

令和 7 年 6 月 16 日現在

機関番号：32666  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2024  
課題番号：21K09478  
研究課題名(和文)原因不明不育症における“ネオセルフ”抗体産生機構による病原性自己抗体 - 抗原の探索  
  
研究課題名(英文) Exploratory Identification of Pathogenic Neo-Self Antigens and Autoantibodies in Unexplained Recurrent Miscarriage.  
  
研究代表者  
片山 映 (KATAYAMA, AKIRA)  
  
日本医科大学・医学部・助教  
  
研究者番号：10333113  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の症状を示す一部の不育症患者では、非免疫細胞由来のネオ・セルフ抗体が病因となっている。そこで、原因不明の不育症患者における、未知のネオ・セルフ由来の自己抗原の探索を行った。  
非免疫細胞ヒト臍帯静脈内皮細胞での検討で、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスIIで提示される、ネオ・セルフ抗原タンパク質の同定の条件を確立した。  
臨床検体への適用として、iPS細胞由来と流産患者由来の血管内皮細胞での検討では、十分なMHCクラス II発現が得られず、ネオ・セルフ抗原タンパク質の同定に至らなかった。この原因とされる、細胞の分離及び、分化の純度と成熟性の検討条件を絞り込むに至っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
自己免疫疾患の病因となるネオ・セルフ抗原タンパク質は、非免疫細胞で提示されて病因となる自己抗体が産生される。非免疫細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞で、ネオ・セルフ抗原タンパク質を同定する条件を確立したことで、未知の自己抗原の探索を可能とした。臨床検体への適応には至らなかったが、iPS細胞や組織由来細胞の処理条件等、今後の検討に必要な情報を得た。

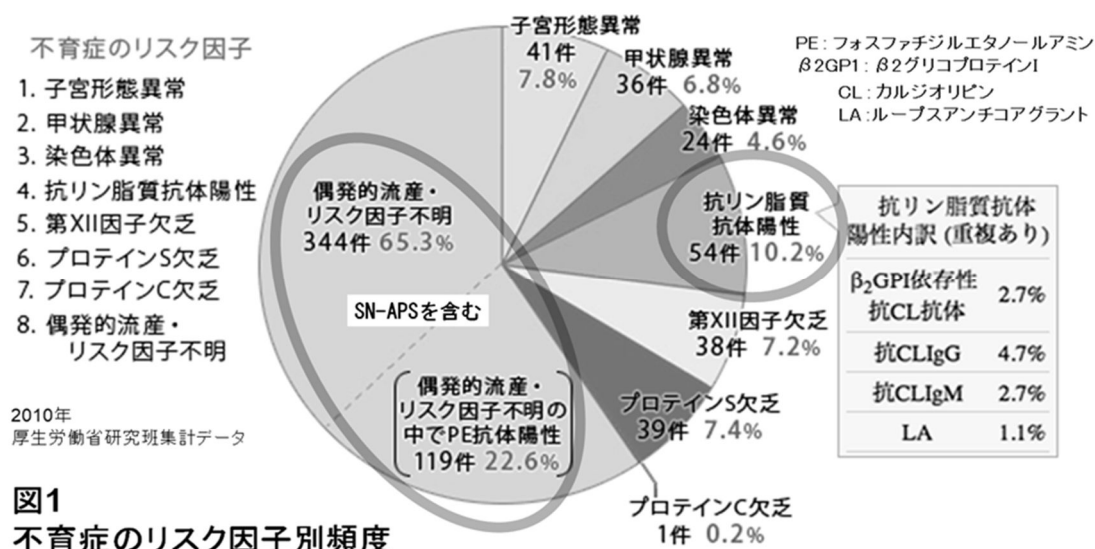
研究成果の概要(英文)：In some patients with recurrent miscarriage who present with autoimmune-like symptoms, pathogenic neo-self antibodies derived from non-immune cells may be involved in the etiology. Therefore, we explored unknown neo-self-derived autoantigens in patients with unexplained recurrent miscarriage.  
Using non-immune human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), we established conditions for the identification of neo-self antigenic proteins presented via major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. However, when applying this approach to clinical samples - specifically, vascular endothelial cells derived from iPSCs and miscarriage patients - sufficient MHC class II expression was not achieved, and identification of neo-self antigenic proteins was not possible. We are currently narrowing down the conditions related to cell isolation, as well as the purity and maturity of differentiation, which are likely responsible for the insufficient MHC class II expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：ネオ・セルフ 自己免疫疾患 不育症 SN-APS MHCクラス II 抗リン脂質抗体症候群 iPS細胞 血管内皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠は成立するものの流産・死産を反復する不育症の克服は、少子化が進行する本邦における重要な課題であった。不育症の半数以上は、スクリーニング検査を実施してもリスク因子が同定されず、エビデンスのある治療法は限定的である。その中で、特に抗リン脂質抗体症候群(APS)の臨床基準を満たすが、血清学的異常を認めない血清学的陰性リン脂質抗体症候群(Seronegative-APS:SN-APS)においては、未知の病原性自己抗体・抗原の存在が示唆されるが詳細は明らかではなかった。また、不育症患者の約 10%に、血栓症や原因不明の流産・胎児死亡、妊娠高血圧腎症等を特徴とする自己免疫疾患である APS が認められていた。また、不育症患者全体の過半数を占めるリスク因子不明症例の内、約 1/3 で抗フォスファチジルエタノールアミン抗体(抗 PE 抗体)といった APS の診断基準に含まれない自己抗体が検出されていた(図 1)。さらに、このリスク因子不明症例の中には、SN-APS が含まれていた。この SN-APS の病態には、未知の自己抗体の関与が想定されていたが、そのメカニズムは不明で、病態の理解や治療法の確立の為、未知の自己抗体・抗原の解明が望まれていた。



### 2. 研究の目的

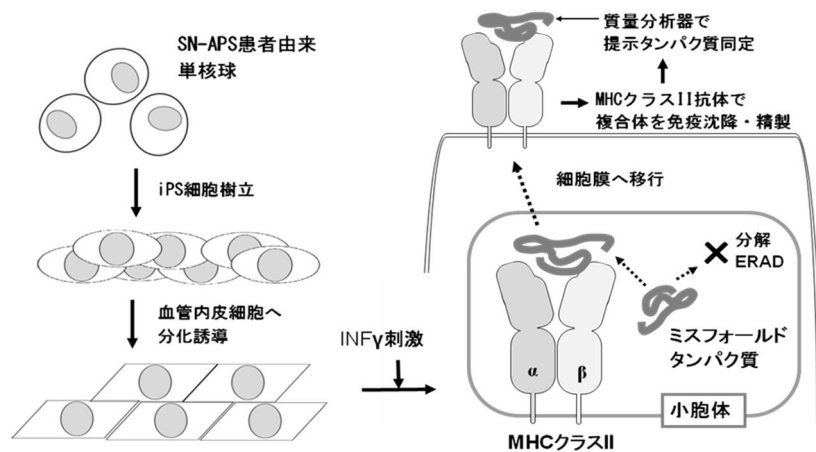
感染に対する古典的な適応免疫の開始メカニズムでは、抗原提示細胞が病原体由来の抗原をヘルパーT細胞(Th細胞)に提示して免疫系を賦活化する。近年、血管内皮細胞等の非免疫細胞が炎症刺激を受けると、MHCクラス 分子の発現が誘導され、本来は分解されるはずの自己由来のミスフォールドタンパク質が、“ネオ・セルフ”として抗原提示されることが明らかになった。さらにネオ・セルフ抗体の病原性により自己寛容性が障害され、自己免疫疾患の発症要因となることが示された。こうした中で、APS病態に主体的に関与する既知の自己抗体(抗 2-glycoprotein 抗体)が、ネオ・セルフ抗体であることが報告された<sup>1)</sup>。ネオ・セルフ抗体は、非免疫細胞により抗原提示されて産生されるため、免疫系の異常が明らかではないSN-APSの病態にも合致する。すなわち、SN-APS患者における未知の病原性自己抗体もネオ・セルフ抗体である可能性が高い。そこで本研究では、SN-APS患者から樹立したiPS細胞を用いて、ネオ・セルフ抗体産生機構に基づいて提示される抗原タンパク質の特定と、SN-APS患者に特異的な自己抗体を検出する。また、iPS細胞由来血管内皮細胞や非免疫細胞の初代培養細胞を用いたネオ・セルフ抗体・抗原の解析法の確立は、不育症以外の自己免疫疾患においても、未知の自己抗体の標的タンパク質の探索に適用できる。その為、多様な自己免疫疾患の病態機序の解明に適用可能な研究知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

不育症患者のうち、約半数は諸検査を行っても原因が特定されない原因不明不育症である。その中で、APSの臨床基準を厳格に満たすSN-APS患者を抽出し、さらに均衡型相互転座や中隔子宮など、血清学的因子以外の原因による不育症例を対照として、インフォームドコンセントのもと採取した末梢血単核球よりiPS細胞を樹立する。さらにiPS細胞から血管内皮細胞への分化誘導後、炎症刺激でMHCクラス 複合体の発現を誘導し、ネオ・セルフ抗原の同定を行う(図2)。

ネオ・セルフ抗原-抗体複合体の同定の条件検討として、非免疫細胞のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)で、炎症性サイトカイン:INFによる刺激で発現させたMHCクラスII分子とネオ・セルフ抗体標的候補タンパク質の複合体を、抗ヒトHLA-DRモノクローナル抗体で免疫沈降・精製し、含まれる抗原候補タンパク質を質量分析装置により同定する条件を確立する。続いて、iPS細胞由来の血管内皮細胞と、より本質的な性質を保つ流産患者検体由来血管内皮細胞について、分化条件の検討及び組織からの単離・培養条件を確立し、MHCクラスII分子複合体の発現と抗原同定の条件を検討する。同定され標的候補タンパク質について、

SN-APS患者及び、これまで採取している200症例以上の不育症患者血清について、候補タンパク質のリコンビナントタンパク質・細胞抽出成分によるウエスタンブロット、ELISA法及び、培養細胞で発現したMHCクラスII分子複合体での反応性を確認し、SN-APS特異的自己抗体の検出から抗原タンパク質を特定する。



#### 4. 研究成果

図2 ネオ・セルフ抗体産生機構に基づく標的抗原タンパク質同定

HUVECを用いた解析では、免疫沈降と質量分析器による解析で、ネオ・セルフ抗原タンパク質を検出する条件を確立した。iPS細胞での検討については、分化抗原では血管内皮細胞への分化が確認されたが、MHCクラスIIの発現効率が低く、分化過程初期における純度の改善が必要とされ、今後の患者由来iPS細胞の樹立と分化条件について検討の為の知見を得ることが出来た。流産患者検体由来血管内皮細胞での検討は、組織からの血管内皮細胞の単離後の増殖条件の確立に至らず、抗原の同定に必要なとされる細胞数を得られなかった。この為、遺伝子導入による不死化や、転写制御によるMHCクラスII発現誘導の条件検討に至った。

<引用文献> <sup>1)</sup> Kenji Tanimura, et al. 2-Glycoprotein I/HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2012;119(3): 884-893.

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
研究分担者	桑原 慶充  (Kuwabara Yoshimitsu)  (40373013)	日本医科大学・医学部・准教授   (32666)	
研究分担者	杉田 洋佑  (Sugita Yousuke)  (60774354)	日本医科大学・医学部・助教   (32666)	

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