

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～ 2011

課題番号：21591271

研究課題名（和文） ユビキチン-プロテアソーム系の自己抗体生産における意義の検討

研究課題名（英文） Association of linkage between autoantigens and, ubiquitin-proteasome system in autoantibody production

研究代表者

高崎 芳成（TAKASAKI YOSHINARI）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80154772

研究成果の概要（和文）：各種膠原病患者を対象とし、PA28 γ (Ki)および PA28 α のリコンビナント蛋白、および精製 20S プロテアソームを抗原源とした免疫ブロット法にてプロテアソームに対する免疫応答を解析した。その結果、一連のプロテアソーム構成蛋白間およびそれらの結合蛋白に対する免疫応答の間には有意な相関を認めるものの、非結合蛋白間の間には有意な相関が認められないことを明らかにした。また、プロテアソーム複合体の定量系を確立し、各種プロテアソームおよびその結合蛋白に対する抗体価が流血中プロテアソーム抗原量と相関する事を示した。以上の結果より、プロテアソームはその細胞内機能と関連しながらユビキチンを介して結合する一連の蛋白に対する免疫応答を誘導していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We studied immune response to components of proteasome using sera from patients with various connective tissue diseases by immunoblotting. Then, we found that there is a linkage of autoimmune response among components of proteasome and their binding proteins. In addition, We found that circulating proteasome detected by sandwich type ELISA is significantly associated with autoimmune response to proteasome and its binding proteins. These results suggested that the circulating ubiquitin-proteasome complex binding with autoantigens in association with its biologic function is playing an important role to induce autoimmune response to its binding antigens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：膠原病

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

キーワード：1)autoantigen, 2)proteasome, 3)ubiquitin, 4)autoantibody

1. 研究開始当初の背景

抗 PCNA モノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムで、PCNA 蛋白複合体を精製し、その構造を解析した結果、proteasome activator (PA) 700, 20S proteasome および PA28 (γ)₇ が結合した hybrid type プロテアソ

ームが PCNA に結合していることが示された。それ以前の研究で PCNA と PA28 γ (Ki) との間には免疫応答の連鎖があることが知られていたが、この結果はその根拠を示すものであった。そこで、このプロテアソームの自己抗原に対する免疫応答を誘導する役割を解析

する目的で、各種膠原病の患者におけるプロテアソームの構成成分に対する免疫応答について解析した。その結果、抗 PA28 γ 抗体が SLE の 24%、SjS の 13% に検出されるのに対し、他の proteasome の構成成分である PA28 α に対する抗体が SLE の 26%、primary SjS の 23% に検出されることが示され、両抗体の出現には連鎖が認められ、一方が陽性であると双方の出現率が 2 倍以上になることが示された。これらの結果より、プロテアソームに結合する蛋白に対する免疫応答には連鎖があり、その連鎖を誘導するのにプロテアソームがピボットとして作用することが示唆されていた。

2. 研究の目的

プロテアソームは ATP 依存性の蛋白分解酵素で、その基本構造は 20S プロテアソームと呼ばれ、相同性の高い $\alpha 1-\alpha 7$ および $\beta 1-\beta 7$ のサブユニットのそれぞれ 2 本の輪状構造を積み上げた円筒形の形態を有している。これに PA28 および PA700 と呼ばれる活性化因子が結合し、ユビキチン化されたタンパクなどを分解している。今日、この一連のユビキチン-プロテアソーム系構成蛋白に対する自己抗体が膠原病患者で検出されることが知られているが、本研究では SLE や SjS におけるプロテアソームおよびその結合蛋白に対する免疫応答の連鎖と、流血中プロテアソーム結合蛋白と抗体産生の関係を明らかにし、ユビキチン-プロテアソーム系を軸とした自己免疫応答誘導のメカニズムについて解析する。

3. 研究の方法

1) プロテアソームおよびその結合蛋白に対する免疫応答の解析

SLE 患者血清 300 例、RA 患者血清 200 例、強皮症患者血清 60 例、SjS 患者血清 100 例などを対象とし、我々がクローニングした PA28 γ (Ki) および PA28 α の cDNA を用いて作成したリコンビナント蛋白、および精製 20S プロテアソームを抗原源とした免疫プロット法にてプロテアソームに対する免疫応答を解析する。これと同時に上記にてプロテアソームとの結合が確認された自己抗原に対する抗体を 60KD および 52KD SS-A 抗原、PCNA、U1 RNP、Sm などのように既に我々がリコンビナント抗原を有しているものは免疫プロット法、その他の蛋白に関しては各抗原に応じて免疫沈降法、ELISA 法および二重免疫拡散法などでそれぞれの自己抗体を測定する。上述の方法で検出されたプロテアソームとその結合蛋白との免疫応答の連鎖について解析し、非プロテアソーム結合蛋白に対する免疫応答との相違を明らかにする。

2) 流血中プロテアソームと抗体産生の検討：

我々これまで流血中 PCNA 蛋白複合体を二つの異なるモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ式 ELISA 法で測定し、実績を上げてきたが、今回は我々の樹立した一つの抗 PA28 γ (Ki) モノクローナル抗体とそれと異なるエピトープを認識する高い特異性を有する SLE 患者由来の抗 Ki 抗体を用いたサンドイッチ式 ELISA 法で患者血清中のプロテアソーム複合体を定量する。そしてこれらの症例において各種プロテアソームおよびその結合蛋白に対する抗体を測定し、その抗体価の推移と血中プロテアソームの濃度との関係を明らかにする。また、ウサギ胸腺アセトンパウダー PBS 抽出液より精製したプロテアソーム結合蛋白を抗原源とした免疫プロット法により各構成蛋白に対する免疫応答の伝播と血中プロテアソームの濃度の関係を明らかにする。

4. 研究成果

1) 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清 300 例、関節リウマチ (RA) 患者血清 200 例、強皮症患者 (ssc) 者血清 60 例、Sjogren 症候群 (SjS) 患者血清 100 例などを対象とし、PA28 γ (Ki) および PA28 α の cDNA を用いて作成したリコンビナント蛋白、および精製 20S プロテアソームを抗原源とした免疫プロット法にてプロテアソームに対する免疫応答を解析し、PA28 γ (Ki) に対する抗体は主として SLE、PA28 α に対する抗体は主として SjS に検出されることを明らかにした。

2) プロテアソームとの結合が確認されている自己抗原、60KD および 52KD SS-A 抗原、PCNA に対する抗体や、プロテアソームとの結合を認めない U1 RNP、Sm などの抗原に対する抗体の免疫応答の連鎖について免疫プロット法で解析した結果、一連のプロテアソーム構成蛋白間およびそれらの結合蛋白に対する免疫応答の間には有意な相関を認めるものの、非結合蛋白に対する免疫応答の間には有意な相関が認められないことを明らかにした。

3) 抗 PA28 γ (Ki) モノクローナル抗体とそれと異なるエピトープを認識する高い特異性を有する SLE 患者由来の抗 Ki 抗体を用いたサンドイッチ式 ELISA 法で患者血清中のプロテアソーム複合体を定量系を確立し、各種プロテアソームおよびその結合蛋白に対する抗体を測定し、その抗体価の推移と血中プロテアソームの濃度との関係を検討した結果、PA28 γ および PA28 α の抗体価と流血中プロ

テアソーム抗原量の間に関連が見られることが示された。この過程でユビキチンを介してプロテアソームと結合している PCNA に対する免疫応答の関連も認められることが示された。

以上の結果より、プロテアソームはその細胞内機能と関連しながらユビキチンを介して自己抗原と結合し、流血中に放出されたユビキチン-プロテアソーム系蛋白複合体はその抗原提示により一連の蛋白に対する相互に関連する免疫応答を誘導していることが示唆された。

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 7 件)

1) Nozawa K, Ikeda K, Satoh M, Reeves WH, Stewart CM, Li YC, Yen TJ, Rios RM, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I, Takasaki Y, Chan EK: Autoantibody to NA14 is an independent marker primarily for Sjogren's syndrome. *Front Biosci* 14: 3733-3739, 2009 査読有

2) Matsushita M, Matsudaira R, Ikeda K, Nawata M, Tamura N, Takasaki Y: Anti-proteasome activator 28 α is a novel anti-cytoplasmic antibody in patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol* 19: 622-628, 2009 査読有

3) Nakano S, Morimoto S, Suzuki S, Watanabe T, Amano H, Takasaki Y: Up-regulation of the endoplasmic reticulum transmembrane protein UNC93B in the B cells of patients with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 49: 876-881, 2011 査読有

4) Toyama S, Tamura N, Haruta K, Karakida T, Mori S, Watanabe T, Yamori T, Takasaki Y: Inhibitory effects of ZSTK474, a novel phosphoinositide 3-kinase inhibitor, on osteoclasts and collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* 12: R92 1-11, 2010 査読有

5) Minowa K, Amano H, Nakano S, Ando S, Watanabe T, Nakiri Y, Amano E, Tokano Y, Morimoto S, Takasaki Y: Elevated serum level of circulating syndecan-1 (CD138) in active systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 44: 357-362,

2011 査読有

6) Kawamoto T, Abe Y, Ito J, Makino F, Kojima Y, Usui Y, Ma J, Morimoto S, Yagita H, Okumura K, Akiba H, Takasaki Y: Anti-T cell immunoglobulin and mucin domain-2 monoclonal antibody exacerbates collagen-induced arthritis by stimulating B cells. *Arthritis Res Ther* 13: R47, 2011 査読有

7) Matsudaira R, Tamura N, Sekiya F, Ogasawara M, Yamanaka K, Takasaki Y: Anti-Ro/SSA Antibodies Are an Independent Factor Associated with an Insufficient Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 38:2346-2354, 2011 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1) Yamanaka K, Nakano S, Kanai Y, Asano M, Ikeda K, Thoyama S, Ishiyama K, Takasaki Y: Prevalence and Clinical Significance of the Anti-p53 Antibody in Systemic Lupus Erythematosus. 73th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2009, Oct 19

2) Takasaki Y: Autoantibodies in Connective Tissue Diseases—Its Mechanism of Production and Clinical Significance. Asia Pacific League of Associations for Rheumatology with the Philippine Rheumatology Association, APLAR REVIEW COURSE, Manila, Philippine, 2009, November 27

3) Matsudaira R, Tamura N, Sekiya F, Watanabe T, Ogasawara M, Takasaki Y: Anti-Ro/SS-A antibody is an independent factor of insufficient response to anti-TNF-alpha monoclonal antibodies in patients with rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology 2010, Rome, 2010, June 17. (*Ann Rheum Dis* 69 (Suppl3): 209, 2010)

4) Kawamoto T, Akiba H, Abe Y, Morimoto S, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y: The Role for TIM-2 in Collagen-Induced Arthritis. 74th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, Atlanta, USA, 2010, Nov 10. (Abstract S720).

5)Nozawa K, Fujishiro M, Takasaki Y, Sekigawa: REGENERATING GENE (REG) 1 ALPHA PROMOTES PROGRESSION IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS. ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY 2011, London, British, 2011, July 27.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高崎 芳成 (TAKASAKI YOSHINARI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号 : 80154772