

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791150

研究課題名(和文)ルミノメーターを用いた高感度迅速ELISAの開発と皮膚筋炎自己抗体発見への応用

研究課題名(英文)Development of highly sensitive and rapid ELISA using luminometer and its application to detect autoantibodies in dermatomyositis

研究代表者

澤田 昌樹 (Sawada, Masaki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80467315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：近年同定された複数の皮膚筋炎関連自己抗体は、臨床の場で非常に有用となっているが、ごく一部の施設でしか測定できず、免疫沈降法という短時間で判定するには不向きの方法で行われている。私たちは、*in vitro*転写翻訳システムを用いて、cDNAを含むプラスミドの調整 市販キットによるビオチン化蛋白発現 ストレプトアビジンをコートしたプレートを用いたcaptured ELISA、といった技術的に容易に行える実験系を確立した。これはT7プロモーターを持ったベクターに入った目的とするタンパクのcDNAさえ所有していれば、1週間程度で自己抗体の特異的検索が行える画期的な方法である。

研究成果の概要(英文)：Although recently identified dermatomyositis-associated autoantibodies are very useful in clinics, they can be identified by a very minor population of laboratory. Moreover, immunoprecipitation methods used in the laboratories cannot produce results in a short time. We have developed technically easy experimental methods using *in vitro* translation and transcription system to detect autoantibodies; the preparation of plasmids harboring cDNA in interest->expression of biotinylated recombinant protein by a commercial kit->captured ELISA with streptavidin-coated plates. This is an epoch-making method which can be constructed for approximate one week after getting a cDNA inserted into a vector with T7 promotor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚筋炎 自己抗体 ELISA リコンビナントタンパク

1. 研究開始当初の背景

皮膚筋炎 (DM) は皮膚と筋肉を炎症の主座とする全身性自己免疫疾患であり、いまだ根源的な治療法が見つからない難治性疾患のひとつである。DM は発症年齢や合併する病態によりいくつかのサブセットに分類され、特に生命予後不良のタイプとして悪性腫瘍合併のタイプと急速進行性の間質性肺炎を合併するタイプがある。ところが、それら予後不良のタイプを発症早期より推定、鑑別しうる症状や検査マーカーは乏しいのが現状である。悪性腫瘍合併の場合は早期発見、早期治療が第一であるが、検査をどこまで行えばよいのか、また間質性肺炎合併例の治療のタイミングなど管理の仕方などに一定の結論がなく、また予後不良の間質性肺炎合併例は筋炎症状の乏しい amyopathic DM に多いことも患者の管理方法を難しくさせている。近年、DM にも、各サブセットを特徴づける自己抗体が判明してきたが、いまだに抗体の検出が一部の限られた実験施設でしか行われておらず、簡易に素早く行えるシステム作りが患者救命に望まれる。

近年、同定された DM 関連自己抗体の中で、特に重要なものとして抗 MDA-5 抗体と抗 TIF1- 抗体がある。前者は急速進行性間質性肺炎が合併するタイプに、後者は悪性腫瘍合併のタイプに、関連が深いとして有名になったが、それらの検出は、ごく限られた施設でしか行われていない。私の教室では放射性物質を使用せず、この 2 抗体に特異的な検査システムを確立した (*Rheumatol* 49:1726-33, 2010)。過去の免疫沈降法では、反応タンパクの分子量 (SDS-PAGE 上の移動度) で抗体の種類を判定し、網羅的に調べることは可能だが、結果の特異性には疑問が残る。私の教室では、*in vitro* 転写翻訳システムを用いて、cDNA を含むプラスミドの調整 市販キットによるタンパク発現 免疫沈降 イムノブロット、といった技術的に容易に行える実験系を確立し、上記 2 抗体の特異的検出を可能にした。この方法は最近、米国の研究グループも採用し、米国人抗 MDA-5 抗体について論文を初めて報告している (*J Am Acad Dermatol* 65:25-34, 2011)。

実際の臨床の場で、この系は大いに役立っている。市中病院からの紹介 DM 患者で、呼吸器内科医に肺野の炎症性陰影と判定されていたが、私たちの迅速な実験で抗 TIF1- 抗体陽性が判明したので、再度呼吸器内科医に精査をお願いしたところ、肺癌の合併であることが確認され、その後の患者管理をスムーズに行いえた。このように臨床上で非常に有用な系を確立したことを平成 23 年 9 月の名古屋膠原病カンファレンスで発表した。

