

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08343

研究課題名（和文）免疫沈降法－ウェスタンブロッティング法を用いた膠原病関連自己抗体の同定

研究課題名（英文）Identification of autoantibodies by an immunoprecipitation-Western assay 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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、全身性強皮症および筋炎関連自己抗体の同定について免疫沈降法 - ウェスタンブロッティング法の有用性を検討した。免疫沈降法 - ウェスタンブロッティング法は抗NXP-2抗体、抗SAE抗体、抗Ku抗体の同定に有用であった。また、抗TIF1 抗体、抗Mi-2抗体について、既存のELISA検査試薬で判定が困難だった検体について自己抗体が真の陽性かを判断する確認試験として有用だった。免疫沈降法 - ウェスタンブロッティング法で自己抗体を同定することで、臨床的特徴を検討し、合併症の評価、治療法の検討、予後の推測が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ELISA検査試薬が開発されていない全身性強皮症および筋炎関連自己抗体を免疫沈降法 - ウェスタンブロッティング法で検討した。ELISA検査試薬が開発されていない自己抗体は臨床的特徴が明らかにされていないため、簡便に測定できる検査法が開発が求められている。本研究により免疫沈降法 - ウェスタンブロッティング法は自己抗体の同定方法として臨床的に意義のある検査法であることが明らかになった。本研究による成果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）：This study examined the clinical usefulness of Immunoprecipitation (IP) -Western blotting assays for identifying autoantibodies (autoAbs) related to systemic sclerosis and myositis. The IP-Western blotting helped identify anti-NXP-2, anti-SAE, and anti-Ku Abs. It also served as a confirmatory test to determine the presence of anti-TIF1 and anti-Mi-2 Abs in samples, whether it was challenging to discern using a commercially available ELISA assay. Using the IP-Western blotting assays to identify autoAbs allowed for the examination of clinical characteristics, complications, and prognosis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚筋炎 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎/皮膚筋炎 (Polymyositis/Dermatomyositis; DM) および全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc) では抗核抗体が高率に陽性になり、種々の疾患関連自己抗体が検出される。

PM/DM は炎症性筋疾患であり、ヘリオトロープ疹やゴットロン徴候などの特徴的な皮疹を有するものは DM、皮疹を有さないものは PM に分類される。DM の臨床症状は多彩である。筋病変は明瞭な筋症状を有する症例、明らかな筋症状を伴わない症例 (amyopathic DM: ADM)、自覚的な筋症状はないものの採血上の筋原性酵素上昇を認める症例 (hypomyopathic DM: HDM) があり、両者をあわせて clinically amyopathic DM (CADM) と呼ぶ。DM は皮膚症状と筋症状以外に間質性肺疾患と悪性腫瘍を合併することがある。これらの症状はランダムに組み合わせられるわけではなく、悪性腫瘍と間質性肺疾患は同時に合併しない、急速進行型間質性肺疾患を合併する症例は筋症状を伴わないかあっても軽微など、臨床症状からいくつかのサブグループに分類される。また、小児 DM も重要なサブグループである。従来、これらのサブグループ分類は臨床症状に基づいていたが、近年、筋炎特異的自己抗体 (Myositis-specific autoantibody: MSA) に基づく分類が利用されるようになってきている。MSA として、抗 ARS 抗体 (抗 Jo-1 抗体、抗 EJ 抗体、抗 PL-7 抗体、抗 PL-12 抗体、抗 KS 抗体、抗 OJ 抗体、抗 Ha 抗体、抗 Zo 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、抗 HMGR 抗体が同定されている。

SSc は線維化、血管障害、自己免疫を特徴とする疾患である。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、間質性肺疾患、強皮症腎クリーゼ、肺高血圧症などがある。SSc 特異的自己抗体として、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、抗 U3 RNP 抗体、抗 Th/To 抗体、抗 hUBF 抗体、抗 U11/U12 RNP 抗体、抗 eIF2B 抗体が同定されている。また、SSc と筋炎のオーバーラップ症候群に特徴的な自己抗体として、抗 U1 RNP 抗体、抗 Ku 抗体、抗 PM-Scl 抗体、抗 RuvBL1/2 抗体がある。MSA、SSc 特異的自己抗体は特徴的な臨床症状と関連しているため、PM/DM および SSc の診療において自己抗体を同定することは合併症の評価、治療方針の決定、予後の推測に重要である。

MSA および SSc 特異的自己抗体を同定する手法として、HEp-2 細胞を用いた蛍光抗体間接法、二重免疫拡散法、免疫沈降法、酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA 法)、イムノプロット法などがある。このうち、簡便であることから臨床では ELISA 法が広く用いられている。しかし、ELISA 検査試薬が開発されている自己抗体は限られており、MSA では抗 ARS 抗体、抗 Mi-2 抗体、抗 TIF1 抗体、抗 MDA5 抗体のみである。また、SSc において ELISA 検査試薬が開発されている自己抗体は、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、抗 U1 RNP 抗体の 4 つのみである。これらの ELISA 検査試薬が開発されている自己抗体以外の自己抗体については、その同定には免疫沈降法が必要である。また、ELISA 検査試薬が開発されている自己抗体についても、ELISA 検査試薬は疑陽性を示すことがあるため、ELISA index が弱陽性だった場合に真の陽性かを判断することは難しい。このような課題をクリアする検査法として免疫沈降法があるが、免疫沈降法は手技が煩雑でアイソトープを必要とすることから一般的な検査法ではない。したがって、より簡便に自己抗体を同定する測定法の開発が求められている。免疫沈降法-ウエスタンプロット法はアイソトープを用いず、抗 TIF1 抗体、抗 Mi-2 抗体、抗 NXP-2 抗体、抗 Ku 抗体、抗 SAE 抗体についてそれぞれのポリクローナル抗体を二次抗体として用いる。これらの 5 つのポリクローナル抗体を混合してプロットングす

ることで、5つの自己抗体を抗原特異的に同時に検討できる。また、免疫沈降法-ウエスタンブロット法は特に140 kDa タンパクを沈降する自己抗体(抗MDA5抗体、抗NXP-2抗体、抗TIF1抗体)の鑑別に有用である。さらに、免疫沈降法-ウエスタンブロット法は小児DMの30%を占める抗NXP-2抗体を同定できることが特徴である。

2. 研究の目的

本研究では、MSAである抗TIF1抗体、抗Mi-2抗体、抗NXP-2抗体、抗SAE抗体、SSc/筋炎オーバーラップ症候群に関連する抗Ku抗体について、免疫沈降法-ウエスタンブロット法同定することを目的とした。また、同定した自己抗体について臨床的特徴を検討した。特に、ELISA法が開発されていないMSAである抗NXP-2抗体を中心に検討した。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法-ウエスタンブロット法による自己抗体の同定

ヒト白血病由来K562細胞抽出物を抗原として患者血清と反応させ免疫沈降を行った(免疫沈降法)。沈降物をゲルで泳動しプロットング膜に転写し、市販のポリクローナル抗体(抗TIF1抗体、抗Mi-2抗体、抗NXP-2抗体、抗Ku抗体、抗SAE抗体)混和溶液でプロットングし可視化した。免疫沈降法-ウエスタンブロット法では患者血清が沈降するタンパク(標的抗原)を抗原特異的に検出することができる。

(2) 臨床的特徴についての検討

自己抗体が同定された症例について自己抗体ごとにサブグループに分類し、臨床症状、検査所見、治療経過などについて検討した。特に、抗NXP-2抗体の臨床的特徴を明らかにすることに着目した。

