

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890277

研究課題名（和文） 関節リウマチ滑膜の病変局所で産生される抗体の解析と「酵素抗原法」への応用

研究課題名（英文） Identifying antigens against antibodies produced in lesional synovium of rheumatoid arthritis and application of the enzyme-labeled antigen method

研究代表者

水谷 泰嘉 (MIZUTANI YASUYOSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：10546229

研究成果の概要（和文）：関節リウマチの病変滑膜で産生される抗体の標的抗原を明らかにするため、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系で構築したヒトタンパク質ライブラリから、患者血清および滑膜抽出液が反応するタンパク質を、AlphaScreen 法により探索した。複数のタンパク質が検出された。検出シグナルの高かった一部のタンパク質を用いて、滑膜組織切片で酵素抗原法を行ったところ、2種の抗原で滑膜組織上の形質細胞に特異的な陽性像が認められた。組織抽出液を用いることにより、病変で産生される抗体の標的抗原の網羅的な探索が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To identify antigens against antibodies produced within rheumatoid arthritis (RA) synovitis, antigens recognized by antibodies in sera and synovial tissue extracts were screened with the AlphaScreen method. For screening, human protein library was constructed by the wheat germ cell-free protein synthesis system. As a result, a number of proteins were detected. A part of antigens showing high signals in synovitis tissue were applied to the enzyme-labeled antigen method. Specific antibodies against two antigens were visualized in plasma cells in RA synovitis. The present study indicated the usefulness of screening of the protein library with the AlphaScreen method for detecting antibodies in lesional tissue.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	910,000	273,000	1,183,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,960,000	588,000	2,548,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：酵素抗原法、抗体産生細胞、無細胞タンパク質合成系、関節リウマチ、自己免疫疾患、自己抗原、AlphaScreen、免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体の病態への関与が示唆されているもの

の、関節リウマチの真の原因は不明であり、治療には非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド、メトトレキサートなどの抗リウマチ薬、

免疫抑制剤ないし TNF- $\alpha$  に対するヒトモノクローナル抗体による対症療法が行われている。重度の関節障害のために手術を要する場合があります。患者の QOL を大きく低下させることから、原因解明と根治療法の確立が望まれている。

関節リウマチの病態の特徴として、その滑膜病変の局所には、リンパ濾胞の形成とともに多数の形質細胞が浸潤している。しかし、これらの形質細胞から産生される抗体の標的抗原は明らかにされていない。病変局所に浸潤することから、病態形成に関連した抗体を産生している可能性が高い。そのため、これらの抗体の標的抗原を明らかにすれば、関節炎の成因となる自己抗原の同定など、疾患の病態解明に寄与できる可能性がある。

本研究の第二の目的に掲げる「酵素抗原法」は、酵素やビオチンなどで抗原を標識して組織切片と反応させることによって、組織切片上の特異抗体産生細胞を可視化する組織化学的手法である。標識抗体を用いる免疫染色（酵素抗体法）の裏返しの方法である。本技法は従来、免疫学的な基礎研究に用いられたのみで、臨床病態解析に応用されたことはない。したがって、本研究で得られた抗原にビオチンなどの小分子を標識して、関節リウマチの病変局所に浸潤する形質細胞に対して、「酵素抗原法」を臨床病態へ応用することは、重要である。

当研究室では、酵素抗原法の技術開発を行ってきた。これまでに、horseradish peroxidase、ovalbumin、keyholelimpet hemocyanin を免疫したラットのリンパ節を対象として、酵素抗原法の再現を行った結果、抗原特異的抗体産生細胞の可視化に成功した。抗原投与部位に近い所属リンパ節では、全体の 40% に及ぶ形質細胞に各抗原に対する抗体産生所見が得られた。この成績から、特定抗原に対する抗体を産生する形質細胞が、病変局所特異的に集簇していると推測された。以上から、関節リウマチにおいて、滑膜組織から抗体を抽出して抗原解析を行えば、病変部特異的に抗原として感作している分子を同定できる可能性が高いと考えられる。

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター遠藤研究室では、コムギ胚芽を利用した無細胞タンパク質合成法を確立している。この方法により、一度に多種類のタンパク質を、cDNA から直接、短期間、高収量に、全自動で合成することが可能である。大腸菌や細胞を用いたタンパク質合成法と比較して、効率的にタンパク質を合成することが可能である。無細胞系であることから、タンパク質精製が不要であり、酵素抗原法の有用な抗原供給源となる。

これまでに遠藤研究室では、無細胞タンパ

ク質合成系を利用して、6000 種類を超すヒトやマウスのタンパク質の発現に成功しており、これらのタンパク質を集めたヒト・マウスタンパク質ライブラリを構築している。遠藤研究室では、このタンパク質ライブラリをリウマチ患者血清と反応させて特異抗原を検索した結果、32 種類の疾患特異的な抗原をすでに見出している。

病変組織自体に含まれる抗体を用いれば、病態に密接に関連した解析が可能になると思われる。われわれは、遠藤研が構築したヒト・マウスタンパク質ライブラリを、自己抗原ライブラリとして利用することで、リウマチ病変滑膜で産生される抗体の標的抗原を解析して、疾患に関連する自己抗原を探るとともに、ビオチン標識した抗原をプローブとして「酵素抗原法」へ応用する。

## 2. 研究の目的

本研究は、関節リウマチの滑膜病変に浸潤する形質細胞（抗体産生細胞）から産生される抗体の分析をとおして、その病態を解析し、診断や治療へ貢献することを到達目標とする。関節リウマチの滑膜病変局所には、リンパ濾胞形成とともに、多数の形質細胞（抗体産生細胞）が浸潤している。しかし、これら形質細胞が産生する抗体の標的抗原は不明である。病変局所で産生されることから、疾患に関連した抗体である可能性が高い。関節リウマチの病変に浸潤する形質細胞から産生される抗体の標的抗原を明らかにすることにより、疾患の病態解析・診断および治療に有用な抗体や抗原が同定されることが期待される。さらに、標識抗原が組織切片上の特異抗体と反応することを利用して、組織内に分布する特異抗体産生細胞を証明する「酵素抗原法」の、関節リウマチへの応用（ヒト病変における抗体産生細胞の証明）が、第二の重要な目的である。

本研究では、愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター遠藤弥重太研究室が構築したタンパク質ライブラリから、関節リウマチ滑膜病変で産生される抗体の標的抗原タンパク質を検索する。

本研究で解明する内容は、次の 2 点である。

1) 関節リウマチの滑膜病変で産生される抗体の標的自己抗原を明らかにする。2) 標的自己抗原をプローブとして、酵素抗原法で自己抗原特異的抗体産生細胞を可視化する。

そのために、関節リウマチの滑膜病変組織のホモジネート上清を調製して、ヒト・マウスタンパク質ライブラリから、病変組織の抗体が反応する自己抗原を検索し、患者血清の反応性を比較する。そのうえで、病変組織の抗体が特異的に反応する自己抗原を標識プローブとして、凍結切片を対象に酵素抗原法染色を行い、自己抗体産生部位の局在観察を

試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究材料の採取

関節リウマチと診断された患者において、滑膜切除外科手術が施行された際に切除された病理組織標本から、研究用に一部を採取した。同時に採血を行い、血清を採取した。臨床材料の研究使用については、口頭および書面による説明を行い、患者から書面による同意を得た。この研究は、藤田保健衛生大学疫学・臨床研究倫理委員会の承認を得たうえで実施した。

#### (2) 病理組織標本の作製

研究用に採取した滑膜を小片に分割して、一部を4%パラホルムアルデヒドで4時間浸漬固定した。固定後、織片を凍結包埋材へ浸漬して、ドライアイスアセトンで凍結ブロックを作製した。凍結した組織片から凍結組織切片を作製した。

#### (3) 抗原検索用組織抽出液の調製

研究用に採取した滑膜において、病理組織標本を作製した小片に隣接する組織片を、組織100mgあたり300 $\mu$ lの0.01M PBS中で、ポリトロンホモジナイザーによりホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離して上清を組織抽出液として回収した。このサンプルを、AlphaScreen解析に用いた。

#### (4) 無細胞タンパク質合成系による N 末ビオチン化タンパクライブラリの作製

抗原タンパク質ライブラリは、愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター遠藤研究室で構築されたものを活用した。ライブラリ構築は以下のように行われた。

ヒト cDNA ライブラリ Mammalian gene collection (MGC clone, DANAFORM, Japan) から Gene Ontology データベースを基盤に膜タンパクを中心とする遺伝子と、自己免疫疾患との関連性が示唆されている自己免疫疾患感受性遺伝子座上にコードする遺伝子が選抜された。そして、選抜された cDNA が組込まれたプラスミドを鋳型に、split-primer PCR 法を用いて SP6 RNA ポリメラーゼプロモータ配列・翻訳促進配列、6 $\times$ His-tag 配列、およびビオチンリガーゼ認識配列を付加し、転写鋳型を構築した。その後、SP6 RNA ポリメラーゼによる *In vitro* 転写によって mRNA を合成し、エタノール沈殿を行った後に、ビオチンリガーゼ存在下でコムギ胚芽無細胞タンパク合成系を用いて N 末ビオチン化タンパク質ライブラリを構築した。

#### (5) 滑膜ホモジナイズ上清および血清を用いた自己抗原タンパク質の網羅的な探索

遠藤研が構築したタンパク質ライブラリの 2183 種のタンパク質を対象に、関節リウマチ患者血清および組織抽出液が反応する抗原を AlphaScreen 法により検索した。

AlphaScreen 法は以下のように実行した。すべての反応は、384 ウェルのマイクロプレート上で最終濃度 100 mM Tris-HCl、0.01% (v/v) Tween-20、0.1% (w/v) bovine serum albumin の溶液存在下で反応を実行した。まず、抗原抗体反応のために、ビオチン化タンパク質を含む翻訳反応液 1 $\mu$ l を、0.0125 $\mu$ l の滑膜ホモジナイズ上清、または 0.025 $\mu$ l の血清と全 15 $\mu$ l の反応溶液中で混合し、26 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。その後、各最終濃度 12 $\mu$ g/ml の Streptavidin-coated donor beads および Protein G coated-acceptor beads を各ウェルに 10 $\mu$ l 分注し、マイクロプレートを遮光状態で 26 $^{\circ}$ C 1 時間反応させた。反応終了後に、2104EnVision マルチラベルカウンターを用いて、各ウェルに 680nm の励起光を照射し、520~620nm の蛍光強度を測定した。

ネガティブコントロールとして、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系で、RNA 非存在下で反応を行った翻訳反応液を用いた。各プレートのネガティブコントロールの検出値の平均値を Noise、各ビオチン化タンパク質の測定値を Signal として、Signal/Noise (S/N) 比を算出した。この値を抗原抗体反応強度の指標とした。

#### (6) 酵素抗原法の実施

AlphaScreen法による抗原タンパク質探索の結果、組織抽出液で特にS/N比が高かった上位5種の抗原タンパク質を患者ごとに選抜して、対応する患者の凍結切片を対象として、酵素抗原法を行った。具体的には、凍結切片を流水水先した後、0.3%過酸化水素加メタノールで30分処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化した。流水およびPBSで切片を洗浄した後、コムギ胚芽無細胞タンパク合成系で調製した未精製のビオチン化タンパク質溶液を切片上で、室温で1時間反応させた。切片をPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識streptavidinを1時間反応させた。切片をPBSで洗浄した後、ジアミノベンジジン、過酸化水素含有トリス塩酸緩衝液へ浸漬して発色反応を行った。発色後、切片をヘマトキシリンで対比染色し、脱水および透徹後、非水溶性封入剤で封入した。プロテイナーゼK処理による抗体賦活化も検討した。対照コントロールとして、変形性関節症の滑膜組織の染色も行った。

#### (7) 酵素抗原法陽性細胞の抗 CD138 抗体による免疫染色

ビオチン化抗原による酵素抗原法における陽性細胞が形質細胞であることを確認す

る目的で、抗 CD138 抗体（形質細胞マーカー）とビオチン化抗原による蛍光二重染色を行った。抗 CD138 抗体（マウス IgG）は Alexa fluor 568 標識抗マウス IgG により検出し、ビオチン化抗原は Alexa fluor 488 標識 streptavidin により検出した。各反応は室温で 1 時間行い、染色後、DAPI 入り封入剤で封入した。

