

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791112
 研究課題名（和文） 抗シトルリン化ペプチド抗体陰性関節リウマチ患者における新規自己抗体の探索
 研究課題名（英文） Identification of new autoantibodies in anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies negative rheumatoid arthritis
 研究代表者
 湯川 尚一郎（YUKAWA NAOICHIRO）
 京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学・助教
 研究者番号：90422972

研究成果の概要（和文）：8 例の抗 CCP 抗体陰性リウマトイド因子陰性関節リウマチ（RA）患者血清を用いて、AlphaScreen 法により自己抗体のスクリーニングを行い、全例で検出された自己抗体の対応抗原候補蛋白 2 種類について Western blot および ELISA にて自己抗体の検出を行った。Western blot では自己抗体を検出できたものの、ELISA では検出率が低く、蛋白により反応性が様々であった。今後は、ELISA の条件検討などが必要となるが、今回発見された抗体は自己抗体陰性 RA において新たな自己抗体となる可能性があり、臨床的有用性を検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：The new autoantibodies were screened by the AlphaScreen method using sera from eight antiCCP antibody-negative rheumatoid factor-negative rheumatoid arthritis (RA) patients. In two candidate proteins which were detected in all sera by AlphaScreen method, the autoantibodies were determined by Western blot and ELISA. Although autoantibodies were detected by Western blot, the detection rate was low by ELISA. These antibodies may become the new autoantibody in the autoantibody-negative RA. Next, we are going to examine the clinical utility of these autoantibodies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学，自己抗体

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）は、自己免疫異常を基盤とし慢性の破壊性関節炎を特徴とする、全身性炎症性疾患である。いまだ原因は不明であるが、近年の TNF 阻害療法を中心とする生物学的製剤の登場によりその治療戦略にはパラダイムシフトがもたらされ、寛解が現実的な目標となった。そのため、早期診断・早期治療、さらに治療反応性や予後・経過の予測についての必要性は、以前にまして迫られている状況である。

RA は代表的な自己免疫性疾患であるものの、その由縁ともいべき疾患特異的自己抗体は、臨床的には古くから知られるリウマトイド因子（RF）が用いられているのみであった。RF は 1987 年改訂アメリカリウマチ学会分類基準の 1 項目に含まれてはいたが特異度は充分ではなく、また早期 RA での陽性率は 50% 程度に過ぎないため、RA 診断、特に早期 RA におけるマーカーとしては充分といえるものではなかった。近年、抗シトルリン化ペプチド抗体（ACPA）が RA に特異的な自己抗

体として注目されている。RAにおける疾患特異度や疾患の程度が極めて高く、臨床経過や関節破壊の予後を予測しようとされ、さらに最近改訂された2010 RA分類新基準の1項目に含まれたことなど、RA診療におけるACPAの有用性は極めて高い。

一方、RAの約30%ではACPAが陰性であり、またACPAに加えRFも陰性である血清陰性RA患者においては、特異的マーカーを認めないことから診断に苦慮することが多い、さらには軽症例から高度関節破壊進行に至ってしまう例まで症例により経過が大きく異なるため、治療方針決定のための指標にも乏しい、などといった問題がある。

RAの自己抗体として、これまではRFやACPA以外にも、抗カルパスタチン抗体や、抗GPI抗体など、新たな自己抗体の報告はなされてはいるものの、いずれの感度・特異度も診断マーカーとして十分なものではなく、臨床応用されるには至らなかった。

今回、自己抗体のスクリーニングに関して愛媛大学により、画期的な方法が開発された。すなわち、無細胞生命科学研究センターの遠藤弥重太教授、澤崎達也准教授（研究協力者）らが効率的な無細胞蛋白質合成系を開発、これをロボット化することにより、一度に384種類の蛋白を同時にプレート上で合成することが可能となった。この際、ビオチン化蛋白を作成し蛍光システムと組み合わせることにより、蛋白を精製することなく、粗な蛋白溶液に患者血清 coated beads を加えることで、自己抗体のスクリーニングを極めて効率的に、感度は保ったままで行うことができる。この系の利点としては、作成蛋白が既知であることから、自己抗体のスクリーニング後に蛋白の同定をする必要がなく、非常に効率よく自己抗体プロファイルを作成可能であることがあげられる。

これらのシステムを用いることでACPA陰性RA患者血清中の自己抗体プロファイルを比較的短期間に行うことが可能であるため、その後はさらにスクリーニングを続け検体の数を増やし、得られた自己抗体プロファイルからACPA陰性RAに高頻度に見られる自己抗体、RAに特異度の高い自己抗体を検索することにより、ACPA陰性RAに関連する自己抗原や病態に関わる分子の同定、またRAの診断に役立つ自己抗体の選定を行っていくことを目指す。

2. 研究の目的

ACPAは、RAにおいて臨床経過や関節破壊の予後を予測する極めて有用な血清マーカーである。しかしACPAやRF陰性のRAも存在し、特異的マーカーが陰性のため診断が困難であり、さらに臨床経過や関節予後も症例により異なっている。今回、無細胞蛋白合

成系という新しい技術によりビオチン化蛋白を作成し、この蛋白溶液に患者血清をコートしたビーズを加えるというAlphaテクノロジーを用いて、まずACPA陰性RA患者において効率的網羅的に自己抗体のスクリーニングを行う。検出された自己抗体はWestern blotで確認後ELISAを確立し、検体数を増やし臨床的意義についての解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ACPA陰性RAにおける自己抗体のスクリーニング

自己免疫疾患ゲノムデータベースと膜蛋白質データベースに基づく2200の蛋白と、早期RA関節滑膜組織に発現する遺伝子のマイクロアレイデータベースよりセレクトした220の遺伝子を加えた約2500の蛋白について、cDNAクローニング、ビオチン連結蛋白を発現させるベクターへの組み込み、無細胞蛋白質合成系での蛋白合成が終了し、自己抗体のスクリーニングを開始した。最初のスクリーニングは、ACPAおよびRF陰性で、かつ関節破壊を有するRA患者血清8検体を用いて行った。自己抗体のスクリーニングは、AlphaScreen法を用いて行った。すなわち、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用しドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時のみ、発光シグナルを検出することができるシステムである。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換し、一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。ここではドナービーズにStrepto-Avidinを結合させ、ビオチン化した合成蛋白に結合するようにし、一方アクセプタービーズにはあらかじめProtein Gがコートされており、患者血清（自己抗体）と反応させ血清中のIgGが結合する。患者血清中の自己抗体が合成蛋白に結合するときだけ両ビーズが近接し、レーザーにて蛍光を発することで自己抗体の有無を判定できる。

(2) ACPA陰性RF陰性RA血清8検体について、スクリーニングで絞り込まれた自己抗原候補蛋白を用いて、Western blotにより自己抗体の存在およびその特異性を確認した。まず、8検体全例で反応を認めた11個の蛋白と、

8例中7例で反応を認めた1個の蛋白について行った。

(3) Western blot によって確認された抗体について、ELISA を行った。

(4) 検出された自己抗体の RA における感度・特異度を検定するため、各種膠原病・リウマチ性疾患の血清についても ELISA を行った。

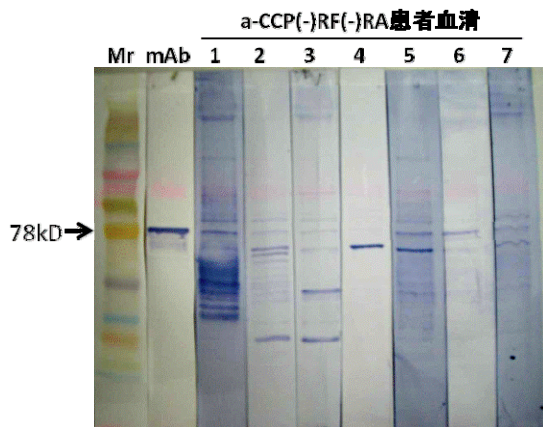
(5) 同様に、AlphaScreen 法による自己抗原候補蛋白の絞り込み、自己抗体の確認～ELISA の確立、を引き続いて行う。

4. 研究成果

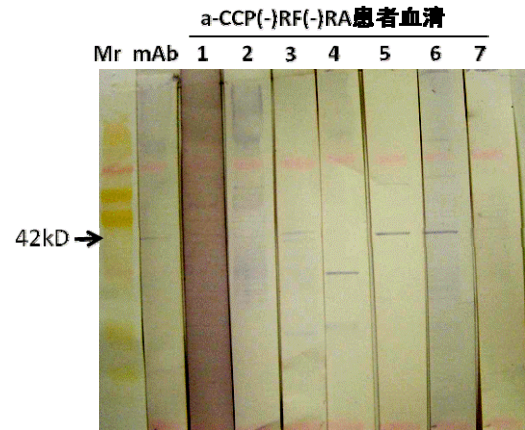
(1) ACPA 陰性 RF 陰性 RA 血清 8 検体を用いた AlphaScreen 法によって絞り込まれた自己抗原候補蛋白中、全 8 検体で反応を認めた 11 蛋白のうちの 3 蛋白(以下表中の蛋白④, ⑤, および⑩) と、8 検体中 7 検体で反応を認めた(残る 1 検体は弱反応)、興味深い 1 蛋白(蛋白⑫, 表には示していない) について、まず Western blot (WB) によって自己抗体の存在の確認を行った。

蛋白	検体 1	検体 2	検体 3	検体 4	検体 5	検体 6	検体 7	検体 8
①	687	923	519	241	360	274	277	615
②	1054	1372	803	247	410	311	306	914
③	887	1170	549	250	363	300	316	870
④	2473	2945	1206	291	647	482	464	2474
⑤	1206	1381	647	245	459	416	367	1712
⑥	1503	1709	909	264	563	247	352	1494
⑦	960	1323	668	258	570	238	334	1108
⑧	1381	1693	833	288	584	369	439	2224
⑨	949	1059	541	238	349	303	267	879
⑩	951	1261	796	248	392	247	312	845
⑪	764	1032	494	251	383	258	276	787

蛋白⑩については、positive control として用いた市販のモノクローナル抗体および患者血清のすべてで 78kD のバンドが認められた(下図)。



同様に、蛋白⑫についても、やや淡いが市販のモノクローナル抗体および患者血清のすべてで 42kD のバンドが認められた。



一方、蛋白④および⑤については、血清ではバンドを認めたものの、市販のモノクローナル抗体では反応が認められなかった。

(2) 次に、WB で反応が確認できた蛋白⑩および蛋白⑫については、ACPA 陽性 RF 陽性 RA 患者、全身性エリテマトーデス (SLE)、および健康人を対照として、予備的に ELISA を施行した。ELISA は大腸菌に発現させた市販のリコンビナント蛋白を ELISA プレートに固相化し、100 倍希釈血清を用いてアッセイを行った。結果、健康人 (n=5) の OD+2SD を cut-off 値とした時の陽性率は、蛋白⑩で ACPA(-)RF(-)RA 1/7, ACPA(+)RF(+)RA 1/7, SLE 2/7, 蛋白⑫ではそれぞれ 3/7, 3/7, 1/7, であった。

蛋白⑩, 蛋白⑫に対する ELISA の検討

	ACPA(-)RF(-)RA	ACPA(+)RF(+)RA	SLE
蛋白⑩	1/7	1/7	2/7
蛋白⑫	3/7	3/7	1/7

健康人 (n=5) の OD 値+2SD を cut-off 値とした時の陽性率

以上 2 つの自己抗体は、ELISA の検出率は低かったものの、ACPA 陰性 RF 陰性 RA 患者において新規自己抗体となる可能性があり、今後は ELISA の条件検討を行った上で、本自己抗体の臨床的有用性を検討していく予定である。

(3)以上の結果から、AlphaScreen 法によってスクリーニングされた自己抗原候補蛋白では、WB で positive control として用いた市販のモノクローナル抗体と、実際の患者血清との反応性に乖離が存在することが明らかとなったため、本研究手法の今後を左右する重大な問題と考え、再検討を行った。しかし、結果は同様であり、いくつかの蛋白では市販のモノクローナル抗体では反応が認められなかった。このことから、無細胞系により作成された蛋白の中には、実際にヒトに存在する蛋白とは異なった組成、あるいは構造となってしまうものがある可能性が考えられたため、モノクローナル抗体によって反応が確認できた蛋白のみを有意なものとし、それらについて ELISA で抗体価の測定を行っていくこととした。

WB で反応が確認できた蛋白について、同様に ELISA は大腸菌に発現させた市販のリコンビナント蛋白を ELISA プレートに固相化し、100 倍希釈血清を用いてアッセイを行った。しかし、これもスクリーニングに用いた血清で反応がみられないことがあり、各蛋白で陰性となる血清は一定ではなかった。そのため今度は、無細胞系で作成させた蛋白は市販のリコンビナント蛋白と組成が異なってしまった可能性、あるいは、ELISA であるため抗体が立体構造を認識していた可能性、が考えられた。

以上の結果から、無細胞系により作成された蛋白を用いた AlphaScreen 法による自己抗体の探索に際しては、スクリーニング効率は良いものの、候補蛋白それぞれについて WB および ELISA での確認が必要であるため、今後も蛋白 1 種類ごとに選定作業を行っていく予定である。また、無細胞蛋白合成系で生成した蛋白を用いた WB ではきちんと自己抗体検出ができたが、大腸菌発現系で生成した蛋白を用いた ELISA では検出率が悪かったことから、立体構造など蛋白の質の問題の可能性もあると考えられ、無細胞蛋白合成系蛋白を精製し純度を上げて ELISA 法を行うなど、改良を試みることも検討している。

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 9 件)

(1) Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, et al. (他 7 名, 3 番目) Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. PLoS One. 2013;8:e62231. doi:10.1371/journal.pone.0062231. <査読あり>

(2) Terao C, Hashimoto M, Yukawa N, et al. (他 15 名, 9 番目) Three groups in the 28 joints for rheumatoid arthritis synovitis--analysis using more than 17,000 assessments in the KURAMA database. PLoS One. 2013;8:e59341. doi:10.1371/journal.pone.0059341. <査読あり>

(3) Shoji T, Bando T, Yukawa N, et al. (他 5 名, 6 番目) Living-donor lobar lung transplantation for rapidly progressive interstitial pneumonia associated with clinically amyopathic dermatomyositis: report of a case. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2013;61:32-4. doi: 10.1007/s11748-012-0106-3. <査読あり>

(4) Kiyama K, Kawabata D, Yukawa N, et al. (他 6 名, 5 番目) Serum BAFF and APRIL levels in patients with IgG4-related disease and their clinical significance. Arthritis Res Ther. 2012;14:R86. doi: 10.1186/ar3810. <査読あり>

(5) Murakami K, Tanaka M, Yukawa N, et al. (他 11 名, 8 番目) Follistatin-related protein / follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and tolllike receptor 4. FEBS Lett 2012;586: 319-24. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.010. <査読あり>

(6) Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, et al. (他 6 名, 1 番目) Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. Arthritis Res Ther. 2011;13:R213. doi:10.1186/ar3546. <査読あり>

(7) Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yukawa N, et al. (他 11 名, 9 番目) Overexpression of a minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- κ B and increased STAT5 signals. PLoS One. 2011;6:e27020. doi:10.1371/journal.pone.0027020. <査読あり>

(8) Terao C, Ohmura K, Yukawa N, et al. (他 5 名, 4 番目) Serum IgG levels demonstrate seasonal change in connective tissue diseases: a large-scale, 4-year analysis in Japanese. Mod Rheumatol. 2012;22:426-30. doi:10.1007/s10165-011-0535-3. <査読あり>

(9) Takeda N, Nojima T, Yukawa N, et al. (他8名, 4番目) Interferon-gamma release assay for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infections in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2011;20:792-800. doi:10.1177/0961203310397966. <査読あり>

〔学会発表〕(計6件)

(1) 大村 浩一郎, 山本 奈つき, 寺尾 知可史, 中嶋 蘭, 井村 嘉孝, 吉藤 元, 湯川 尚一郎, 橋本 求, 藤井 隆夫, 松田 文彦, 三森 経世. 関節リウマチにおける抗 MBP 抗体のエピトープとその意義. 日本臨床免疫学会, 2012年09月27日~2012年09月29日, 東京都新宿区

(2) 村上 孝作, 田中 真生, 臼井 崇, 川端 大介, 塩見 葵, 井口 美季子, 清水 正和, 吉藤 元, 湯川 尚一郎, 大村 浩一郎, 藤井 隆夫, 梅原 久範, 三森 経世. ホリスタチン関連タンパク質は CD14 と Toll 様受容体 4 を介して自然免疫反応を惹起する. 日本臨床免疫学会, 2012年09月27日~2012年09月29日, 東京都新宿区

(3) 横山 倫子, 藤井 隆夫, 山川 範之, 中嶋 蘭, 村上 孝作, 湯川 尚一郎, 橋本 求, 吉藤 元, 川端 大介, 大村 浩一郎, 三森 経世. NPSLE 患者髄液中における抗 U1RNP 抗体と液性因子との相関. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウム, 2012年04月26日~2012年04月28日, 東京都品川区

(4) 片山 昌紀, 大村 浩一郎, 寺尾 知可史, 山本 奈つき, 橋本 求, 湯川 尚一郎, 吉藤 元, 川端 大介, 藤井 隆夫, 三森 経世. K/BxN 関節炎モデルマウスにおいて, IL-17 は関節炎に影響せず軟骨破壊に作用する. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウム, 2012年04月26日~2012年04月28日, 東京都品川区

(5) 村上 孝作, 藤井 隆夫, 寺尾 知可史, 大村 浩一郎, 川端 大介, 吉藤 元, 湯川 尚一郎, 橋本 求, 三森 経世. 関節リウマチにおけるリウマトイド因子・抗 CCP 抗体の抗体価と臨床経過との相関. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウム, 2012年04月26日~2012年04月28日, 東京都品川区

(6) 中嶋蘭, 井村嘉孝, 瀬戸美苗, 村上昭弘, 小林志緒, 細野祐司, 湯川尚一郎, 吉藤元, 川端大介, 大村浩一郎, 臼井崇, 藤

井隆夫, 三森経世. 自己抗体 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体を検出するための新規 ELISA の開発. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 (シンポジウム), 2011年9月16日, 東京都新宿区

〔図書〕(計1件)

湯川尚一郎, 三森経世 (宮坂信之 編). アダリムマブ/ヒュミラ. インフォームドコンセントのための図説シリーズ 関節リウマチ —生物学的製剤の正しい使い方とは? 2011年, 医薬ジャーナル社. 総ページ数 84 (p48-53)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯川 尚一郎 (YUKAWA NAOICHIRO)
京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学・助教
研究者番号: 90422972

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし