

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08339

研究課題名(和文) 新生児ヘモクロマトーシスの原因となるアロ抗体の同定と病態発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification of allo-specific antibody responsible for the pathogenesis of neonatal hemochromatosis

研究代表者

谷内江 昭宏 (YACHIE, AKIHIRO)

金沢大学・附属病院・特任教授

研究者番号：40210281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新生児ヘモクロマトーシスは胎児期に発症、生直後から高度の肝機能不全、全身臓器の鉄沈着を伴う、致死性疾患である。その原因は、胎盤を介し移行する胎児組織(アロ抗原)に反応する母体由来の抗体と考えられている。しかし、その標的となる胎児抗原は同定されておらず、診断や病態評価の指標も存在しない。

本研究では、プロテインアクティブアレイと呼ばれる革新的な手法により、複数の症例で共通にアロ抗体を検出することが可能となった。さらに、別の方法で、胎児肝特異的に発現している複数の蛋白を同定、この中に上記の候補抗原も含まれることを確認した。

今後は、アロ抗原と病態との関連についてさらに研究を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新生児ヘモクロマトーシスの発症の分子機序を明らかにすることを目的とする。とりわけ、胎児期に母体から移行する抗原特異的IgG抗体を介して発症するとされる、臓器傷害の惹起に関わるアロ抗原を同定することを目指す。これにより、ハイリスク妊婦のスクリーニング、胎児期早期の確定診断、適切な治療介入のための新たなバイオマーカーの提案などが可能となる。

現在、高い治療効果を示すとされ、医師主導治験が行われている母体への高用量免疫グロブリン投与についても、理論的な裏付けがなされ、治療の一般化が促進されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neonatal hemochromatosis is a fatal disease of fetus and infants with severe liver injury and systemic iron deposition. There is indirect evidence that maternally-derived antibody against fetal organ is responsible for the disease, although the exact antigen has not been determined to date.

In this study, protein-active array method was utilized to find candidate antigens of NH. Several proteins have been found as a possible target for the NH allo-reactive antibody. These targets are among proteins expressed specifically within fetal liver tissue. Further study is undergoing to prove the specificity of this antigen and to clarify the direct relationship between NH pathology and antibody directed against these antigens.

研究分野：小児科学

キーワード：新生児ヘモクロマトーシス アロ抗原 胎児肝 妊娠

1. 研究開始当初の背景

新生児ヘモクロマトーシス(NH)は胎児期に母体から移行する抗原特異的 IgG 抗体を介して発症するとされており、出生直後から高度の肝機能不全、全身臓器の鉄沈着を伴う、致死性の疾患である。胎児死亡を免れた場合でも、内科的治療により救命することは極めて困難で、生体肝移植の適応とされている。遺伝子異常を背景とした疾患ではないが、NH 発症を経験した母体は以降の妊娠においても高い確率で NH 発症を繰り返すことが知られている。これまで、本疾患の発症にアロ抗原感作が深く関わっていることが示唆されていながら、未だに責任抗原は同定されておらず、そのために、本疾患の診断は臨床症状や種々の検査所見をもとにした臨床診断に頼らざるを得ない状況が続いている。その結果、発症早期の診断・治療介入が遅延したり、類似の病態を示す新生児期固有の肝障害との鑑別がしばしば問題となる。本研究により標的となる胎児抗原が明らかとされ、母体中の抗体を検出する手法が確立されることにより、早期診断や治療介入のための信頼できるバイオマーカーを提示することが可能となる。現在、高い治療効果を示すとされ、医師主導治験が行われている母体への高用量免疫グロブリン投与についても、理論的な裏付けがなされ、治療の一般化が促進されることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究では従来にない新しい方法、プロテインアクティブアレイ法を駆使して網羅的に標的アロ抗原を同定することを目指す。さらに母体血清中のアロ抗原に反応する特異抗体(アロ抗体)の定量法を開発する。また、同定されたアロ抗体を用いて NH 疾患モデル動物作成を行い、病態発症機序の解明を目指す。これらにより、本疾患の鑑別診断、早期治療介入、さらに発症予防などの手法を確立する。

NH は胎児期に発症、出生直後から高度の肝機能不全、全身臓器の鉄沈着を伴う、致死性の疾患である。胎児死亡を免れた場合でも、内科的治療により救命することは極めて困難で、生体肝移植の適応とされている。遺伝子異常を背景とした疾患ではないが、NH 発症を経験した母体は以降の妊娠においても高い確率で NH 発症を繰り返すことが知られている。さらに、米国を中心に妊娠中の大量 IVIG 投与による“胎児治療”が試みられ、高い有効率でその発症を予防することが報告されている。

これらの事実は、この疾患が Rh 不適合妊娠と同様、胎児肝組織に特異的に発現する“アロ抗原”に対して感作された母体側抗体が胎盤を通して胎児に移行、胎児肝組織を破壊する「gestational alloimmune liver disease; GALD」であることを示唆している。

本研究では、母体血清中に存在することが推測される胎児(肝)組織特異抗体を同定するとともに、標的となる抗原分子を同定する。アロ抗原の候補となる条件は、1)母体での発現がないこと(あれば、自己抗体として機能し母体で病態が発症する)、2)普遍的な抗原である(特定の個体にのみ発現するのであれば、高い再発率が説明できない)、3)肝細胞が標的となる(MAC が沈着していることから、直接的でなくても、間接的には標的となる)、4)IgG 抗体である(胎盤移行して胎児組織に結合し、補体活性化が起こる)などである。抗原が同定されれば、その抗原の組織特異性、胎児期発現のプロフィール、発現調節機構などを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、1)アロ抗体の探索と、2)標的アロ抗原の発現プロファイル解析、3)疾患モデル動物の作成、さらに4)アロ抗体定量の臨床応用の四段階に分けられる。アロ抗体の探索は、患児母血清をサンプルとして、肝組織を用いた immunoblotting、ならびにプロテインアクティブアレイを用いた網羅的抗体探索の手法を用いる。候補抗体が絞られたら、抗体の標的となる抗原についてその臓器発現プロファイル、胎児期における発現調節など、抗原の特徴を明らかとす

る研究を行う。次に、同定された自己抗体の定量法の確立と臨床応用に向けた研究を進める。以下、具体的な研究計画を記す。

1) 候補抗体の探索

Immunoblotting 法により、胎児肝組織特異的に反応する抗体を探索する。

プロテインアクティブアレイ解析により、網羅的に未知のアロ抗体を探索する。

- ・対象の選択と血清の採取
- ・成人ならびに胎児肝組織を用いた immunoblotting 解析
- ・胎児ならびに成人臓器を用いた抗原発現プロファイルの比較検討
- ・胎児ならびに成人臓器を用いた immunoblotting による発現プロファイルの検討

3) 疾患モデル動物の作成と診断・治療法の開発

疾患モデル作成のためにマウスを用いたアロ抗体投与による病態再現研究を施行する。

妊娠マウスにアロ抗体を投与し、NH の病態が発症することを確認する。その上で、マウスモデルを用いて、疾患の早期診断・治療法開発のための研究に着手する。

4) 抗体定量系の開発ならびに臨床応用

病態に関連する抗原が同定された場合には、母体中の抗体価の定量とその臨床応用を目指す。一旦抗体の定量系が確立された後には、その臨床応用のために以下の検討を行う。

- ・正常対照、NH 出産後妊婦、NH 患児における血清中抗体価の定量
- ・NH 妊娠経過中の抗体価変動

4. 研究成果

本研究ではまず、胎児治療を施行した母体より得られた血清試料を材料として、高率で存在することが予想されるNH関連アロ抗原の同定を試みている。アロ抗原の同定には、これまでに使われることのなかった革新的な探索ツールである、プロテインアクティブアレイを用いた。成果は以下のようにまとめられる。

- ・プロテインアクティブアレイによるアロ抗原候補の絞り込み

これまで、新生児ヘモクロマトーシスの発症病態に関与する可能性がある複数のアロ抗原候補の絞り込みを行った。

- ・ELISA系の確立と疾患特性の確認

候補となった抗原について、抗体検出のためのELISA系を構築し、現在患者母体、対照妊婦、正常対照について血清中特異抗体を定量開始している。有力候補と推定された抗原に対するELISA系により、複数の症例で共通にアロ抗体を検出することが可能となった。さらに、対照妊婦、非妊娠女性の結成中には検出されないか、極めて低力価であることも確認した。

- ・アロ抗原候補の胎児肝組織特異性の確認

胎児肝組織ならびに成人肝組織の mRNA 発現比較を施行した。異なる週数胎児臓器における網羅的蛋白発現プロファイルを成人肝組織と比較検討した。その結果、アロ抗原候補のいくつか、胎児肝組織特異的に発現していることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yachie A	4. 巻 22
2. 論文標題 Heme Oxygenase-1 Deficiency and Oxidative Stress: A Review of 9 Independent Human Cases and Animal Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	6. 最初と最後の頁 1514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Irabu H, Shimizu M, Kaneko S, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Comparison of serum biomarkers for the diagnosis of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis during tocilizumab therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-020-0843-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takakura M, Shimizu M, Irabu H, Sakumura N, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Comparison of serum biomarkers for the diagnosis of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.108252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu M, Kizawa T, Kato R, Suzuki T, Yachie A.	4. 巻 207
2. 論文標題 Macrophage activation syndrome in neonates born to mothers with adult-onset Still's disease: Perinatal effect of maternal IL-18.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 36-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muraoka M, Akagi T, Ueda A, Wada T, Koeffler HP, Yokota T, Yachie A.	4. 巻 516
2. 論文標題 C/EBP RS derived from a neutrophil-specific granule deficiency patient interacts with HDAC1 and its dysfunction is restored by trichostatin A.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 293-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuta M, Shimizu M, Inoue N, Nakagishi Y, Yachie A.	4. 巻 119
2. 論文標題 Clinical significance of serum CXCL9 levels as a biomarker for systemic juvenile idiopathic arthritis associated macrophage activation syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 52-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2019.03.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	東馬 智子 (TOMA TOMOKO) (00377392)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------