#### (8) 精製ビオチン化タンパク質による酵素抗原法

選抜した 18 種類のタンパク質について、未精製タンパク質と精製タンパク質による酵素抗原法の染色を比較する目的で、精製タンパク質を用いた酵素抗原法を実施した。精製タンパクの調製は、抗原タンパク質をコードする cDNA を無細胞タンパク質合成用プラスミドベクター pEU-E01GW に組み込み、これを転写鑄型として His-tag 融合タンパク質を調製したのち、Ni-NTA sepharose によるアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

## 4. 研究成果

### (1) 滑膜ホモジナイズ上清中の抗体と反応する抗原タンパク質の網羅的な探索

コム胚芽無細胞タンパク質合成系で作製した 2183 種のビオチン化ヒト自己抗原タンパク質を対象に、関節リウマチ患者血清および滑膜組織抽出液中の抗体が反応する抗原タンパク質を AlphaScreen 法により探索した。その結果、複数のタンパク質において、シグナルが高値を示した。また、滑膜ホモジナイズ上清と血清における同一抗原に対する抗原抗体反応シグナルについて、一部の抗原で異なるパターンが認められたものの、組織抽出液でシグナルの高い抗原タンパク質は、血清でもシグナルが高い傾向が認められ、多くのタンパク質において、組織抽出液と血清が類似した反応パターンを示した。

### (2) 病変組織破碎上清中の抗体が反応する抗原による酵素抗原法

滑膜ホモジナイズ上清を用いた網羅的な抗原タンパク質の探索結果から、各患者において S/N 比が上位 5 種類のビオチン化タンパク質を選抜した。そして、重複を除いた合計 18 種類のビオチン化タンパク質をプローブとして、対応する患者滑膜組織の 4% パラホルムアルデヒド固定後凍結切片を対象に、酵素抗原法を実施した。その結果、2 種の抗原において、滑膜組織上の一部の形質細胞に特異的な陽性像が認められた（図 1）。

これらうちのひとつは、F box protein 2 (FBX02) であり、もうひとつは tripartite motif-containing 21 (TRIM21) であった。

proteinase K 処理により、TRIM21 では染色性が向上した。しかし、FBX02 では染色性が減弱した。

これらの抗原タンパク質では、AlphaScreen 法における滑膜ホモジナイズ上清を用いた S/N 比は、96.4 および 77.6 であった。他の抗原タンパク質と滑膜ホモジナイズ上清との S/N 比は、最大でも 17 であり、これら 2 種の抗原タンパク質の反応シグナルは、明らかに高値であった。

一方、他の抗原タンパク質では、ほぼすべての形質細胞が陽性であったり、形質細胞以外の細胞にも非特異的陽性像が認められたり、あるいは組織全体において陰性であり、特異的な陽性染色像は検出できなかった。

陽性反応が認められた 2 種のビオチン化抗原タンパク質 (FBX02 および TRIM21) の特異性を検討するために、5 例の関節リウマチおよび 3 例の変形性関節症の組織切片を対象として、酵素抗原法を実施した。その結果、TRIM21 では AlphaScreen で高いシグナルを示した患者組織でのみ陽性細胞が認められた。一方、FBX02 では、AlphaScreen シグナルの低値の各患者組織においても形質細胞様の細胞に陽性像が認められた。組織切片上で特異的反応と非特異的反応の両方を検出している可能性が考えられ、今後の検証が必要である。

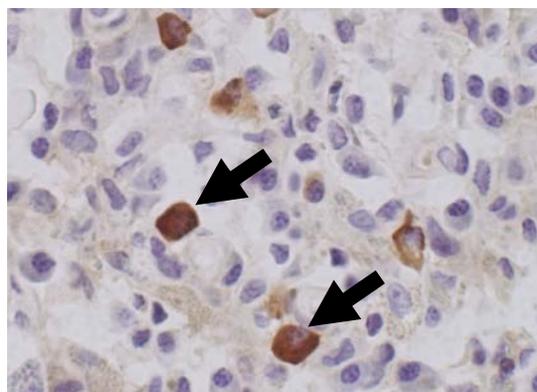


図 1 関節リウマチ滑膜組織における TRIM21 による酵素抗原法（矢印：陽性細胞）

### (3) 抗 CD138 抗体とビオチン化抗原との蛍光二重染色

FBX02 と TRIM21 について、染色された細胞が形質細胞であることを確認するため、形質細胞マーカー（抗 CD138 抗体）と抗原タンパク質による二重染色を行った。その結果、抗原タンパクで染色される細胞に CD138 陽性像が認められ、抗原タンパク質で染色された細胞が形質細胞であることを示す補助的な結果が得られた（図 2）。

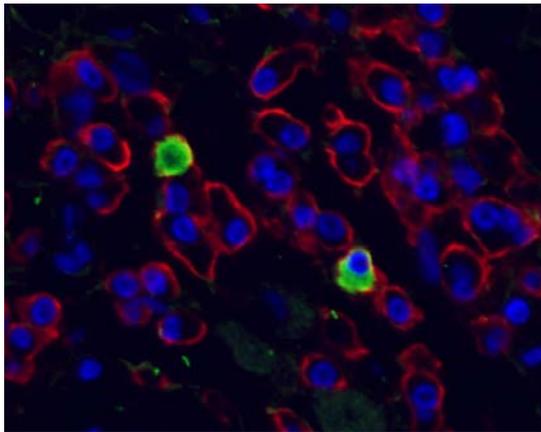


図2 関節リウマチ滑膜組織における TRIM21 による酵素抗原法 (緑) と抗 CD138 抗体 (赤) による蛍光二重染色

#### (4) 精製ビオチン化タンパク質による酵素抗原法

未精製タンパク質と精製タンパク質による酵素抗原法の染色性を比較する目的で、精製タンパク質を用いた酵素抗原法を実施した。選抜した18種類のうち、10種類のタンパク質について精製タンパク質合成用プラスミドを構築することができた。TRIM21では、精製タンパク質は未精製タンパク質と同等の染色性を示した。FBX02では、未精製の場合と比べ、精製タンパクでは背景染色が強かった。抗原溶液に0.05%のTween20を添加することにより、未精製タンパク質と同等の染色像が確認された。未精製タンパク質で特異的な陽性像が認められなかった他のタンパク質については、精製タンパク質による染色性改善は認められなかった。

プラスミドを構築できなかった8種のタンパク質については精製タンパク質による染色性を検討できなかった。

#### (5) 研究成果の総括

以上の結果から、コムギ胚芽無細胞系により作製した抗原ライブラリと病変組織抽出液を利用して、病変局所で特異的に産生される抗体の標的抗原タンパク質の網羅的な探索が可能であることが明らかとなった。さらに、無細胞合成系で作製したビオチン化タンパク質を、未精製の状態で、酵素抗原法のプローブとして使用できることが明らかとなった。

本技術は、関節リウマチだけでなく、他の自己免疫疾患や感染症など、形質細胞浸潤の顕著な疾患に応用可能である。とくに感染症など、抗原となる対象が明らかな疾患については、より効率的な抗原検索が可能と思われる。今後、本技術のさまざまな疾患への応用が期待される。

### 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1件)

①Shinya Tsuge, Yasuyoshi Mizutani, Kazuhiro Matsuoka, Tatsuya Sawasaki, Yaeta Endo, Koji Naruishi, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba, Kazuya Shiogama, Ken-ichi Inada, and Yutaka Tsutsumi. Specific in situ visualization of plasma cells producing antibodies against porphyromonas gingivalis in gingival radicular cyst: application of the enzyme-labeled antigen method. J Histochem Cytochem. In press, 2010. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

①水谷 泰嘉. コムギ無細胞タンパク質合成系を利用した病変局所で産生される抗体の標的抗原検索法の開発. 第100回日本病理学会総会. 2011年4月30日. パシフィコ横浜(神奈川県)

②水谷 泰嘉. コムギ無細胞タンパク質合成系を利用した病変局所で産生される抗体の標的抗原検索法の開発. 藤田学園医学部第42回総会. 2010年10月8日. 藤田保健衛生大学(愛知県)

③水谷 泰嘉. horseradish peroxidase 免疫ラットを用いた酵素抗原法の技術開発: 免疫回数と特異抗体産生細胞数の関連性. 第99回日本病理学会総会. 2010年4月27日. 京王プラザホテル(東京都)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 抗原検索法及び抗体検出法

発明者: 堤 寛、水谷 泰嘉、遠藤 弥重太、澤崎 達也、松岡 和弘

権利者: 学校法人藤田学園、国立大学法人愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-79277

出願年月日: 平成 22 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/pathology1/>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 泰嘉 (MIZUTANI YASUYOSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：10546229

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし