

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591320

研究課題名(和文) 多数の分子複合体からセントロメア自己抗原を選択誘導する刺激応答の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the stimulus responses which carry out selection of the centromere autoantigens from macromolecule complexes

研究代表者

室 慶直 (MURO YOSHINA0)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80270990

研究成果の概要(和文)：セントロメア抗体の産生機序、ひいては強皮症の発症病理の解明のため、何故40種類以上の蛋白複合体から、一部の蛋白のみが選択的に自己抗原足りえるのか、差別化の刺激応答を解明することが研究のテーマであった。3種の主要セントロメア自己抗原とは異なり自己抗原としての報告が殆ど見られない9種の蛋白について、多数例の患者自己抗体を用いて反応性を調べたが、陽性例は僅かにとどまることが確認された。今のところその差別化要因は明らかになっていない。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the stimulus responses which carry out selection of centromere autoantigens from macromolecular complexes including more than forty proteins. We examined immunoreactivities of nine different kinds of centromere proteins, which are different from three major centromere autoantigens, against sera from many patients and confirmed that a few of them reacted with a few patients' sera. At present, we have not identified any factors which might differentiate major centromere autoantigens from minor autoantigens that rarely react to autoantibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学、強皮症、抗セントロメア抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠原病は代表的な全身性自己免疫疾患であり、その多くは抗核抗体をはじめとする自己抗体が陽性になる。抗核抗体には、疾患特異性さらには症状特異性を有する物が多いが、基本的には、自己抗体が生体内で抗原に対して障害性に働き、疾患の発症や症状の出現に直接結びつくとは考えられていない。しかし、臨床表現型との極めて強い相関からすれば、抗核抗体の産生機序は疾患発症のかな

り根源的な事象とリンクしているであろうことは容易に想像できる。通常、免疫寛容が成立している自己抗原に対して、その応答がいかんにして破綻するかについては、アポトーシスによる自己抗原の修飾が注目され近年研究が進んでいる。それは局在の変化であったり、蛋白の限定分解であったりするが、強皮症のマーカー抗体のひとつである抗セントロメア抗体の対応抗原に関しては、その報告に乏しい。

(2) アポトーシスによる自己抗原の修飾に関しては、例えば、ケラチノサイトへの紫外線照射が、SS-A 抗原やリポゾーマル P 抗原といった全身性エリテマトーデス関連の細胞内抗原を細胞表面に移動させる、という研究が有名であり、またいくつかの自己抗原はある種の caspase 刺激で限定分解を受け、それが新規エピトープを表出させ免疫応答につながるという説が提唱されている。しかし、それらの研究は多くは自己抗原にスポットを当ててはいるが、対照となる蛋白、つまりは自己抗原として報告のない非自己抗原の動態を詳細には見ていない。

(3) 抗セントロメア抗体の対応抗原の研究はこれまで、不死化された培養細胞を用いたウエスタンブロッティングや大腸菌を用いた発現ライブラリーからの免疫スクリーニングで行われてきたが、はたしてそれらの実験系が生体内の自己免疫応答を正確に描出してきか疑問である。たとえば抗原に用いた細胞が各蛋白の発現量等の問題で解析に適したものであったか、大腸菌の系では発現が困難な蛋白で拾い上げることのできなかったのではないか、など様々な問題が残る。Obuse のグループはプロテオミクスの手法を用いて、ヒト分裂間期培養細胞よりセントロメア複合体を単離し、その構成因子をなんと 40 種類も明らかにすることができた (*Genes Cells*, 9, 105-120, 2004)。そして少なくともその内の 10 個以上が細胞周期を通じてセントロメアに局在する蛋白であることも立証されている。これまでに自己抗体を利用して同定されてきたセントロメア抗原が CENP-A,-B,-C のわずか 3 種であったことからするとこれは驚くべき事であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではセントロメア抗体の産生機序の解明、ひいては強皮症の発症病理の解明を目的として、何故、同じ複合体の中にある蛋白であるのに、その中の一部の蛋白 (CENP-A,B,C) のみが選択的に自己抗原足りえるのか、それを誘導する刺激応答を解明していく。

(2) 新規に同定されたセントロメア蛋白に対する反応性を、多数の自己免疫疾患患者血清や健康人血清について検討し、これまで私たちが詳細に検討してきた自己抗原 CENP-A,-B,-C との反応性の違いを明らかにした上で、さらに、自己抗原であるセントロメア蛋白と非自己抗原であるセントロメア抗原との差別化をもたらす細胞刺激を解明する。

3. 研究の方法

(1) 代表的なセントロメア自己抗原 3 種類 CENP-A, -B, -C に加え、細胞周期を通じてセントロメアに局在することが判明している CENP-H, -I, -K, -L, -M, -N, -O, -T, -U の 9 種類について、それぞれの遺伝子を大腸菌用発現ベクターに組み込み、リコンビナント蛋白を発現、精製し、患者抗セントロメア抗体の反応をウエスタンブロットや ELISA 法により調べる。

(2) これまでに我々が同定した、抗セントロメア抗体が反応する代表的なエピトープ部位である CENP-A の N 末端、CENP-B の N 末端および C 末端、CENP-C の N 末端および C 末端の 5 か所の領域についてリコンビナント蛋白を作成し、ELISA を構築する。

(3) これまでセントロメアの機能構造研究に汎用されている培養細胞である HeLa 細胞に各種セントロメア蛋白遺伝子を導入し、その局在を蛍光顕微鏡で観察するため、pEGFP ベクターに遺伝子をサブクローニングする。リポフェクションにより遺伝子を導入し、蛍光顕微鏡により、観察する。

(4) 各種ストレスによるセントロメア抗原の局在の変化と蛋白限定分解の有無について調べる。各種セントロメア蛋白遺伝子を導入した HeLa 細胞を、血清無添加培地による培養や、紫外線刺激、さらにはツニカマイシン、タブシガルギン、A23187 といった小胞体ストレスを誘導する薬剤を用いての培養条件で、各抗原の局在の変化を観察する。また、タグの抗体を使用したウエスタンブロッティングにより、抗原の限定分解が存在するかについて調べる。

4. 研究成果

(1) 75 例の強皮症、9 例のシェーグレン症候群を含む合計 114 例の間接蛍光抗体法により同定された抗セントロメア抗体陽性血清を用いて、CENP-H, -I, -K, -L, -M, -N, -O, -T, -U の各リコンビナント蛋白に対する反応性を調べたところ、1 例が CENP-O 蛋白に対して強く反応を示した。この症例は経過中に皮膚硬化範囲の狭い limited type から、急激に皮膚硬化範囲が拡大し、diffuse type に移行した強皮症であった。そこで、この抗体反応が新たな臨床的意義を有する可能性を考え、定量的測定法の確立のため、ELISA の構築を試みた。その ELISA とウエスタンブロットの結果から、114 例中上記 1 例を含む 4 例が同抗体陽性であることが判明した。他の陽性 3 例については ELISA で測定した抗 CENP-O 抗体価は低く、臨床診断も limited type の強皮症が 2 例とシェーグレン症候群が 1 例であり、

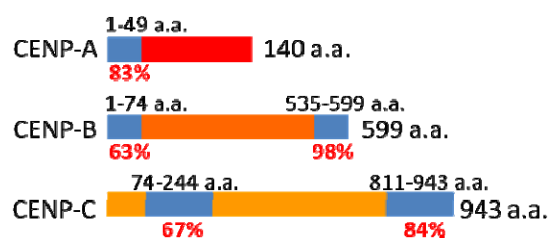
今後の経過観察を要すると思われる。抗体価が群を抜いて高かった前述の1例に関しては、経時的に3点で採取した血清を用い、その変動を調べてみたが、急速に皮膚硬化が進行した前後で大きな差異は存在しなかった。抗セントロメア抗体陽性の limited type の強皮症から急速に硬化範囲が diffuse type へ進行する非常に珍しいタイプのマーカー抗体として抗 CENP-0 抗体がその臨床的意義を有するならば、抗体価は病勢と関連するものではないが、その高い抗体価の存在が将来の病勢拡大の予測マーカーとなりうるか、について今後の症例集積による検討が望まれる。

