

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08266

研究課題名(和文) 免疫沈降法による膠原病患者血清中の自己抗体の同定と臨床的特徴の検討

研究課題名(英文) Identification of autoantibodies by immunoprecipitation assays and clinical characteristics in patients with connective tissue diseases

研究代表者

濱口 儒人 (Hamaguchi, Yasuhito)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：60420329

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)：全身性強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎で検出される自己抗体について、Line blot法と免疫沈降法との一致率は、カットオフ値の設定によらず高確率で一致するグループ、カットオフ値の設定により一致率が向上するグループ、カットオフ値の設定によらず一致率が低い群に分類された。したがって、Line blot法の結果を解釈する際には、これらの特性を考慮に入れる必要があると考えられた。全身性強皮症関連自己抗体陰性群の臨床的特徴について検討したところ、自己抗体陰性群の臨床的特徴は抗トポイソメラーゼ 抗体陽性群に類似しており、自己抗体陰性群は特徴的なサブグループを形成していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、全身性強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎患者血清中に存在する自己抗体を免疫沈降法により同定し、その結果をLine blot法と比較することでLine blot法の妥当性を検討したところ、Line blot法の結果の解釈は慎重に行う必要があることが明らかになった。また、全身性強皮症において全身性強皮症関連自己抗体陰性の症例について臨床的特徴を明らかにした。本研究により自己抗体の同定方法に関する重要性が認識され、全身性強皮症の特定のサブセットの臨床的特徴が明らかになったことは膠原病診療の飛躍に貢献しており、学術的意義があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the performance of a commercial line blot (LB) assay in comparison with immunoprecipitation (IP) assays. When a cut-off was adjusted to reconcile with the results of IP assays, the detection performance of LB assay was improved for anti-EJ, anti-PL-7, anti-PL-12, anti-SRP, anti-topoisomerase I and anti-RNA polymerase III antibodies (Abs). However, the results of anti-Mi-2, anti-U3 RNP, anti-Th/To, anti-hUBF and anti-Ku Abs remained discordant between the LB assay and IP assays at all cut-off levels. Therefore, detection of autoAbs using a commercial LB assay requires great caution. We examined the clinical features of systemic sclerosis (SSc) patients negative for SSc-related autoAbs. Clinical features between patients negative for SSc-related autoAbs and those with anti-topoisomerase I Abs were similar. Therefore, patients negative for SSc-related autoAbs form a clinically distinct subset among SSc patients.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 皮膚筋炎 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc) と皮膚筋炎 (Dermatomyositis; DM) では複数の疾患特異的自己抗体が検出される。SSc は線維化、血管障害、自己免疫を特徴とする疾患で、その 90% 以上で抗核抗体が検出される。SSc の代表的な症状は皮膚硬化であるが、合併症として皮膚潰瘍、間質性肺炎、強皮症腎クリーゼなどがある。代表的な SSc 特異的自己抗体は抗セントロメア抗体、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 RNA ポリメラーゼ抗体だが、それ以外にも抗 U3 RNP 抗体、抗 Th/To 抗体、抗 hUBF 抗体、抗 U11/U12 RNP 抗体、抗 eIF2B 抗体、抗 U1 RNP 抗体、抗 Ku 抗体、抗 PM-Scl 抗体、抗 RuvBL1/2 抗体が SSc 特異的あるいは関連自己抗体として知られている。

DM と多発性筋炎 (Polymyositis; PM) は自己免疫性の炎症性筋疾患に位置づけられている。DM は皮膚にも病変を生じ、合併症として間質性肺炎と悪性腫瘍を一定頻度で伴う。DM の臨床像は不均一性が強く、筋炎についても明瞭な筋症状を有する症例から明らかな筋症状を伴わない症例まで多様である。PM/DM 特異的自己抗体として、抗 ARS 抗体、抗 Mi-2 抗体、抗 MDA5 抗体、抗 TIF1 抗体、抗 NXP-2 抗体、抗 SRP 抗体、抗 SAE 抗体などが同定されている。

臨床症状に不均一性が強い SSc、PM/DM はいくつかのサブグループに分類されることが以前から知られていた。近年、このサブグループ分類に自己抗体が有用であることが明らかになった。したがって、SSc と PM/DM の診療において自己抗体を同定することは重要である。しかし、簡便に測定できる酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA 法) が利用できる自己抗体は限られており、多くはアイソトープを用い手技の煩雑な免疫沈降法が同定に必要である。そのため、免疫沈降法でしか同定できない自己抗体についてはその臨床的特徴が十分に明らかにされていない。一方、ELISA 法の変法である Line blot 法が開発され主に欧米で広く用いられているが、Line blot 法は偽陽性率が高いことが経験的に知られており、本来は陽性ではない症例が陽性と判断される可能性がある。しかし、Line blot 法の精度について免疫沈降法と比較した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、SSc、PM/DM を中心とする膠原病患者血清中に存在する自己抗体を免疫沈降法により同定し、Line blot 法との一致率を検討した。また、SSc 患者について自己抗体に基づく臨床的特徴の解析も行った。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法による自己抗体の同定

ヒト白血病由来 K562 細胞抽出物を用いた免疫沈降法によって血清中の自己抗体を同定した。免疫沈降法にはアイソトープを用いずに RNA を沈降する RNA-免疫沈降法と、³⁵S-メチオニンで標識した K562 細胞抽出物を抗原としタンパク成分を沈降する protein-免疫沈降法がある。RNA-免疫沈降法、Protein-免疫沈降法とも被検血清を IgG 結合プロテイン A セファロース粒子と反応させ、形成された免疫複合物より RNA-免疫沈降法ではフェノール抽出、尿素-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) で泳動後に銀染色により検出した。Protein-免疫沈降法は SDS 抽出、SDS-PAGE で分画後にオートラジオグラフィにより可視化した。標準血清と被検血清を並べて泳動することで自己抗体を同定した。

(2) 免疫沈降法と Line blot 法の比較

代表的な Line blot 法である Euroline®の有用性について免疫沈降法と比較した。免疫沈降法の結果に対する Euroline®の感度、特異度、偽陽性率、偽陰性率、正疹率について検討することで、Euroline®が臨床で有用な検査かどうか評価した。

(3) SSc 関連自己抗体陰性 SSc の臨床的特徴の検討

SSc 患者の自己抗体を免疫沈降法により検討し、SSc 関連自己抗体陰性 SSc (55 例) の臨床的特徴について、抗セントロメア抗体陽性群 (224 例)、抗トポイソメラーゼ 抗体陽性群 (145 例)、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性群 (52 例) と比較した。

4. 研究成果

(1) 免疫沈降法と Line blot 法の比較

最初に SSc 関連自己抗体について検討した (表 1)。免疫沈降法との一致率は、カットオフ値の設定によらず高確率で一致するグループ (抗セントロメア抗体、抗トポイソメラーゼ III 抗体、抗 RNA ポリメラーゼ)、カットオフ値の設定により一致率が向上するグループ (抗 Ku 抗体)、カットオフ値の設定によらず一致率が低い群 (抗 U3RNP 抗体、抗 Th/To 抗体、抗 hUBF 抗体) に分類された。

表 1. 全身性強皮症関連自己抗体における免疫沈降法 (IP) と Line blot (LB) 法の一致率

自己抗体	Cut-off level	IP+ LB+	IP- LB+	IP+ LB-	IP- LB-	Agreement (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	False positive (%)	False negative (%)	Cohen's κ (95%CI)
ACA*	1+	35	0	0	265	100	100	100	0	0	1.0 (1.00-1.00)
	2+	35	0	0	265	100	100	100	0	0	1.0 (1.00-1.00)
	3+	35	0	0	265	100	100	100	0	0	1.0 (1.00-1.00)
Anti-topo I	1+	50	4	4	242	97.3	92.6	98.4	7.4	7.4	0.91 (0.85-0.97)
	2+	48	0	6	246	98.0	88.9	100	0	11.1	0.93 (0.87-0.99)
	3+	45	0	9	246	97.0	83.3	100	0	16.7	0.89 (0.82-0.96)
Anti-RNAP	1+	20	4	4	272	97.3	83.3	98.6	16.7	16.7	0.82 (0.70-0.94)
	2+	19	1	5	275	98.0	79.2	99.6	5	20.8	0.85 (0.74-0.97)
	3+	16	0	8	275	90.7	66.7	100	0	33.3	0.79 (0.64-0.93)
Anti-U3 RNP	1+	7	4	2	287	98.0	77.8	98.7	36.4	22.2	0.69 (0.45-0.92)
	2+	0	1	9	290	96.7	0	99.7	100	100	0.00 (0-0.005)
	3+	0	0	9	291	97.0	0	100	0	100	NA (NA)
Anti-Th/To	1+	3	3	6	288	97.0	33.3	99.0	50	66.7	0.39 (0.07-0.70)
	2+	3	0	6	291	98.0	33.3	100	0	66.7	0.49 (0.15-0.84)
	3+	3	0	6	291	98.0	33.3	100	0	66.7	0.49 (0.15-0.84)
Anti-hUBF	1+	3	6	1	290	97.7	75	98.0	66.7	25	0.45 (0.11-0.79)
	2+	3	3	1	293	98.7	75	99.0	50	25	0.59 (0.23-0.96)
	3+	3	2	1	294	99.0	75	99.3	40.0	25	0.66 (0.30-1.00)
Anti-Ku	1+	12	25	2	261	91.3	85.7	91.3	67.6	14.3	0.43 (0.26-0.60)
	2+	12	9	2	277	96.3	85.7	96.9	42.9	14.3	0.67 (0.48-0.85)
	3+	12	3	2	283	98.3	85.7	99.0	20	14.3	0.82 (0.66-0.97)

*ACA は蛍光抗体間接法により同定した。ACA: anti-centromere antibody; Topo I: topoisomerase I; RNAP: RNA polymerase; NA: not available.

次に PM/DM 特異的自己抗体について検討した (表 2)。免疫沈降法との一致率は、カットオフ値の設定によらず高確率で一致するグループ (抗 Jo-1 抗体)、カットオフ値の設定により一致率が向上するグループ (抗 EJ 抗体、抗 PL-7 抗体、抗 PL-12 抗体)、カットオフ値の設定によらず一致率が低い群 (抗 Mi-2 抗体) に分類された。

表 2. PM/DM 特異的自己抗体における免疫沈降法 (IP) と Line blot (LB) 法の一致率

自己抗体	Cut-off level	IP+ LB+	IP- LB+	IP+ LB-	IP- LB-	Agreement (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	False positive (%)	False negative (%)	Cohen's κ (95% CI)
Anti-Jo-1	1+	14	2	0	284	99.3	100	95.9	12.5	0	0.93 (0.83-1.00)
	2+	14	1	0	285	99.3	100	96.3	6.7	0	0.96 (0.89-1.00)
	3+	14	0	0	286	100	100	100	0	0	1.0 (1.00-1.00)
Anti-EJ	1+	11	2	1	286	99.0	91.7	99.3	15.4	8.3	0.87 (0.73-1.00)
	2+	10	0	2	288	99.3	83.3	100	0	16.7	0.91 (0.76-1.00)
	3+	8	0	4	288	98.7	66.7	100	0	33.3	0.79 (0.60-0.99)
Anti-PL-7	1+	7	4	1	288	98.3	87.5	98.6	36.4	12.5	0.73 (0.50-0.96)
	2+	7	4	1	288	98.3	87.5	98.6	36.4	12.5	0.73 (0.50-0.96)
	3+	7	0	1	292	99.7	87.5	100	0	12.5	0.93 (0.80-1.00)
Anti-PL-12	1+	4	1	0	295	99.7	100	99.6	20	0	0.89 (0.67-1.00)
	2+	4	0	0	296	100	100	100	0	0	1.0 (1.00-1.00)
	3+	3	0	1	296	99.7	75	100	0	25	0.86 (0.58-1.00)
Anti-Mi-2	1+	5	10	1	284	96.3	83.3	96.6	66.7	16.7	0.46 (0.20-0.73)
	2+	4	1	2	293	99.0	66.7	99.6	20	33.3	0.72 (0.42-1.00)
	3+	3	0	3	294	99.0	50	100	0	50	0.66 (0.30-1.00)
Anti-SRP	1+	8	6	0	286	98.0	100	97.9	42.9	0	0.72 (0.50-0.93)
	2+	8	3	0	289	99.0	100	99.0	27.2	0	0.84 (0.66-1.00)
	3+	8	1	0	291	99.7	100	99.7	11.1	0	0.94 (0.82-1.00)

