

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659312

研究課題名(和文)脆弱な抗原性を示す細胞表面新奇自己抗原の解析と新たな自己抗体検査法の開発

研究課題名(英文) Analysis of novel autoantigens with labile epitopes on cell surface, and development of new diagnostic test for the detection of autoantibodies

研究代表者

三浦 恵二 (MIURA, Keiji)

藤田保健衛生大学・医療科学部・講師

研究者番号：20199946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗血管内皮細胞抗体(AECA)を検出するためにCSP-ELISAという新しい方法を開発した。CSP-ELISAによるIgG-AECAの陽性率は、全身性エリテマトーデスで95%、混合性結合組織病で97%、全身性強皮症で58%になった。また、IgA-AECAの陽性率は、それぞれ34%、20%、64%になった。これらの疾患患者のAECAは、血管内皮細胞の細胞表面に発現している膜タンパクを認識していた。CSP-ELISAは、臨床状況の中で、抗細胞表面自己抗体の検出と診断の改善に期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed a new assay for detecting AECA by CSP-ELISA. IgG-AECA positive rates of using CSP-ELISA were 95% for SLE, 97% for MCTD and 58% for SSc. Also, IgA-AECA positively rates were 34%, 20%, and 58% respectively. AECA in patients of these disorders recognized membrane proteins expressed on cell surface of endothelial cells. CSP-ELISA holds promise for improving the detection of anti-cell surface autoantibodies and the diagnosis in the clinical context.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：自己免疫疾患 自己抗体 自己抗原 血管内皮細胞 細胞表面抗原 膜タンパク 診断法

1. 研究開始当初の背景

(1) 各種自己免疫疾患において、それぞれに特徴的な自己抗体およびその標的抗原が見つかり、臨床検査に使用されているものも多い。例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)の DNA、全身性強皮症(SSc)の Scl-70(トポイソメラーゼ I)、混合性結合組織病(MCTD)の U1-RNP などがある。これら自己抗原の多くが、細胞内(核内)局在物質である。ところが、自己免疫疾患患者血清を用いた細胞染色や FACS 解析で、細胞表面に結合する抗体の存在を示す論文も数多く発表され、抗血管内皮細胞抗体(AECA: Anti-endothelial cell antibody)と名付けられていた。

(2) AECA の存在が明らかにも関わらず、AECA が結合している細胞表面上の自己抗原の報告は少なかった。また、AECA の検出には、細胞を直接使用する Cyto-ELISA 法、あるいは蛍光抗体による細胞染色、FACS 解析などによるものが主な方法であり、多検体を処理でき、かつ安定して抗体価を測定できる標準化された方法がなかった。

2. 研究の目的

(1) 血清中に存在する AECA を測定するための標準化された方法を確立することにより、多くの患者血清を処理し、抗体価と病態との関連を探ることにより、病態に直結する自己抗体の検出、そして診断法の開発を目指した。

(2) AECA 抗体価が高値を示した患者血清を細胞表面膜タンパクに対して反応させ、抗原抗体反応が起こった分子を回収する方法、即ち免疫沈降法により自己抗原を精製し、その抗原の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 自己免疫疾患には数多くの疾患が知られているが、患者数が多く、かつ共同研究を行っている本学リウマチ感染症内科、腎内科、皮膚科で血清の準備しやすい疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性強皮症(SSc)、混合性結合組織病(MCTD)を本研究の主な対象疾患とした。

(2) 血管内皮細胞を使用するこれまでの研究では、臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)が最もよく使用されているが、臍帯が特殊な組織であること、自己免疫疾患は、疾患により病態の現れる臓器・組織がいろいろあることを考慮して、腎系球体毛細血管内皮細胞(HMVEC)、皮膚微小血管内皮細胞(HMVECd)、肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)なども併せて使用した。

(3) ディッシュで培養した血管内皮細胞を回収し、細胞表面タンパクのリジン残基を、Sulfo-NHS-LC-Biotin でビオチン化した。このビオチン化試薬は、生きた細胞では細胞内に取り込まれないため、細胞表面に存在していたことの印になること、さらに細胞内に存在する自己抗原は

ビオチン化されず、多くの既知の自己抗原を排除できることを想定した。ビオチン化処理した細胞をホモジナイズにより破碎し、可溶性画分を除去後、回収された不溶性画分を 1% n-dodecyl-β-D maltopyranoside (DDM)で可溶化し膜画分とした。

(4) 膜画分を、予めビオチン結合タンパク NeutrAvidin でコートした ELISA ウェルに添加することでビオチン化膜タンパクを捕捉した。DDM は、膜タンパク研究において汎用性の高い界面活性剤として知られることから、膜タンパクあるいはその複合体の立体構造をできるだけ保持した状態で固相化できることを期待した。ELISA ウェルに患者血清を反応させ、洗浄後、結合している自己抗体を HRP 標識抗ヒト抗体で検出した。自己抗体のアイソタイプについては、IgG と IgA を検出するため、HRP 標識抗ヒト IgG ヤギ抗体、HRP 標識抗ヒト IgA ヤギ抗体を使用した。この新たな測定法が本研究で開発・確立できた CSP-ELISA である。研究成果に示している AECA 抗体価の測定は、全て CSP-ELISA で測定した。

(5) 免疫沈降法は、次のように行った。患者血清を Protein-G ダイナビーズに反応させて IgG を捕捉し、それに(3)で調製した膜画分を反応させた。洗浄後、IgG に結合した自己抗原を回収し、SDS-PAGE で分離、タンパクを検出した。

(6) SDS-PAGE で分離したタンパクをナイロン膜に転写し、HRP 標識 NeutrAvidin を使用してビオチンを検出、タンパク質は銀染色で検出した。

(7) タンパク質の同定は、SDS-PAGE で確認されたバンドを切り出し、トリプシン処理後、質量分析装置で解析した。

4. 研究成果

(1) CSP-ELISA を用いて、各種自己免疫疾患 126 検体について AECA 抗体価を測定した。本研究開始初期の結果を図1に示す。血管内皮細胞は、HUVEC を使用した。健康人(HC)で 3% 陽性になったのに対し、SLE、MCTD、SSc で、それぞれ 78%、81%、56%が陽性を示した。

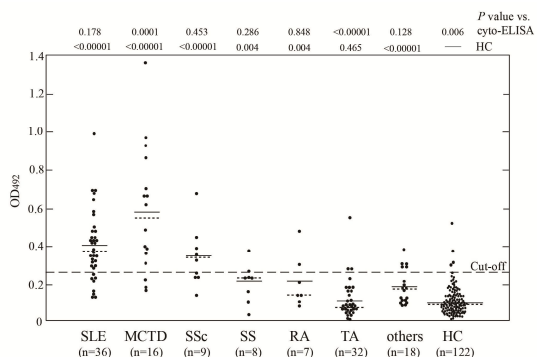


図1 CSP-ELISA による IgG-AECA 抗体価

(2) SLE の検体数を増やし、かつループス腎炎の有無との関連を調べた。その結果を図2に示す。腎生検によりループス腎炎が確認されている群 51 検体を LN、確認されていない群 25 検体を non-LN と示している。DC はループス腎炎ではない他の腎疾患 10 検体、HC は健常人 81 検体である。ループス腎炎の病態をもつ患者においては、IgG-AECA、IgA-AECA の両方が高値を示すことがわかった。

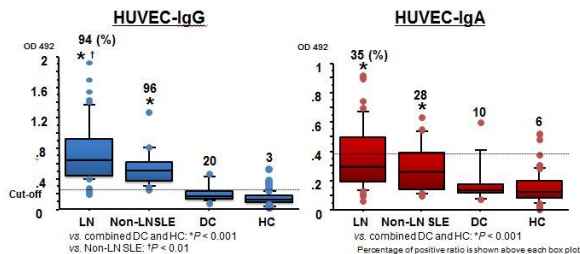


図2 ループス腎炎と AECA 抗体価との関連

さらに、ループス腎炎が確認されている患者において、活動性病変との関連について検討した。その結果を、図3に示す。A(+)は活動性病変有り、A(-)は活動性病変なしである。活動性病変と IgA-AECA 抗体価との間に相関性が見られた。以上の結果より、血清 AECA の抗体価はループス腎炎の活動性を示す有用なマーカーとなりうる可能性が示唆された。

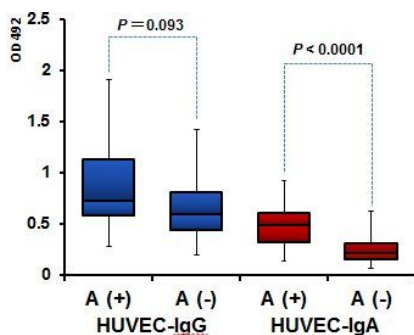


図3 活動性病変と AECA 抗体価との関連

(3) IgG-AECA 抗体価が高値の患者血清を用いて免疫沈降法により自己抗原の精製を行い、患者血清特異的なバンドの検出を試みた。その結果を図4に示す。

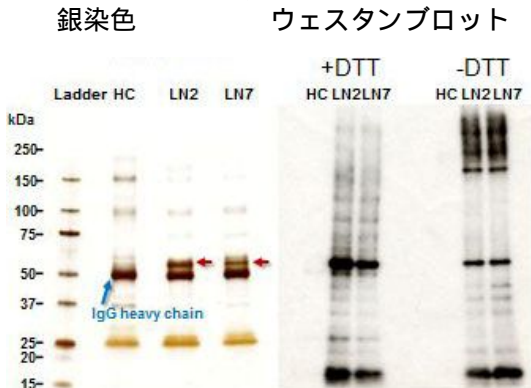


図4 SLE 患者血清を用いた免疫沈降実験

LN2, LN7 はループス腎炎患者、HC は健常人である。LN2, LN7 に特異的に見られるバンド (赤矢印) が確認でき、ウェスタンブロット解析で、そのバンドがビオチン化されていることが確認できた。また、非還元条件で高分子領域に移動することから、複合体を作っている分子であることがわかった。すなわち、生きた細胞の段階では、細胞表面に複合体として存在していたことを意味していた。このバンドを切り出し、質量分析で解析したが、明確なタンパクは同定できなかった。

(4) SSc 血清 86 検体について、AECA 抗体価の測定および臨床症状との関連を検討した。86 検体は、60 検体が限局皮膚硬化型強皮症 (dSSc)、26 検体がびまん皮膚硬化型強皮症 (ISSc) に分類された。血管内皮細胞は皮膚微小血管内皮細胞(HMVECd)を使用して膜画分を調製し、CSP-ELISA に使用した。その結果を図5に示す。IgG-AECA、IgA-AECA は、それぞれ 58%、64%で陽性を示した。dSSc、ISSc 両群では AECA 抗体価の差は認められなかった。

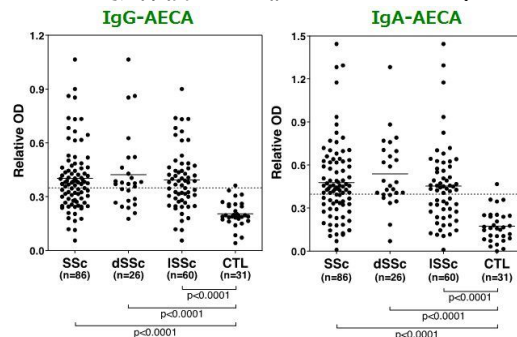


図5 SSc 患者血清中の AECA 抗体価

(5) AECA 抗体価と強皮症患者臨床検査データとの相関を検討した。その結果、IgG-AECA が陽性の SSc 患者では、肺線維症の頻度が高く、肺活量(%VC)、肺拡散能力(%DLco)も低値を示した。また、血清 IgG 値が高く、抗セントロメア抗体の陽性率は低かった。IgG-AECA 抗体価は、%VC、%DLco、リンパ球数、血清クレアチンクリアランス値と負の相関を示し、KL-6 値、血清 IgG 値と正の相関を示した。IgA-AECA 抗体価は、スキンスコア(mTSS)、血清 IgA 値、血清 NT-proBNP 値、推定右室圧と正の相関を示し、%DLcoと負の相関を示した。IgG-AECA 抗体価の高い患者と IgA-AECA 抗体価の高い患者では異なった臨床像を呈する可能性が示唆された。以上の結果より、血清 AECA の抗体価は SSc の重症度を示す有用なマーカーとなりうる可能性が示唆された。

(6) MCTD 患者血清 200 検体、健常人(HC)血清 121 検体について AECA 測定を行った。その結果を図6、および図7に示す。MCTD での陽性率は、IgG-AECA で 194/200 (97%)、IgA-AECA で 40/200 (20%) になった。

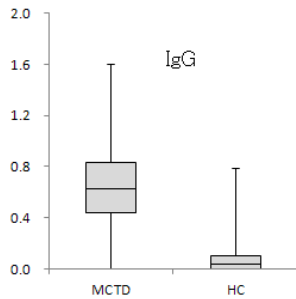


図6 MCTD 患者血清中の IgG-AECA 抗体価

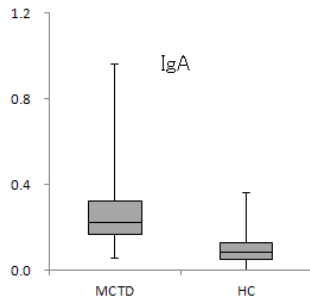


図7 MCTD 患者血清中の IgA-AECA 抗体価

(7) 他の自己抗体価との相関性

IgG-AECA 値は、抗 U1-RNP 抗体価との間に中程度の正の相関が見られたが、IgA-AECA 値と抗 U1-RNP 抗体価との間には相関は見られなかった。U1-RNP は、MCTD の診断マーカーであるが、それとは別の抗原抗体反応を検出していることが示唆された。(図8) また、抗 DNA 抗体、抗 Sm 抗体については、CSP-IgG 値、CSP-IgA 値共にほとんど相関は見られなかった。

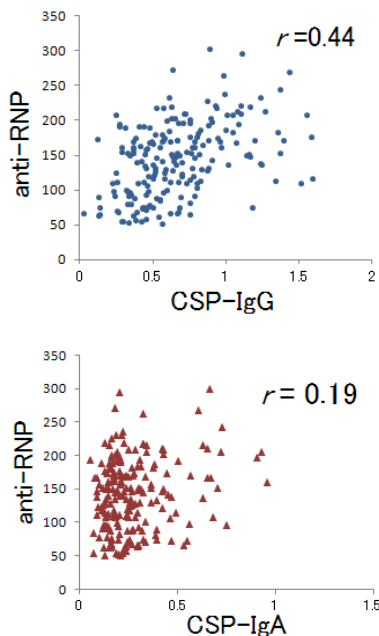


図8 抗 U1-RNP 抗体との相関性

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)

Miura K., Aoun K., Yoshida S., Kurosawa Y., Autoantibodies directed against labile epitopes on cell surface proteins in autoimmune disease patients: Proposal of a novel ELISA for the detection of anti-endothelial cell antibodies., 査読有, Journal of immunol. Meth. 382(1-2), 2012, 32-39.

(学会発表) (計8件)

Kondo A., Takahashi K., Mizuno T., Hirano D., Akiyama S., Hayashi H., Koide S., Takahashi H., Hasegawa M., Hiki Y., Yoshida S., Miura K., Yuzawa Y. The Level of IgA Antibodies to Endothelial Cells Correlate with Histological Evidence of Disease Activities in Patients with Lupus Nephritis. American Society of Nephrology, Annual Meeting, 2014 年 11 月 13 日, Philadelphia, USA.

岩田洋平、三浦恵二、小寺雅也、吉田俊治、田中紅、矢上晶子、松永佳代子、全身性強皮症患者における CSP-ELISA 法を用いた抗血管内皮細胞抗体の陽性頻度と臨床相関の検討、日本臨床免疫学会、2014 年 9 月 26 日、京王プラザホテル、東京都

近藤亜矢子、高橋和男、平野大介、水野智博、飯田忠行、秋山真一、林宏樹、小出滋久、富田亮、長谷川みどり、比企能之、吉田俊治、三浦恵二、湯沢由紀夫、ループス腎炎における IgA 型抗血管内皮細胞抗体と腎炎活動性の関連、日本腎臓学会、2014 年 7 月 6 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Takahashi K., Kondo A., Hirano D., Akiyama S., Hayashi H., Koide S., Hasegawa M., Yoshida S., Hiki Y., Miura K., Yuzawa Y. IgA Antibodies to Glomerular Endothelial Cells in Patients with Lupus Nephritis: Correlations with Renal Injury. American Society of Nephrology, Annual Meeting. 2013 年 11 月 5 日. Atlanta, USA.

Miura K., Kondo A., Takahashi K., Hirano D., Hiki Y., Yoshida S., Yuzawa Y., Kurosawa Y. Autoantibodies Directed Against Cell Surface Components in Autoimmune Disease Patients: Proposal of a Novel ELISA for the Detection of Anti-Endothelial Cell Antibodies. American College of Rheumatology, Annual Meeting. 2013 年 10 月 26 日. San Diego, USA.

高橋和男, 近藤亜矢子, 比企能之, 三浦惠二, 湯澤由紀夫, IgA 腎症における抗血管内皮細胞抗体の検出, 日本腎臓学会学術総会 2013年5月10日, 東京国際フォーラム, 東京都

高橋和男, 近藤亜矢子, 平野大介, 秋山真一, 林宏樹, 小出滋久, 富田亮, 長谷川みどり, 吉田俊治, 比企能之, 三浦惠二, 湯澤由紀夫, ループス腎炎における抗血管内皮細胞抗体の検出と膜表面抗原の同定, 日本腎臓学会学術総会 2013年5月10日, 東京国際フォーラム, 東京都

三浦惠二, アウン桂子, 吉田俊治, 黒澤良和, 自己免疫疾患患者における細胞表面上の不安定なエピトープに対する自己抗体: 抗血管内皮細胞抗体検出のための新たな ELISA の提案, 日本分子生物学会年会 2012年12月11日, 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡, 福岡県福岡市

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞表面タンパクを抗原とする抗体を測定する方法

発明者: 三浦惠二, 吉田俊治, 黒澤良和

権利者: 学校法人藤田学園

種類: 特許

番号: 特願 2012 - 212007

出願年月日: 平成 24 年 9 月 26 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

三浦惠二, 抗血管内皮細胞抗体を検出するための新たな ELISA 法, 「JST 発 新技術説明会 (第 3 回)」, 2014 年 3 月 11 日, JST 東京別館ホール, 東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 惠二 (MIURA, Keiji)

藤田保健衛生大学・医療科学部・講師

研究者番号: 20199946

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

吉田 俊治 (YOSHIDA Shunji)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 00166951

(4) 研究協力者

高橋 和男 (TAKAHASHI Kazuo)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号: 90631391

岩田 洋平 (IWATA Yohei)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号: 60437861