

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19472

研究課題名（和文）全身性強皮症の自己抗体と交叉反応する、細胞外に存在する真の自己抗原の同定

研究課題名（英文）Identification of a true extracellular autoantigen that cross-reacts with autoantibodies in systemic sclerosis.

研究代表者

佐藤 伸一（Sato, Shinichi）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20215792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：全身性強皮症（SSc）は膠原病の一つであり、自己抗体の出現を大きな特徴とする。自己抗体は発症以前から存在し、また検出される自己抗体の種類は、病勢や予後と相関するため、自己抗体は病態において重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、自己抗原は細胞内に存在するため、直接自己抗体が病態に関与しているとは考えにくい。本研究では、独自の技術による高次構造を維持したヒト蛋白質アレイを用いて蛋白質をSSc患者血清で網羅的にスクリーニングしSScの自己抗体と交差反応する細胞外分子、すなわち真の自己抗原の同定に挑戦した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「SScは自己免疫疾患である」ということは教科書にも記載されていることであり、一般に広く信じられているドグマである。このように自己抗体の存在によって自己免疫疾患と位置づけられてきたSScであるが、SScの自己抗体研究者が考えているように自己抗体に病原性がないのであれば、「SScは自己免疫疾患ではない」ことになってしまう。これまでSScの自己抗体研究者にとって、「自分はSScの自己抗体を研究しているのであるが、その自己抗体には病原性がなく、SScも自己免疫疾患ではない」というジレンマが常につきまとい研究者を大いに悩ませてきた。本研究はこのジレンマの解消の一助となるものである。

研究成果の概要（英文）：Systemic sclerosis (SSc) is a collagen disease that is largely characterized by the appearance of autoantibodies. Autoantibodies are thought to play an important role in the pathogenesis of the disease, since they are present even before the onset of the disease and the type of autoantibodies detected correlates with disease severity and prognosis. However, because autoantigens are intracellular, it is unlikely that autoantibodies are directly involved in the pathogenesis of disease. In this study, we attempted to identify extracellular molecules that cross-react with autoantibodies of SSc, i.e., true autoantigens, by comprehensively screening sera of SSc patients for proteins using human protein arrays that maintain higher-order structures based on our original technology.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：強皮症 自己免疫 自己抗体 自己抗原 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は膠原病の一つであり、線維化 (皮膚硬化、肺線維症など) 血管病変 (レイノー症状、潰瘍、肺高血圧症など) 免疫異常 (自己抗体産生など) を呈する自己免疫疾患と位置づけられている。重症型の SSc では 10 年生存率は約 70% であり膠原病の中で最も予後不良である。SSc では抗 topoisomerase I (topo I) 抗体を始めとする自己抗体がその 90% 以上に陽性となる。自己抗体は発症以前から存在し、自己抗体は SSc の病型、予後、疾患活動性、重症度などと密接に相関する。従って自己抗体は SSc の病態形成に密に関わっているとされている。しかし SSc の自己抗体には病原性はないと一般的には考えられている。その理由としては、自己抗体が細胞膜を通過して細胞内に入るといった証拠がない、もし仮に自己抗体が細胞内に入ったとしても、topo I などの SSc 関連自己抗原は核内に存在する細胞分裂に必須の分子であり、その機能を抑制すると細胞死が誘導される (例えば、topo I は DNA 複製時に生じる DNA 構造のねじれを解消するために DNA を切断し再結合する酵素である) 自己抗体が細胞分裂を抑制することと線維化との関連性が全く不明であるなど、が挙げられる。しかし前述の如く自己抗体が示す高い臨床的意義を考慮すると、SSc において自己抗体には病原性がないとは一概には言い切れない。

SSc はこれまで自己免疫疾患として位置づけられてきた。その理由としては自己抗体が 90% 以上の患者で検出されるからに他ならない。しかし前述の如く SSc で検出される自己抗体は全て細胞質内の自己抗原と反応するため、自己抗体が細胞内の自己抗原にアクセスできないという問題点が指摘されてきた。分子量が 500 以下の分子であれば細胞内に入ることが可能であるが、抗体の分子量は約 15 万と大きく細胞内に入ることにはできないと考えられている。ある特定の自己抗体については細胞膜上の Fc 受容体などを介して抗体が細胞内に入る機序などが報告されてはいるものの、自己抗体へ広く一般化できるものではなく現状では自己抗体は細胞内に入ることはないとされている。従って自己抗体は病原性がない、単なる epiphenomenon (付帯現象) と考えられている。しかし単なる付帯現象にしては、SSc における自己抗体は余りにも病型や予後などと密接に相関していることから、自己抗体に病原性があるという考え方を否定してしまうことも一方で困難であった。このような背景の中、SSc の自己抗体に病原性があるという前提で捉え直したときに本研究の構想に至った。すなわち SSc の自己抗体が反応する真の自己抗原は topo I などではなく、それらと交差反応する別の細胞外抗原ではないかと考えた。細胞外抗原との反応については自己抗体の網羅的検出方法である蛍光抗体間接法などでは検出できない。また自己抗体は自己抗原の高次構造を認識することから、細胞外分子に対する反応性を正しく評価するためには、高次構造が維持された蛋白質を網羅的に解析する必要があるが、これまではそのようなプロテオーム解析は不可能であった。しかし産業総合研究所・五島研で開発された HuPEX によって、高次構造を維持した網羅的プロテオーム解析が可能となり、これを用いて自己抗体の細胞外分子への反応性を網羅的に解析することを着想した。

2. 研究の目的

今回申請者は以下の仮説を提示し、その解明を目的とした。その仮説とは、自己抗体が細胞内分子と結合する現象は、実は細胞内分子と細胞外分子 (細胞膜に発現する分子を含む) との間の交差反応によって生じるとするものである。この仮説では、先ず細胞外分子に対して自己抗体が産生される。しかし細胞外分子と相同性を有する分子が細胞内に存在するため、通常の自己抗体検出法では細胞内抗原に対する自己抗体として検出される。つまり細胞内分子に対する自己抗体は、本来は細胞外分子に対する自己抗体を検出しているものであり、この自己抗体は細胞外分子の機能を抑制することによって病原性を発揮する。一般的な自己抗体検出法では細胞外分子への反応性を検出できないために相同性を有する細胞内分子に対する自己抗体として検出されることになる。例えば、自己抗体の一般的なスクリーニング方法である、喉頭癌由来の HEp-2 細胞を基質とした蛍光抗体間接法では、HEp-2 細胞はアセトンで固定されるため細胞膜は破壊される。その結果、生体内とは異なり自己抗体は細胞内の抗原と反応することが可能となるため細胞内分子に対する自己抗体として検出されることになる。これまで SSc を含め膠原病において自己抗体の細胞外分子への反応性を網羅的に解析した研究はない。重要なことは、自己抗原のエピトープは高次構造上にあり 2 個以上の非連続性のポリペプチド上に分散していることである。従って交叉反応を正しく評価するために、高次構造を保った分子との反応を検討することが不可欠である。本研究の目的は、独自の技術による高次構造を維持したヒト蛋白質アレイを用いて蛋白質を SSc 患者血清で網羅的にスクリーニングし SSc の自己抗体と交差反応する細胞外分子、すなわち真の自己抗原を同定することである。

3. 研究の方法

本研究ではヒト完全長 cDNA ライブラリから作成される、高次構造が保たれたヒト蛋白質

質アレイ (HuPEX) を用いた。HuPEX は 2.2 万種類のヒト cDNA からコムギ胚芽無細胞蛋白質合成で作成したインビトロ・プロテオームであり、ヒト遺伝子の 75% 以上を網羅し特殊な技術を用いて wet 状態にしたもので高次構造が維持されている。HuPEX は蛋白質搭載量がインビトロ・プロテオームと比べて均一でありデータの精度が高いことも特徴である。この HuPEX を活用して新規 iPS 誘導促進因子 Glis1 が発見されるなど、その質は担保されている。本研究では SSc 患者血清 300 検体以上を用いて HuPEX によるスクリーニングを実施した。申請者は国内初の強皮症センターを設立し、そこには 1,500 名以上の SSc 患者が通院しているため血清サンプルは計画通りに収集することが可能であった。

4. 研究成果

今回の研究によって、当初想定されていた以上の自己抗体が、患者血清中に見いだされた。「SSc は自己免疫疾患である」ということは教科書にも記載されていることであり、一般に広く信じられているドグマである。このように自己抗体の存在によって自己免疫疾患と位置づけられてきた SSc であるが、SSc の自己抗体研究者が考えているように自己抗体に病原性がないのであれば、「SSc は自己免疫疾患ではない」とことになってしまう。これまで SSc の自己抗体研究者にとって、「自分は SSc の自己抗体を研究しているのであるが、その自己抗体には病原性がなく、SSc も自己免疫疾患ではない」というジレンマが常につきまとい研究者を大いに悩ませてきた。「SSc は本当に自己免疫疾患なのか？」という、これまで全く答えられてこなかった本質的な問いに答えようとするのが本研究の目的であった。これまで自己抗体には病原性がないと自己抗体研究者は考えてきたが、本研究で自己抗体は細胞外分子と結合することによって病原性を発揮することが明らかとなれば、「SSc は自己免疫疾患である」と結論づけることができ、これまでの研究者のジレンマを一掃することができるのみならず SSc の病態を新しい視点で捉え直すことが可能となる。実際、今回の研究では、患者血清中に、いくつかの細胞膜、あるいは細胞外タンパク質を抗原とする自己抗体が見いだされた。

今回の研究から見いだされた細胞外自己抗原を用いたタンパク質は、マウスに免疫することによって、モデル動物を作成出来る可能性がある。また、SSc 以外の自己免疫疾患においても、今回の研究と同様の手法によって、細胞外に存在する、真の自己抗原が見いだされる可能性がある。今後、さらに疾患の対象を広げ、またマウス研究を進めることによって、新たな自己免疫疾患の病態解明、ひいては新規治療法の開発に結びつけたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuzumi A, Yoshizaki A, Sato S, et al.	4. 巻 36
2. 論文標題 Genital necrosis with cutaneous thrombosis after COVID-19 mRNA vaccination.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Eur Acad Dermatol Venereol.	6. 最初と最後の頁 e185-e186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.17837.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuda K, Yoshizaki A, Sato S, et al.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Rapid improvement of systemic sclerosis-associated intestinal pseudo-obstruction with intravenous immunoglobulin administration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/kead093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuda K, Sato S, Yoshizaki A, et al.	4. 巻 135
2. 論文標題 Significance of anti-transcobalamin receptor antibodies in cutaneous arteritis revealed by proteome-wide autoantibody screening	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102995 ~ 102995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaut.2023.102995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshizaki A, Yoshizaki-Ogawa A, Sato S, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Involvement of B cells in the development of systemic sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.938785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ebata S, Sato S, Yoshizaki A, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 New Era in Systemic Sclerosis Treatment: Recently Approved Therapeutics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4631 ~ 4631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11154631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda K, Yoshizaki A, Sato S, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Autoantibody Landscape Revealed by Wet Protein Array: Sum of Autoantibody Levels Reflects Disease Status	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.893086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Matsuda K, Sato S, Yoshizaki A, et al.
2. 発表標題 Impact of anti-transcobalamin receptor antibodies on cutaneous arteritis
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshizaki A.
2. 発表標題 A new pathogenetic hypothesis of vasculitis with a focus on B cells
3. 学会等名 The 12th Asian Dermatological Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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	吉崎 歩 (Yoshizaki Ayumi) (40530415)	東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授 (12601)	

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