー染色パターンを重ね合わせることで、抗原を特定しようとしたが、ルビー染色で強く染色

されたスポットには対応するものがなかった。細胞表面に存在する分子のうち、相対的には発現量の少ないものが対応抗原なのかもしれない。対応する位置に存在した薄く染色されたスポットの質量分析を現在行っている。



「図7」患者血清を用いた免疫沈降

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 恵二 (MIURA KEIJI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・

助教

研究者番号：20199946