(2) SSc 関連自己抗体陰性患者の臨床的特徴

SSc 関連自己抗体陰性の SSc 患者の臨床的特徴について、抗セントロメア抗体陽性群、抗トポイソメラーゼ 抗体陽性群、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性群と比較した (表 3)。自己抗体陰性群は抗セントロメア抗体陽性群と比較して罹病期間が短く、びまん型の割合とスキンスコアが高く、手指の屈曲拘縮、びまん性色素沈着の割合が高いものの、毛細血管拡張は低頻度であった。また、間質性肺炎を高率に合併し、ステロイド内服、IVCY 治療歴の頻度が高かった。自己抗体陰性群は抗 RNA ポリメラーゼ抗体群と比較すると発症年齢が若く、スキンスコアが低値で腎クリーゼの頻度が低かった。抗トポイソメラーゼ 抗体群との比較では、指尖陥凹性癬痕は低頻度だったものの、びまん型の割合と間質性肺炎の頻度は同程度であり、自己抗体陰性群の臨床的特徴は、抗トポイソメラーゼ 抗体陽性群と類似していた。

表 3. SSc 関連自己抗体陰性群 (Neg)、抗セントロメア抗体陽性群 (ACA)、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性群 (Topo I)、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性群 (RNAP) における臨床所見、検査所見、治療内容の比較

	SSc 関連自己抗体陰性 (n=55)	抗セントロメア抗体 (n=224)	抗トポイソメラーゼ I 抗体 (n=144)	抗 RNA ポリメラーゼ抗体 (n=52)	Over all P value	SSc 関連自己抗体陰性群と他群との比較
発症年齢, 中央値 (範囲) 年	48 (8-76)	51 (11-76)	48 (3-77)	60.5 (20-81)	<.0001	P<0.005, Neg vs RNAP
女性/男性	46/9	211/13	116/28	40/12	<.0001	P<0.05, Neg vs ACA
罹病期間, 中央値 (範囲) 年	2 (0.1-33)	8 (0.1-50)	2 (0.2-30)	1 (0.1-20)	<.0001	P<0.001, Neg vs ACA
病型分類 びまん型/限局型	31/24	23/201	105/39	40/12	<.0001	P<0.0001, Neg vs ACA
スキンスコア, 中央値 (範囲)	10 (0-43)	2 (0-31)	13 (0-42)	17.5 (0-49)	<.0001	P<0.0001, Neg vs ACA; P<0.001, Neg vs RNAP
皮膚症状						
レイノー現象	89%	95%	95%	90%	0.3357	
爪上皮出血点	64%	71%	76%	65%	0.2887	
指尖陥凹性癬痕・潰瘍	15%	21%	48%	13%	<.0001	P<0.0001, Neg vs Topo I
手指の屈曲拘縮	42%	17%	47%	46%	<.0001	P<0.0001, Neg vs ACA
色素沈着	42%	16%	48%	48%	<.0001	P<0.0001, Neg vs ACA
毛細血管拡張	15%	42%	25%	23%	<.0001	P<0.0005, Neg vs ACA
臓器病変						
肺						
間質性肺疾患	55%	7%	78%	44%	<.0001	P<0.0001, Neg vs ACA
VC, % 予測値	100 (37-147)	112 (40-159)	93 (39-139)	107 (61-138)	<.0001	P=0.0001, Neg vs ACA
DLco, % 予測値	63 (32-107)	69 (18-124)	58 (19-113)	65 (27-95)	0.0027	
逆流性食道炎	56%	61%	67%	62%	0.4876	
心病変	13%	8%	15%	10%	0.1318	
収縮期推定右室圧 >50 mmHg	4%	3%	0.7%	0%	0.1850	
強皮症腎クリーゼ	0%	0%	5%	13%	<.0001	P<0.005, Neg vs RNAP
関節病変	16%	18%	28%	23%	0.1351	
筋病変	11%	4%	8%	10%	0.1360	
治療						
経口ステロイド	58%	14%	78%	63%	<.0001	P<0.0001, Neg vs ACA
エンドキサンパルス療法	16%	0.5%	30%	10%	<.0001	P<0.0001, Neg vs ACA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------