4. 研究成果

(1) 免疫沈降法-ウエスタンブロット法による自己抗体の同定

・抗NXP-2抗体、抗SAE抗体、抗Ku抗体の同定

臨床的に筋炎が疑われ、ELISA検査試薬で抗ARS抗体、抗MDA5抗体、抗TIF1抗体、抗Mi-2抗体が弱陽性～陰性だった93例について免疫沈降法-ウエスタンブロット法で検討したところ、抗NXP-2抗体が27例、抗TIF1抗体が16例、抗SAE抗体が4例、抗Ku抗体が2例検出された。免疫沈降法-ウエスタンブロット法による抗NXP-2抗体、抗SAE抗体、抗Ku抗体の泳動結果を図1に示す。特に抗NXP-2抗体について、免疫沈降法で140 kDa タンパクを沈降し、免疫沈降法では抗MDA5抗体、抗TIF1抗体との鑑別が困難だった7例について免疫沈降法-ウエスタンブロット法で検討したところ、7例はいずれも抗NXP-2抗体が陽性だった。したがって、免疫沈降法-ウエスタンブロット法は既存のELISA検査試薬で弱陽性～陰性を示す症例およびELISA検査試薬が利用できない筋炎およびSSc/筋炎オーバーラップ症候群患者、おいて、抗NXP-2抗体、抗TIF1抗体、抗SAE抗体、抗Ku抗体を同定する有用な検査法と考えられた。

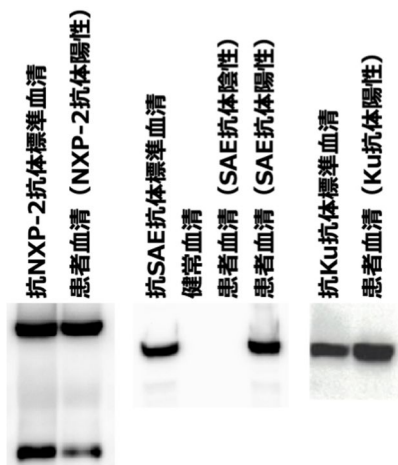


図1. 抗NXP-2抗体、抗SAE抗体、抗Ku抗体
の同定

・ ELISA 検査試薬の性能評価

ELISA 検査試薬は簡便で感度、特異度とも高く、有用な検査法である。しかし、疑陽性を示すことがあることも知られており、特に検査試薬のカットオフ値前後あるいは弱陽性の検体について真の陽性かを判断することは臨床的に重要である。抗 TIF1 抗体について ELISA 検査試薬の結果から真の陽性かどうかについて検討した 8 例のうち、免疫沈降法-ウエスタンブロット法では 7 例が陽性で 1 例が陰性だった (図 2)。TIF1 と Mi-2 はどちらも転写に参与するタンパク質で相同性の高い領域があるため、抗体の交差反応が生じることが知られている。抗 Mi-2 抗体陽性の場合、抗 TIF-1 抗体の ELISA index がカットオフ値前後となることが知られている。この場合、真の陽性は抗 Mi-2 抗体であり、抗 TIF1 抗体は陰性である。実際、過去に免疫沈降法-ウエスタンブロット法で検討した症例のうち、ELISA 検査試薬で抗 Mi-2 抗体陽性、抗 TIF1 抗体弱陽性だった検体は免疫沈降法-ウエスタンブロット法で抗 Mi-2 抗体陽性、抗 TIF-1 抗体陰性だった。今回、抗 Mi-2 抗体陽性、抗 TIF1 抗体弱陽性の 1 検体、抗 Mi-2 抗体陽性、抗 TIF1 抗体強陽性の 1 検体について免疫沈降法-ウエスタンブロット法で検討したところ、どちらも抗 TIF-1 抗体が陽性であり、これらの 2 症例は抗 Mi-2 抗体と抗 TIF1 抗体が共存した非常に稀な症例と考えられた (図 3)。以上より、免疫沈降法-ウエスタンブロット法は ELISA 検査試薬で疑陽性を示す症例や自己抗体が真の陽性かを確認するための検査法として有用であると考えられた。

・他の検査試薬との ELISA 検査試薬の性能評価

ELISA 検査試薬以外に自己抗体を同定する代表的検査試薬として Euroline®と A-cube®がある。これらの検査試薬は簡便に測定できるが、感度、特異度については十分に検討されていない。A-cube®で抗 NXP-2 抗体が陽性だった 2 例、抗 TIF1 抗体が陽性だった 1 例について免疫沈降法-ウエスタンブロット法で検討したところ、抗 NXP-2 抗体の 2 例、抗 TIF1 抗体の 1 例とも陽性だった。一方、Euroline®で抗 Ku 抗体が陽性だった 3 例について免疫沈降法-ウエスタンブロット法で検討したところ、1 例が陽性、1 例が弱陽性、1 例が陰性だった (図 4)。

・免疫沈降法-ウエスタンブロット法による経時的な自己抗体の評価

免疫沈降法-ウエスタンブロット法は定性的検査であり定量性はないが、臨床的に寛解した症例において自己抗体が陰性化したかを確認できれば免疫抑制療法を中止できるかの参考所見になる。抗 NXP-2 抗体陽性の小児 DM 症例について発症 9 年後に抗 NXP-2 抗体が陰性化したかどうか検

討したところ、発症9年後でも抗NXP-2抗体が検出され、治療を継続する根拠の1つになった(図5)。したがって、免疫沈降法-ウエスタンブロット法は、ELISA検査試薬が開発されていない自己抗体について、抗体の存在を簡便に経時的に測定することができる有用な検査法と考えられた。

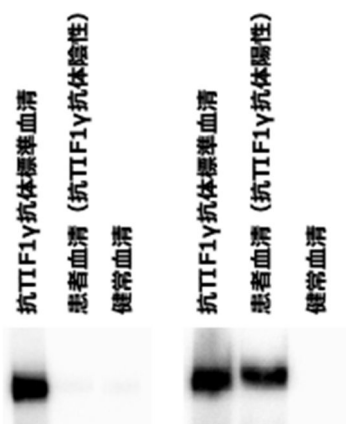


図2. ELISA検査試薬で抗TIF1γ抗体弱陽性検体の確認試験。左パネルの検体は抗TIF1γ抗体陰性、右パネルの検体は抗TIF1γ抗体陽性だった。

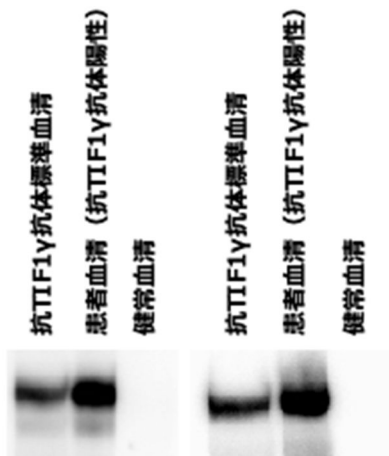


図3. ELISA検査試薬で抗TIF1γ抗体陽性抗Mi-2抗体陽性検体の確認試験。どちらの症例も抗TIF1γ抗体陽性だった。



図4. Euoline®で抗Ku抗体陽性検体の確認試験。1例が陽性、1例が弱陽性、1例が陰性だった。



図5 抗NXP-2抗体陽性例における長期経過後の検討

(2) 臨床的特徴についての検討

免疫沈降法-ウエスタンブロット法で抗NXP-2抗体と同定した症例のうち、約20%はDMに関連した皮膚症状を認めなかった。これらの症例は典型的な筋症状を有しており、筋症状の重症度は皮疹を認めた症例と類似していた。近年、抗NXP-2抗体陽性例で皮疹を認めない症例が複数報告されている。これらの症例の筋病理組織では、皮膚筋炎の筋病変に特徴的とされる myxovirus resistance protein A (MxA) が発現している。このように筋病理ではDMに典型的な組織像を呈するにも関わらずDMに関連した皮疹を認めない症例を“皮疹を伴わないDM”として“Dermatomyositis sine dermatitis”と呼称することが提案されている。今回の検討でも抗NXP-2抗体陽性例の一部は皮疹を認めなかったことから、抗NXP-2抗体はDermatomyositis sine dermatitisの代表的な自己抗体である可能性が示唆された。

抗SAE抗体についてはこれまでの報告と同様、顕著な皮疹を認めた症例が多かった。悪性腫瘍、間質性肺疾患を合併した症例もあったが、対象となる症例が4例と少なかったため、抗SAE抗体の臨床的特徴を検討するにはさらに症例を蓄積する必要があると考えられた。

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