CENP-0を除く CENP-H, -I, -K, -L, -M, -N, -T, -U に対する抗体反応の存在については、イムノブロットによる検索を行ったところ、1種類の蛋白を除いて今回の検体には全く反応が認められなかった。反応が認められた CENP も1例の患者血清と反応したのみで、CENP-0を含め、これらの CENP については、主要な自己免疫応答の対応抗原である CENP-A, -B, -C とは大きく自己免疫原性が異なることが示された。なお、ある種の自己免疫エピトープは立体構造に依存することから、イムノブロットでは反応がとらえにくい可能性も考えたが、CENP-0については、イムノブロットと ELISA で結果に差異が無かったこと、CENP-B に対する抗体もイムノブロットではわずかに陽性率は下がるものの、やはりイムノブロットと後述の ELISA における反応性は大きく異なるものではなかった。以上より、上記8種類の蛋白に対して ELISA は施行していないものの、CENP-B などの主要抗原に比べると、反応性は極めて低いものと予想している。現在、これらの差異の原因について、各蛋白の構造上から検討中である（論文準備中）。

(2) 5か所の代表的な抗セントロメア抗体のエピトープ領域について ELISA を確立した。CENP-A のN末端、CENP-B のN末端およびC末端、CENP-C のN末端およびC末端の5か所のエピトープに対する陽性率は83例で測定したところ、それぞれ83%、63%、98%、67%、84%であった（図下）。

これまで CENP-B の C 末端や CENP-A の N 末端

セントロメアエピトープのELISAとその陽性率



については ELISA による抗体価の解析研究は報告されているが、その他の主要エピトープに関してはイムノブロットによる定性的な解析しか報告されておらず、今回の研究で5つの主要エピトープに対する抗体価の定量が同時に可能になったことは今後の抗体解析に非常に有用な手段が確立されたと考えられる。各エピトープ領域に対する反応性の差異で、異なる臨床型の説明がどのくらい可能かについて、現在検討中である（論文準備中）。

(3) EGFP タグを付加した CENP-A, -B, -C の遺伝子をヒト fibrosarcoma 由来の HT1080 細胞に導入し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。通常の栄養培地と無血清培地での比較においては特に蛍光像に差異は認められず、またイムノブロットによる解析でも差異は発見できなかった。次に内在性の各種 CENP において HaCaT 細胞を用い、無血清培地、UV 照射 (200, 400, 800J/m²)、薬剤刺激による抗原局在に変化が起きるかを抗体入手が可能であったものについて蛍光抗体法により観察を行ったが、明らかな変化は認められなかった。また、抗原の限定分解の可能性についてイムノブロットにて解析を行ったが、特記すべき変化を認めなかった。

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 35 件)

- ① Muro Y, Sugiura K, Hoshino K, Akiyama M, Tamakoshi K. Epidemiologic study of clinically amyopathic dermatomyositis and anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibodies in central Japan. *Arthritis Res Ther.* 13:R214, 2011. 査読有
- ② Watanabe K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y. IgE and IgG4 autoantibodies against DFS70/LEDGF in atopic dermatitis. *Autoimmunity.* 44:511-9, 2011. 査読有
- ③ Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Ogawa Y, Akiyama M. LEDGF/DFS70 activates the MK2/IL6/STAT3 pathway in HaCaT. *J Dermatol Sci.* 63:203-5, 2011. 査読有
- ④ 室慶直. 皮膚筋炎の生命予後に関連する自己抗体. *リウマチ科* 45:153-157, 2011. 査読無
- ⑤ 室慶直. 膠原病における最近のトピックス. *現代医学* 59:5-12, 2011. 査読無
- ⑥ Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y, Nakashima R, Mimori T. Anti-MDA5 and anti-TIF1- γ antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford).* 49:1726-33, 2010. 査読有

⑦ Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. An evaluation of the efficacy of the toe brachial index measuring vascular involvement in systemic sclerosis and other connective tissue diseases. Clin Exp Rheumatol. 27(Suppl 54):26-31, 2009. 査読有

⑧ Muro Y, Sugiura K, Nitta Y, Mitsuma T, Hoshino K, Usuda T, Hayashi K, Murase Y, Shimizu M, Matsuo H. Scoring of reflux symptoms associated with scleroderma and the usefulness of rabeprazole. Clin Exp Rheumatol. 27(Suppl 54):15-21, 2009. 査読有

⑨ Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. Evaluation of anti-ribosomal P protein immunoassay in Japanese patients with connective tissue diseases: comparison with an indirect immunofluorescence assay. Scand J Rheumatol. 38:460-3, 2009. 査読有

⑩ Saito A, Muro Y, Sugiura K, Ikeno M, Yoda K, Tomita Y. CENP-0, a protein localized at the centromere throughout the cell cycle, is a novel target antigen in systemic sclerosis. J Rheumatol. 36:781-6, 2009. 査読有

[学会発表] (計 73 件)

① 川野充弘、室慶直 (14 番目)、他、抗セントロメア抗体陽性シェーグレン症候群 54 例の検討、第 19 回日本シェーグレン症候群学会、2010 年 9 月 10 日、浦安

② 高間寛之、室慶直、他、抗セントロメア抗体陽性の全身性強皮症に合併したサルコイドーシスの 1 例、第 252 回日本皮膚科学会東海地方会、2010 年 6 月 6 日、名古屋

③ 壽順久、室慶直 (9 番目)、急速に肢端壊疽を起こした抗セントロメア抗体陽性例、第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2010 年 6 月 6 日、京都

④ 室慶直、膠原病で見られる自己抗体、第 109 回日本皮膚科学会総会、2010 年 4 月 17 日、大阪

⑤ 斎藤暁子、室慶直、杉浦一充、他、セントロメア局在蛋白質 CENP-0 に対する自己抗体の解析、第 60 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2009 年 10 月 10 日、京都

⑥ 田中伯予、室慶直、杉浦一充、他、抗セントロメア抗体陽性の原発性シェーグレン症候群との関連を有する抗 HP1 抗体の測定系の確立、第 60 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2009 年 10 月 10 日、京都

⑦ Kawano M, Muro Y (11 番目), et al. A multicentric prospective study to assess clinical and laboratory features in patients with anticentromere antibody

positive Sjogren's syndrome with and without scleroderma, 8th International Symposium on Sjogren's syndrome, 2009.10.3, Brest, France

⑧ 石川明香、室慶直、他、亜急性間質性肺炎を併発した限局型強皮症の 1 例、第 249 回日本皮膚科学会東海地方会、2009 年 9 月 13 日、名古屋

⑨ 室慶直、田中伯予、他、抗セントロメア抗体陽性シェーグレン症候群における抗クロモ抗体の検討、第 19 回日本シェーグレン症候群学会、2009 年 9 月 10 日、浦安

⑩ 室慶直、杉浦一充、他、強皮症患者における酸逆流症状と Rabeprazole の有用性の F スケールによる評価、第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2009 年 6 月 5 日、岐阜

[図書] (計 12 件)

① 斎藤暁子、室慶直、強指症、看護大辞典 第 2 版、和田功、他、編、医学書院、東京、p756、2010

② 斎藤暁子、室慶直、クレスト症候群、看護大辞典 第 2 版、和田功、他、編、医学書院、東京、p839-840、2010

③ 星野慶、室慶直、限局性強皮症、看護大辞典 第 2 版、和田功、他、編、医学書院、東京、p941、2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室 慶直 (MURO YOSHINAO)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 80270990

(2) 研究分担者

杉浦 一充 (SUGIURA KAZUMITSU)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 70335032