

機関番号：13201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591167

研究課題名(和文) リンパ球チップを用いた関節リウマチ CCP 抗体のライブラリーの作成と病態解析

研究課題名(英文) Preparation of CCP antibodies library in Rheumatoid Arthritis and its clinical application

研究代表者

岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：60186210

研究成果の概要(和文)：

関節リウマチ(RA)では、天然アミノ酸の一つであるシトルリンを含む環状ペプチド(CCP)に対する抗体(CCP抗体)の特異的な出現が、RAの発症、病態に深く関連していると考えられている。我々は、CCP抗体が認識する自己抗原を同定し、CCP抗体の出現機序あるいは作用機序を明らかにすることが、RAにおける関節破壊進行の機序を明らかにする上で重要であると考え、リンパ球チップを用いて、モノクローナルな自己抗体を患者リンパ球より直接取得するISAAC法を開発し、CCP抗体の取得に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：

In rheumatoid arthritis (RA), appearance of antibodies that bind to cyclic peptide containing citrulline has been reported to be correlated with the onset of the RA and its disease progression. We have hypothesized that the identification of auto-antigens of CCP antibodies might clarify the mechanisms of the induction of CCP antibody production and its pathological function in RA, which may lead to reveal the mechanisms of the progression of joint destruction in RA. To this end, we have developed the ISAAC system that identifies auto-antibody-producing human lymphocytes on lymphocyte-chip. By using ISAAC system, we have obtained auto-antibodies from the peripheral blood of patients of autoimmune diseases, and tried to apply ISAAC system to obtain CCP antibodies from RA patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ、自己抗体、抗CCP抗体、マイクロウェルアレイチップ、ISAAC法

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは関節滑膜の病変を主とす

る慢性炎症性疾患であり、しばしば関節の破壊、変形が生じ、患者の QOL を著しく低下させる。本邦における患者数は 70 万人に及び、かつ中年女性の発症が多いことから、その社会的損失は極めて大きい。関節リウマチの治療では、発症早期に有効な治療を施すことが、関節破壊を進行させないために重要であり、早期の的確な診断が求められている。近年、天然アミノ酸の一つであるシトルリンを含む環状ペプチド (CCP) に対する抗体 (CCP 抗体) が関節リウマチ患者に特異的に出現し、早期の診断に極めて有用であることが報告されている。CCP 抗体は他の自己免疫疾患患者に出現することはまれであり、関節リウマチの発症、病態に深く関連していると考えられている。また、初期の段階における患者血清中の CCP 抗体検出はその後の関節破壊と高い相関があることが示されている。従って、CCP 抗体が認識する自己抗原を同定し、CCP 抗体出現の機序あるいは作用機序を明らかにすることは、関節リウマチにおける関節破壊の進行を明らかにする上で重要であると考えられる。これまで、患者血清中のポリクローナルな CCP 抗体を用いて自己抗原の同定が試みられているが、これまでに同定された抗原のシトルリン化は関節リウマチ特異的ではないことが報告されている。はっきりした結果が得られない理由の一つとして、抗原の解析にポリクローナルな抗体の混合物である患者血清が使われており、解析におけるバックグラウンドノイズが高く、シグナルの特異性がはっきりしないことが考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は、最近、リンパ球がちょうど 1 個入る大きさ・形状のマイクロウェル約 20 万個を規則正しく配置したマイクロウェルアレイチップを開発した (図 1)。チップ上のマイクロウェルにリンパ球を 1 個ずつ配置することにより、個々のリンパ球への抗原の結合や抗原に反応したリンパ球のシグナル伝達 (細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化) を単一細胞レベルで解析することができる。このチップを用いて、ワクチン接種したボランティアの末梢血リンパ球より B 型肝炎ウイルスやインフルエンザウイルスに特異的な抗体を取得することができることを示してきた。従来、ヒト末梢血より抗原特異的モノクローナル抗体を取得するためには、EB ウイルスを用いてヒト B 細胞を不死化させ細胞株を作製し、作製した B 細胞株の中から目的の抗体を産生する細胞をスクリーニングしていたが、この方法を用いた場合、ボランティアより血液を採取して、目的の抗体を得るまでに 2~3 カ月を

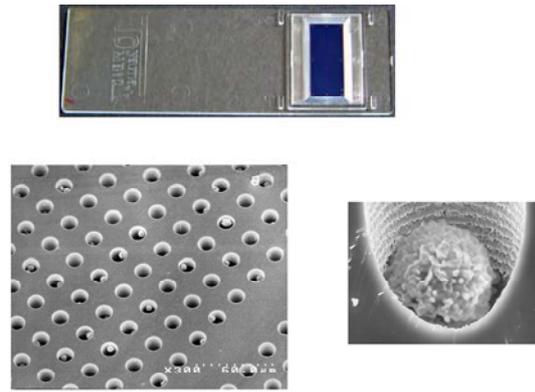


図 1 マイクロウェルアレイチップ

(上) マイクロウェルアレイチップの全体像。(左下) マイクロウェル (電子顕微鏡像)。(右下) 1 個のマイクロウェルにリンパ球が入った電子顕微鏡像 (ウェルの断面)

要していた。一方、リンパ球チップを用いる方法では、血液を採取してから抗原特異的抗体を得るまでのステップを約 1 週間で行うことが可能である。このようにリンパ球チップを用いる方法はヒト末梢血中の抗原特異的な抗体を産生している B リンパ球を同定し、その細胞から直接抗原特異的抗体を取得できる優れた方法である。しかしながら、患者末梢血における自己抗体産生細胞はその数が非常に少ないことが予想され、感度・精度ともに不十分であることが予想された。そこで、本研究では、リンパ球チップを用い、従来より感度・精度のよい抗原特異的抗体産生細胞の検出方法を開発すること、また、その方法を用いて関節リウマチ患者末梢血リンパ球中の CCP 特異的抗体産生細胞を検出し、その自己抗原を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) リンパ球チップを用いた抗原特異的抗体分泌細胞の検出 (ISAAC 法)

表面に抗原をコートしたマイクロウェルアレイチップを用い、ヒト末梢血より分離したリンパ球をマイクロウェル中に 1 個ずつ挿入し、培養する。培養中に分泌された抗原特異的抗体は拡散しウェル周囲の抗原に結合する。チップ表面に結合した抗原特異的抗体を蛍光標識抗体により検出する。分泌された抗原特異的抗体はウェル周囲にドーナツのような形で検出されるため、シグナルとノイズの識別が容易であり、検出感度・精度とも飛躍的に向上する。検出したリンパ球をマイクロマニピュレータを用いてチップより採取し、RT-PCR 法にて抗体 cDNA を増幅させ、発現ベクターに導入する。抗体発現ベクターを動物細胞に導入し、抗体を産生させ、産生された抗体の抗原特異性を ELISA 等を用いて確認する (図 2)。

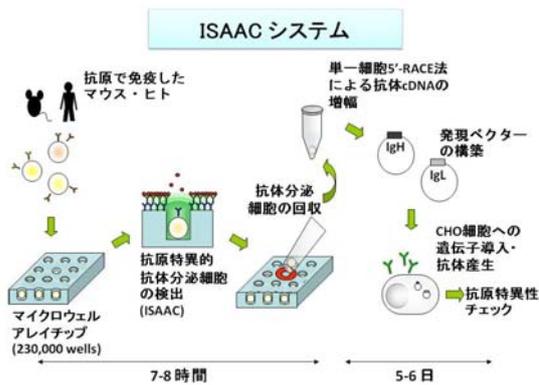


図2 ISAAC システム

リンパ球をマイクロウェルアレイチップで解析し、抗原特異的抗体遺伝子を取得し、抗原特異性を検証するまで1週間弱で終了することができる。

## (2) CCP 特異的抗体の検出

CCP 抗原として、

**HQCHQESTXGRSRGRRCGRSGS-biotin** (Xはシトルリン、CとCの間がSS結合により環状化されている)、コントロール抗原としてシトルリン(X)をアルギニン(R)に置換したもの

**HQCHQESTRGRSRGRRCGRSGS-biotin** を準備した。

### ① ELISA

ストレプトアビジンをコートした96穴プラスチックプレートの各ウェルにビオチン化されたCCPあるいはコントロールペプチドをコートし、抗体を含むサンプルをウェルに添加した。インキュベーション後、ウェルに酵素標識抗ヒトIgG抗体を添加し、基質を加えて発色させることによりCCP抗体を検出した。

### ② ELISPOT

ELISPOT用プレートにストレプトアビジンをコートし、その後、ビオチン化したCCPあるいはコントロールペプチドをコートする。そのプレートでリンパ球を一晩培養する。細胞を洗い去った後酵素標識抗ヒトIgG抗体を添加し、基質を加えて発色させることにより分泌抗体のスポットを検出した。

### ③ ISAAC

マイクロウェルアレイチップにストレプトアビジンをコートし、その後ビオチン化したCCPあるいはコントロールペプチドをコートする。そのチップ上でリンパ球を3時間培養した後、蛍光標識抗ヒトIgG抗体を添加し、分泌抗体のスポットを検出した。

## 4. 研究成果

(1) リンパ球チップを用いた抗原特異的抗体分泌細胞検出法 (ISAAC法) の確立

ISAAC法を確立するために、まず抗原である蛋白が吸着しやすいマイクロウェルアレイ

チップを開発した。従来使用していたチップでは蛋白が吸着しにくく、チップにコートされる抗原の量が少なかったため、シグナルが弱かった。しかし、表面処理により蛋白吸着能が向上し、シグナルが強くなった(図3)。

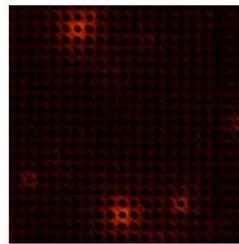


図3 チップ上での抗原特異的分泌抗体の検出  
抗原特異的抗体分泌細胞が入っているウェルを中心に、抗原特異的抗体が同心円状に拡散していることがわかる。

(2) ISAAC法を用いたウイルス特異的抗体の取得

B型肝炎ウイルス表面抗原(HBs抗原)ワクチンあるいはインフルエンザワクチンを接種したボランティアの末梢血リンパ球よりISAAC法を用いてHBs抗原特異的抗体およびインフルエンザウイルス特異的抗体を取得することができた。さらに、これらの抗体の中に高頻度でウイルス中和抗体が含まれていることを確認した。

(3) *in vitro* 刺激リンパ球を用いた抗原特異的抗体産生細胞の検出

最初に開発したISAAC法では、ボランティアにワクチン接種をする必要があり、ボランティアにとって負担となっていた。そこで、ワクチン接種することなく抗原特異的抗体分泌細胞をリンパ球チップで検出できるよう、*in vitro*における刺激法を検討した。サイトカイン等を用いてリンパ球を刺激することで、ワクチンを接種することなくウイルス特異的抗体分泌細胞をリンパ球チップを用いて検出できるようになった。これで、自己免疫疾患患者のリンパ球より自己抗原特異的抗体産生細胞を検出する準備が調った。

(4) CCP抗体の検出

### ① ELISAによる検出

作製したCCPペプチドおよびコントロールペプチドを用いて関節リウマチ患者血清および健康人コントロール血清中のCCP抗体の有無をELISAにて検出したところ患者血清中に特異的にCCP抗体を検出できることが確認された。

### ② ISAAC法による検出

患者リンパ球をCCPペプチドをコートしたマイクロウェルアレイチップ上で培養し、CCP抗体分泌細胞を検出したところ、CCP特異的抗体分泌細胞を検出することができた。現在、検出した細胞からのCCP抗体cDNAの取得を行おうとしている。

(5) 考察

リンパ球チップを用いて、効率よくヒト由来抗原特異的抗体産生細胞を検出し、抗原特異的抗体を作製できる技術を確立できた。また、*in vitro* 刺激法を導入することで、自己免疫疾患患者由来の自己抗体産生細胞を取得できる実験環境を調えることができた。現在、自己抗原の種類によっては自己抗体が得られつつある。CCP抗体については、現在、個々の患者サンプルから検出される CCP 抗体産生細胞の数が少なく、CCP抗体を取得するには至っていない。現在、患者サンプルをプールしており、プールしたサンプルを用いることで、CCP抗体を取得できると考えている。CCP抗体を取得し、自己抗原の解析ができれば、CCP抗体の産生機序および病態との関連についてさらなる情報が得られると期待され、関節リウマチの治療に大きく寄与できると期待している。

#### 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9件)

1. Ozawa T (2 番目), Kishi H (7 番目), Muraguchi A (8 番目) (他 5 名). Generation of TRAILreceptor 1-specific human monoclonal Ab by a combination of immunospot array assay on a chip and human Ab-producing mice. *Eur J Immunol*, 40:3591-3593, 2010. (査読有)
2. Ozawa T (2 番目), Kishi H (6 番目), Muraguchi A (8 番目) (他 5 名). Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antiviral Research*, 87:40-49, 2010. (査読有)
3. Ozawa T (3 番目), Kishi H (8 番目), Muraguchi A (9 番目) (他 6 名). Post-translational modification of TRAIL receptor type 1 on various tumor cells and the susceptibility of tumors to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 395: 251-257, 2010. (査読有)
4. Ozawa T (2 番目), Kishi H (9 番目), Muraguchi A (11 番目) (他 8 名). A rapid and efficient single cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nat. Med.*, 15: 1088-1092, 2009. (査読有)

[学会発表] (計19件)

1. Kishi H (1 番目), Ozawa T (3 番目), Muraguchi A (8 番目) (他 5 名). Enhancement of TRAIL-induced apoptosis with novel TRAIL-R1-specific human mAbs

generated by immunospot array assay on a chip. 14th International Congress of Immunology, 2010, 8, 22-27, Kobe.

2. Kishi H (1 番目), Ozawa T (7 番目), Muraguchi A (8 番目) (他 5 名). Detection of antigen-specific T-cell response on the single cell-basis with microwell array chip. 4th Measuring Antigen-Specific Immune Response (MASIR) Conference, 2010, 6, 9-12, Mykonos, Greece.
3. Kishi H (2 番目), Ozawa T (5 番目), Muraguchi A (7 番目) (他 4 名). B-cell receptor signal analysis at single cell levels using a microwell-array chip. Cold Spring Harbor Meeting, 2009, 11, 11-14, New York.
4. Kishi H. Microwell arrays for detecting single, antigen-specific B-lineage cells. IBC's 19th Annual International Conference Antibody Engineering, 2008, 12, 7-11, San Diego.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immuno/top.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：60186210

##### (2) 研究分担者

杉山 英二 (SUGIYAMA EIJI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：70179167

(H20→H21, 22: 連携研究者)

村口 篤 (MURAGUCHI ATSUSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：20174287

小澤 龍彦 (OZAWA TATSUHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号：10432105

多喜 博文 (TAKI HIROFUMI)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号：10240780

(H21, 22)

篠田 晃一郎 (SHINODA KOICHIRO)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：40377312

(H21, 22)