上記の研究により、DM 患者における生命予後と深く関係する自己抗体の、放射性物質を使用しない安全で、かつ特異的な免疫沈降法を確立したが、次に私たちは、上記タンパク発現系を用いて、比較的多数の検体を、より短

時間で、しかも定量的に検出するシステムの構築を試みた。多検体を比較的短時間で処理する自己抗体測定法としては、ELISA 法が主流であるが、自家製 ELISA の構築を可能にするには、抗原が高度に精製されたタンパクであることが要求される。私たちの市販キットを用いた転写翻訳システムによる免疫沈降法は、目的のタンパクをビオチンで標識し、メンブレン上で [ビオチン - ストレプトアビジン (SA) - アルカリフォスファターゼ] の複合体を形成させ、最終的に発色法でタンパクを確認する方法である。そこで、Nunc 社より販売されている SA をコートした ELISA プレートを用い、ビオチン化した MDA-5 タンパクを固相化、患者血清を用いて抗 MDA-5 抗体の ELISA を試みたところ、免疫沈降法で同定した抗体の陽性、陰性の結果と 100% マッチした。このシステムを用いて、抗 MDA-5 抗体陽性の進行性間質性肺炎を伴った DM 患者 10 人の病勢の高い時と治療後の寛快時について、抗体価を測定したところ、同抗体は病勢が落ち着くと陰性化した。

以上のように、私たちの用いているリコンビナントタンパクを用いた自己抗体の測定系では、安全、性格かつ迅速に結果が得ることが判明した。我々の実験系において、コストパフォーマンスを向上させることにより、次々と同定されてきている DM 特異自己抗体を網羅的に測定できるようになれば、非常に強力な臨床検査ツールになると思われる。

2. 研究の目的

我々のすでに開発している実験系の感度の飛躍的向上を試み、新たに多数の検体を処理できる自己抗体測定の迅速高感度定量 ELISA を開発する。そして、その応用として、次々と新規の DM 特異自己抗体が諸家より報告されてはいるものの、いまだ DM 全体としては、その 3~4 割は自己抗体不明例があるとされる現状において、我々の新規実験系を用いて、新たな DM 関連自己抗体の発見を試みる。

3. 研究の方法

私たちが構築していた ELISA は、1 ウェルあたり最低 10 μ l の (ビオチン化タンパクを含む) 反応産物を要する。転写翻訳キット 1 箱全量を使用しても、プレート毎の標準血清の定量に必要な量も含めると、70~80 検体の定量が限度である。このシステムを使用する限り、数百といった検体を処理することは非現実的であるので、今回の研究では、最近、当研究室で購入したルミノメーターを用い、化学発光系 ELISA でシグナルを検出し、数十倍から数百倍の増感を試みる。

この検出システムが多検体の解析に有用であることを実証した後に、新規 DM 自己抗体の発見同定を試みる。私たちのタンパク発現システムは、目的とするタンパクの cDNA が T7 プロモーターを含むベクターに挿入さ

れているプラスミドさえ入手すれば、市販キットの試薬と DNA を混ぜるだけの、非常に簡便なものである。使用可能なベクターに挿入された cDNA は国内を始めとして数社のメーカーで市販されており、調べたいタンパク遺伝子はほぼ入手可能である。タンパク発現に必要な分量のプラスミド DNA を用意するために、自己抗原タンパクの cDNA 挿入のプラスミドをトランスフェクションさせた大腸菌を大量培養し、プラスミド DNA 精製キットを用いて調整を行う。調整した DNA はフェノール/クロロホルム処理を数回施行し、タンパク発現にできるだけ適した品質にする。Promega 社の “ TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System ” キットおよび “ Transcend™ Biotinylated tRNA ” を用いて、ピオチン化リコンビナントタンパクを合成する。作成したタンパクの検定は、ストレプトアビジン - アルカリフォスファターゼの系を用いたイムノブロットにて行う。

抗 MDA-5 抗体について、従来の光学プレートリーダーを使用する ELISA では 1 ウェルあたり最低 10 μ l のピオチン化リコンビナントタンパクを含む反応混合物が必要であったので、10、5、2.5、1、0.5 μ l と抗原の希釈実験、および、患者血清については 200、500、1000、2000 倍と抗体の希釈実験を行って、至適条件を調べた。MDA-5 の抗原抗体反応系で決定した条件を用いて、今回の研究に新たな DM 自己抗原として報告のあった TRIM28 タンパクや、新たな自己抗原としての候補（今回は TRIM32 タンパク）について、自施設における 100 例の DM 患者におけるそれぞれの抗原に対する抗体の有無を開発した ELISA を用いて調べた。

4. 研究成果

cDNA を入手し、プラスミド DNA を大量調整し、ピオチン化したりコンビナント蛋白を合成するまでは約 1 週間の行程で遂行可能であった。ELISA の構築には、市販ポリクローナル抗体や免疫沈降法で抗体陽性が判明している患者血清を用い、至適抗原量と血清希釈率を決定した。ルミノメーターで検出する化学発光系は少なくとも使用する抗原量を、従来の発色光度計を用いる方法に比べて、10 分の 1 以下の量に減らせることが可能であった。

今回、この ELISA を用い、以下のような主な結果を見出した。

他のグループから報告のあった TRIM24/28/33 (TIF1- / /) の 3 種類のタンパクについては、今回開発した ELISA でそれらに対する自己抗体が測定できることが確認された。TRIM28 (TIF1-) に対する自己抗体は他のグループの報告では、456 人の DM 患者中 7 例に認められる希な自己抗体であったが、自施設の 102 例の DM では 1 例も検出されず、やはり極めて頻度の低い抗体であることが確認された。同じく TRIM タンパクであり、筋肉に多く発現しており、そのタ

ンパクをコードする遺伝子の変異が遺伝性ミオパチーの原因になっていることが判明している TRIM32 に対する自己抗体が出現している可能性を考え、自施設の 102 例の DM 患者における抗体の有無を今回開発した ELISA で調べたが、陽性例は見出せなかった。

これまでに *in vitro* 転写翻訳システムによるリコンビナントタンパクは自己抗体研究の場でも多く使用されてきた。特に、対応抗原のクローニングなどにおいては、タンパクの発現が短時間で容易に行え、可溶性であることなどから、その使用のメリットは大きいと言える。今回、用いたリコンビナントはタンパクのリジン側鎖にピオチンが付加される形で合成され、それとストレプトアビジンとの強い結合によりプレートに短時間での個相化が可能となる。従来から自己抗原のリコンビナント発現に最も汎用されている大腸菌の系については、大腸菌の混入による非特異的反応をいかに抑えるかが問題となり、結果の判定に別法による確認実験が必要な血清も存在する。*in vitro* 転写翻訳によるタンパクを使用した今回の ELISA でも、時に高いバックグラウンドを示す血清は存在したものの、DNA を加えない反応溶液をプランクに置くことで、それを効果的に抑えられることも確認できた。

この方法で、問題となる点は、リジン側鎖のピオチン化が自己免疫エピトープに及ぼす影響の可能性である。残念なことにアミノ酸配列内の、どのリジンにピオチンがどのくらいラベルされるかという点については不明と言わざるを得ない。しかし、今のところ、gold standard として行われている細胞抽出タンパクを使用した免疫沈降法の結果とも高い一致性を示している。

DM 関連自己抗原の分子量は 100 から 200kDa に多数存在し、類似の分子量を持つものも多く、また抗原によっては使用する細胞での発現量の問題から、従来の免疫沈降法ではその同定が困難な場合も想定される。ELISA は網羅的な解析にはコストがかかるが、特異的な同定法としても秀でた検査法といえる。

悪性腫瘍合併の皮膚筋炎に多く認められる自己抗体として有名な TIF1- や TIF1- は多くの自己抗原に認められる coiled-coil 構造をもつ TRIM タンパクに属している。またある種の DM 関連自己抗原をコードする遺伝子の変異は遺伝性ミオパチーの原因となっている（たとえば脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子は *SMN1* だが、タンパク複合体である SMN は自己抗体のターゲットになっていたり、EJ 抗体の対応抗原の glycine tRNA 合成酵素の遺伝子異常は、やはりある種の脊髄性筋萎縮症や Charcot-Marie-Tooth 病の原因になっている）ことも、遺伝性神経筋疾患と炎症性自己免疫性ミオパチーとの関連を考えると、非常に興味深い。そして、そのタンパク発現が各種組織と比べて筋肉に多く、コードする遺

伝子の変異が遺伝性ミオパチーの原因になっていることが判明している、TRIM32 というタンパクに注目し、それが DM 関連自己抗体のターゲットになっている可能性を考えて、今回の ELISA の系で抗体測定を行った。TRIM32 に対する市販ポリクローナル抗体を用いて、抗 TRIM32 抗体測定のための ELISA の系は確立できたものの、残念ながら、自施設の 100 名を超える皮膚筋炎患者の血清に対する反応性は認められず、TRIM32 は新規の自己抗体同定とは成り得なかった。しかし、皮膚科という特性上、筋炎の乏しい DM 症例が検体に多いことより、今後は検討症例を多発性筋炎(PM)に拡大して検索を続けていきたい。

今回、確立した ELISA の方法は自己免疫疾患の自己抗体検出に幅広く応用が可能であると考えられ、たとえば自己免疫性水疱症でこれまでに対応抗原は判明しているものの、イムノブロットでしか詳細な判定ができなかったものでも、抗原遺伝子さえ入手すれば、極めて迅速にそれら抗体の検索ができる可能性を持つシステムである。今回の発現タンパクは真核生物の転写翻訳系を使用するので、たとえば大腸菌発現系のタンパクでは反応せず、バキュロウイルス等による発現を試みないと検出できない抗原抗体の反応系にも応用できる可能性がある。全身性、臓器特異性を問わず自己抗体の測定系が、容易に入手できなかったり、いまだ確立されていなかったりする疾患において、今回の系はエポックメイキングな実験であると考えている。今後、この系を用いて様々な施設との共同研究も拡充していきたい。

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 7 件)

1. Sawada M, Yokota K, Matsumoto T, Shibata S, Yasue S, Sakakibara A, Kono M, Akiyama M. Proposed classification of longitudinal melanonychia based on clinical and dermoscopic criteria. Int J Dermatol. (in press)
2. Nin-Asai R, Sawada M, Matsumoto T, Saito S, Yokota K, Akiyama M. Therapy-related myelodysplastic syndrome after alkylating agents and platinum-based therapy for malignant melanoma. J Dermatol. 41:178-9,2014.
3. Mori M, Sugiura M, Kono M, Matsumoto T, Sawada M, Yokota K, Yasue S, Shibata S, Sakakibara A, Nakamura S, Tomita Y, Akiyama M. Clinicopathologic analysis of 66 Japanese thin melanomas with metastasis of sentinel or regional lymph node. J Cutan Pathol.

40:1027-34,2013.

4. Kobayashi T, Yokota K, Sawada M, Matsumoto T, Akiyama M. Benefit of skin ultrasound examination in determining the area of inguinal lymph node dissection. J Dermatol. 40:765-6, 2013.
5. Matsumoto T, Yokota K, Sawada M, Sakakibara A, Shibata S, Yasue S, Tomita Y, Yatsuya H, Akiyama M. Postoperative DAV-IFN- therapy does not improve survival rates of stage II and stage III melanoma patients significantly. J Eur Acad Dermatol Venereol. 27:1514-20,2013.
6. 小林 智子, 横田 憲二, 澤田 昌樹, 松本 高明, 秋山 真志. 大腸癌術後フォロ-CTにて発見された腹部脂肪織内非医原性伏針の 1 例. 皮膚科の臨床 56:102-105,2013.
7. 水谷 和広, 榊原 章浩, 横田 憲二, 澤田 昌樹, 松本 高明, 富田 靖, 星野 臣平. 左膝蓋外側に発症した無色素性黒色腫の 1 例. 皮膚科の臨床 54:930-931,2012

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 横田 憲二, 澤田 昌樹, 松本 高明, 秋山 真志. 皮膚悪性黒色腫に対するセンチネルリンパ節生検施行後のリンパ流の変化について検討. 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 (2013 年 8 月 9 日、甲府、山梨県)
2. 長谷川 佳恵, 横田 憲二, 河野 通浩, 澤田 昌樹, 松本 高明, 秋山 真志. 臀部粉瘤より発生した有棘細胞癌の一例. 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 (2013 年 8 月 9 日、甲府、山梨県)
3. 澤田 昌樹, 横田 憲二, 松本 高明, 秋山 真志. 巨大脂腺上皮腫の 1 例. 第 76 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 (2012 年 9 月 29 日、札幌、北海道)
4. 澤田 昌樹, 杉浦 一充, 横田 憲二, 松本 高明, 武市 拓也, 長坂 徹郎, 片野 晴隆, 秋山 真志. メルケル細胞癌の 3 例. 第 111 回日本皮膚科学会総会(2012 年 6 月 2 日、京都、京都府)
5. Sawada M, Yokota K, Matsumoto T, Shibata S, Yasue S, Sakakibara A, Kono M, Akiyama M. Longitudinal melanonychia in children. 3rd World congress of dermoscopy. (2012 年 5 月 17 日~19 日、Brisbane、オーストラリア)

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤田 昌樹 (Sawada Masaki)

研究者番号 : 80467315

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし