

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590681

研究課題名(和文)自己抗体の発現パターンによる骨髄不全症候群の病型分類

研究課題名(英文)Identification of autoantibodies in acquired aplastic anemia

研究代表者

栗林 景晶(Kuribayashi, Kageaki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50381257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血(Aplastic anemia;以下AA)は、汎血球減少症を呈する症候群である。本研究では、AA患者血清中に特異的に発現する8種類の自己抗体を同定した。これらの自己抗体のうち3つは、健常人と比べAA患者で上昇していた。また、免疫抑制療法不応例よりも反応例で自己抗体価は高く、また、それらが高いほど免疫抑制療法に対する奏効率も高かった。これらの自己抗体は、汎血球減少症の中から免疫異常を有する患者を抽出し、免疫抑制療法の効果を予測するマーカーとなると考えられた

研究成果の概要(英文)：Acquired aplastic anemia (aAA) is a syndrome characterized by peripheral cytopenia with hypoplastic bone marrow. In this study, 8 autoantibodies expressed in aAA were identified. Among these autoantibodies, 3 antibodies were higher in patients with aAA than in normal volunteers. Moreover, responders to immunosuppressive therapy expressed at least one IgG-type autoantibody, whereas all non-responders did not express any IgG-type autoantibody. Furthermore, higher titers of IgG-type autoantibodies were found to be associated with better response rates to immunosuppressive therapy. These autoantibodies may be utilized to abstract patients associated with immune abnormality from bone marrow failure syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：血液学 骨髄不全症候群 再生不良性貧血 自己免疫疾患 自己抗体 血清マーカー

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血 (Aplastic Anemia; 以下 AA) は、汎血球減少症を呈する症候群である。AA と他の汎血球減少症との鑑別は、血球形態、遺伝子異常や芽球の有無により行われているが、困難なことが少なくない。

一方、AA の約 70% に対し、シクロスポリンや抗胸腺細胞グロブリンによる免疫抑制療法が著効する。すなわち、AA の病態形成には、免疫学的異常が関与している。

2. 研究の目的

本研究では、AA で自己抗体が認識する分子と発現細胞を同定し、骨髄不全症候群の免疫異常の標的を明らかにする。また、これら自己抗体の診断および病型分類における発現パターン解析の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 対象

28 名の AA 患者、22 名の骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome; MDS) 患者、20 名の慢性関節リウマチ患者と 21 名の健常者から、文書で同意を得た後に血清を採取した。免疫抑制療法に対する反応性は、過去の報告に従い判定した。

(2) 細胞株

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 と不死化したヒトストローマ細胞株 hTS-5 を用いた。

(3) フローサイトメトリー (FACS) による自己抗体の検出

K562 細胞および hTS-5 細胞を固定し、患者血清と反応させた。洗浄後、FITC 複合体化抗ヒト IgG とインキュベートし、EPICS XL-MCL cytometer を用い 1 サンプルあたり 20,000 個の細胞を解析した。蛍光強度のカットオフ値は、20 例の健常者の平均値+2 標準偏差を用いた。

(4) cDNA ライブラリーの構築

K562 細胞から総 RNA を抽出し、SMART cDNA Library Construction Kit を用い、cDNA ライブラリーを構築した。オリジナルライブラリーのサイズは、 1.2×10^7 pfu であった。

(5) SEREX 法による、自己抗原の血清学的スクリーニング

cDNA を形質導入した大腸菌を、LB アガープレートあたり約 3,000 pfu プレーティングした。プラークを、PROTRAN nitrocellulose membrane に転写後、10 mM IPTG で cDNA の蛋白発現を誘導した。転写膜をブロッキング

後、FACS 解析で陽性となった 10 名の患者から得たプール血清と反応させた。洗浄後、HRP 複合体化抗ヒト抗体で、誘導蛋白質と特異的に反応する自己抗体を検出した。洗浄後、TMB Stabilized Substrate for HRP で発色し、陽性ファージを同定した。陽性ファージを形質導入した BM25.1 E. Coli からプラスミドを調製し、遺伝子配列を決定後、ヌクレオチド BLAST データベースを参照し抗原遺伝子を同定した。

(6) SEREX 法によって同定された抗原の発現および精製

SEREX 法によって同定された抗原の cDNA を PCR で増幅し、pGEX-6P-1 の BamHI-XhoI 部位へクローニング後、GST 融合蛋白質として発現させた。

(7) 骨髄からの CD34 陽性細胞の精製と RT-PCR による SEREX 抗原の検出

健常者から骨髄を採取し、単核細胞を Ficoll-Paque で精製した。単核細胞を FITC 複合体化抗ヒト CD34 抗体と反応させ、BD FACS AriaSE を用い CD34 陽性細胞と CD34 陰性細胞に分画後、回収した。これらの分画からそれぞれ総 RNA を抽出し cDNA を構築した。

(8) 患者血清中自己抗体の検出

SEREX 抗原を 96 ウエルプレートに固相化した。このプレートを、ブロッキング後、洗浄し、患者血清を室温で 30 分間反応させた。洗浄後、HRP 複合体化抗ヒト IgG 抗体で SEREX 抗原と反応する自己抗体を検出した。抗 GST 抗体を用い参照値を作成した。20 例の健常者の平均値+2 標準偏差をカットオフ値とした。

4. 研究成果

(1) AA 血清は K562 細胞と反応する

AA 患者血清中の自己抗体の発現を、血球細胞株 K562 と骨髄ストローマ細胞株 hTS-5 を用い FACS 解析したところ、AA の 43.5% (10/23) が K562 細胞と反応し、21.7% (5/23) が hTS-5 細胞と反応した (図 1)。hTS-5 の陽性例は K562 細胞とも反応した。

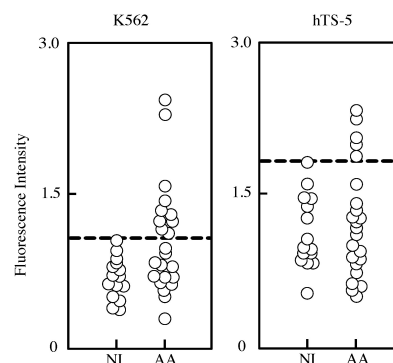


図1 血球細胞とストローマ細胞に対する自己抗体発現解析

(2) AA における SEREX 抗原の同定

CLIC1 (NM_001288)、 SLIRP (NM_031210)、 HSPB11 (BC005245)、 NHP2L1 (BC095439)、 SLC50A1 (BC009621)、 RPL41 (NM_001035267)、 RPS27 (NM_001030) と SNRPF (NM_003095) が、 AA 患者血清と特異的に反応する抗原遺伝子として SEREX 法により同定された。

(3) AA は SEREX 抗原に対する自己抗体を発現する

AA 患者血清中の SEREX 抗原に対する自己抗体の発現を ELISA 法で調べた。健常者または慢性関節リウマチ患者よりも AA で、 CLIC1、 HSPB11 および RPS27 に対する自己抗体価は高値を示した。 IgG 型自己抗体の陽性率は、 CLIC1、 HSPB11、 RPS27 で、それぞれ 32.1% (9/28)、 39.3% (11/28) および 50.0% (14/28) であった (表 1)。

一方、 NHP2L1、 RAG1AP1 (SLC50A1 によりコードされる蛋白質)、 RPL41、 SNRPF と SRA-RNABP (SLIRP によりコードされる蛋白質) 自己抗体価の上昇は認めなかった。

表 1 各種疾患における IgG 型自己抗体陽性率

	NI	AA	MDS	RhA
CLIC1	0% (0/21)	32.1% (9/28)	9.1% (2/22)	5.0% (1/20)
HSPB11	4.8% (1/21)	39.3% (11/28)	18.2% (4/22)	5.0% (1/20)
RPS27	0% (0/21)	50.0% (14/28)	18.2% (4/22)	5.0% (1/20)

NI: 健常者, AA: 再生不良性貧血, MDS: 骨髄異形成症候群, RhA: 慢性関節リウマチ

(4) SEREX 抗原は、 K562 細胞と CD34 陽性血球細胞に発現している

全ての SEREX 抗原が K562 細胞で発現しており、その程度は hTS-5 細胞よりも高かった (図 2A)。次に、これらの遺伝子が健常者血球に発現しているかどうかを調べたところ、 CLIC1、 NHP2L1、 SLC50A1、 RPL41、 RPS27 および SNRPF が骨髄単核細胞に発現していた (図 2B)。また、その多くは、 CD34 陰性血球よりも CD34 陽性血球で発現レベルが高かった (図 2B)。

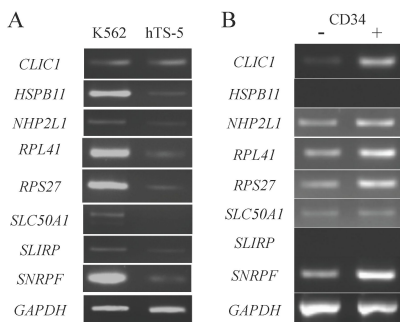


図 2 血球細胞とストローマ細胞における SEREX 抗原遺伝子の発現解析

(5) CLIC1 と RPS27 の IgG 抗体価は免疫抑

制療法に対する奏効率と相関する

IgM 型自己抗体価を調べたが、健常者と AA 間で差異を認めなかった。

自己抗体の発現パターンから、 IgM 陽性かつ IgG 陽性、 IgM 陽性かつ IgG 陰性、 IgM 陰性かつ IgG 陽性、そして、 IgM 陰性かつ IgG 陰性の 4 群に AA 患者を分類可能であった。自己抗体の発現パターンと免疫抑制療法に対する反応性との関係を調べると、 12 例中 11 例が、いずれかの SEREX 抗原に対する IgG 型自己抗体を保有していた。一方、免疫抑制療法に反応しなかった 4 例では、いずれの IgG 型自己抗体も発現していなかった。

次に、 IgG 型自己抗体価と免疫抑制療法に対する反応性との関係を調べた。免疫抑制療法不応例よりも反応例で、 CLIC1 または RPS27 に対する IgG 型自己抗体価は高値を示した (図 3)。また、 CLIC1、 HSPB11 あるいは RPS27 に対する IgG 型自己抗体価が高いほど、免疫抑制療法に対する奏効率が高かった。 CLIC1、 HSPB11 および RPS27 の相関係数は、それぞれ、 0.835、 0.647 および 0.960 であった。

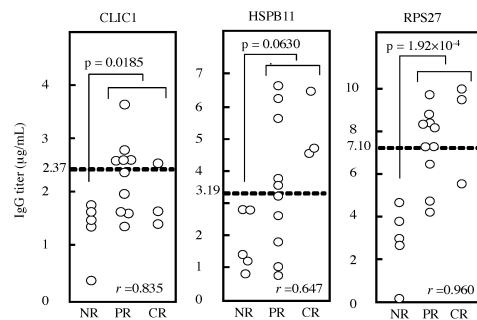


図 3 自己抗体価と免疫抑制療法に対する反応性
NR; No response, PR; partial Response, CR; Complete Response

本研究で同定された自己抗体は、以下の 2 点で臨床応用可能であると考えられる。抗 RPS27 抗体陽性率は、 AA で 50.0% (表 1、 14/28)、 MDS で 14.3% (表 1、 4/21) と、 AA で有意に発現率が高かった ($P=6.95 \times 10^{-5}$)。 AA と MDS は治療法が大きく異なるため、その鑑別は重要であるが、現在 AA と MDS を鑑別する血清マーカーはない。第一点目として、これらの自己抗体が AA と MDS の鑑別マーカーとなることが期待される。

次に、 CLIC1、 HSPB11 または RPS27 に対する IgG 型自己抗体価が高いほど、免疫抑制療法に対する良好な結果が予測されることが示された (図 3) ことから、これらの自己抗体が、免疫抑制療法の効果を予測するサロゲートマーカーとなることが期待される。一般に AA の免疫抑制療法不応例は骨髄移植を受ける。また、診断から骨髄移植までの期間が短い方が、その成功率が高いことが知られている。自己抗体価を測定することで、免疫抑制療法の開始や中止、あるいは骨髄移植を行

う際の判断材料となるであろう。
これまで、AA の免疫異常の標的は血球細胞なのかストローマ細胞なのか不明な点が少なくなかった。本研究で同定された SEREX 抗原の多くが K562 細胞および CD34 陽性骨髄単核球細胞で強く発現していること、AA 患者の自己抗体が hTS-5 ストローマ細胞よりも K562 血球細胞を標的としていたことから、AA の免疫異常は血球細胞を標的としていると考えられた。

以上、本研究の結果、血球細胞に発現する CLIC1、HSPB11 と RPS27 が、AA の標的抗原となっている可能性が示唆された。これらの抗原に対する自己抗体を測定することで、骨髄不全症候群から免疫異常を有する一群を抽出することが可能となると考えられた。

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1件)

Goto M, Kuribayashi K, Takahashi Y, Kondoh T, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N, Identification of autoantibodies expressed in acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2013; 160:359-62. 査読有 DOI: 10.1111/bjh.

[学会発表](計3件)

後藤真希、栗林景晶、遠藤明美、盛合亮介、田辺宏美、近藤崇、田中真樹、小林大介、渡邊直樹 . 再生不良性貧血における自己抗体認識抗原の同定 . 第 51 回日本臨床化学会年次学術集会, 2011, 札幌 .
栗林景晶、後藤真希、遠藤明美、盛合亮介、田辺宏美、近藤崇、田中真樹、小林大介、渡邊直樹 . Autoantibodies against ribosomal protein S27 are frequently detected in aplastic anemia. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋 .
後藤真希、栗林景晶、遠藤明美、盛合亮介、田辺宏美、近藤崇、田中真樹、小林大介、渡邊直樹 . 再生不良性貧血における自己抗体認識抗原の同定とそのパターン解析 . 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 2011, 岡山 .

[図書](0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 再生不良性貧血のマーカーおよびその利用

発明者: 栗林景晶、後藤真希、渡邊直樹

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2012-005616

出願年月日: 平成 24 年 1 月 13 日

国内外の別: 日本

取得状況(計0件)

[その他]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗林 景晶 (KURIBAYASHI KAGEAKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50381257

(2)研究分担者

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10158644

(3)連携研究者