

等に対応するための指針」の中の第二群試料等提供者を対象とする。同審議会の手引きに沿って、1) 遺伝子の分析を行うこと、2) 研究協力の任意性と撤回の自由、3) 研究目的、4) 研究方法、5) 研究計画書等の開示試料提供者にもたらされる利益および不利益、6) 個人情報保護、7) 遺伝子解析結果の開示、8) 研究成果の公表、9) 研究から生じる知的財産権の帰属、10) 遺伝子解析研究終了後の試料等の取扱の方針、11) 費用負担に関する事項、12) 遺伝カウンセリングの体制などの点を具体的に説明し、同意を得た。また、患者の個人情報が所属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益も被らない事を明確にした。

### C. 結果

①末梢血リンパ球上P糖蛋白質は健常人で発現せず、SLEで高頻度に高発現した。②P糖蛋白質の発現率はSLE活動性判定基準による活動期症例で有意に高度で、SLEDAIと正相関した。③ステロイド薬0.5mg/kg以上に不応性の活動期症例では、P糖蛋白質発現分子数は著明高値を示し、リンパ球細胞内ステロイド濃度は著明に低下し、P糖蛋白質発現量と逆相関した。④正常リンパ球は、IL-2刺激によりMDR1転写因子YB-1の核内移行、MDR1転写、リンパ球上P糖蛋白質発現及び細胞内ステロイド濃度の低下が誘導された。⑤活性化リンパ球や不応性SLE患者リンパ球をシクロスポリンやPSC833等のP糖蛋白質拮抗薬で前処理すると、細胞内ステロイド濃度は回復した。⑥ステロイド不応性SLEでは、既存のステロイド薬治療では制御不十分で、ステロイドパルス療法、シクロホスファミドパルス療法(IV-CY)、シクロスポリンなどの免疫抑制強化療法にてP糖蛋白質発現は有意に低下し、細胞内ステロイド濃度の回復、治療反応性の回復と臨床症状改善が得られた。⑦P糖蛋白質高発現を示すステロイド耐性症例では、低容量のシクロスポリンにて疾患活動性制御とステロイド減量が可能であった。

### D. 考察

薬剤抵抗性は、疾患活動性が高いために治療に反応しない薬剤不応性と、長期間の薬剤投与による薬剤耐性(二次無効)に大別される。昨年度までは、SLEの治療耐性獲得には、長期薬剤連用によるリンパ球のP糖蛋白質の発現誘導が関与する事を報告した。一方、今年度は、疾患活動性が高いために薬剤不応性を示す難治性のSLE症例に於いても、リンパ球のP糖蛋白質の発現誘導を認め、P糖蛋白質発現率はSLEDAIなどの疾患活動性指数と相関し、SLE患者リンパ球上のP糖蛋白質の発現強度は、

プレドニゾロン(PSL)0.5mg/kg以上の治療に対して低反応性のSLE症例では高反応群に比べ有意に高度であった。

その機序として、活性化リンパ球から産生されるIL-2やIL-4等によって、MDR-1の転写、さらに、P糖蛋白質の発現が誘導される事が解明され、さらに、カルシニューリン拮抗作用を介する免疫抑制薬であるシクロスポリンやタクロリムスの有するP糖蛋白質拮抗阻害作用を介して、P糖蛋白質を介する薬剤排出が阻害される事を認めた。実際、P糖蛋白質の過剰発現を呈する活動期SLE症例では、既存のステロイド薬治療では制御不十分で、免疫抑制強化療法を要し、疾患活動性の改善に伴いP糖蛋白質の発現は健常人レベルにまで低下し、治療反応性が回復した。

即ち、SLE患者リンパ球のP糖蛋白質の発現の検索により、難治性(薬剤不応性)症例の識別が可能であり、IV-CYや免疫抑制薬、更には新規治療法の適応評価に於いて有用であり、さらに、P糖蛋白質特異的拮抗薬による不応性解除によるテーラーメイド医療の実践の可能性が示された。

### E. 結論

薬剤抵抗性は、長期間の薬剤投与により齎される薬剤耐性(二次無効)、疾患活動性が高いために薬剤に反応しない薬剤不応性に大別される。SLE患者リンパ球では、P糖蛋白質が発現増強し、細胞内薬物濃度が低下して薬物抵抗性の原因となり、IL-2などによる活性化によるMDR-1転写誘導がその機序として考えられた。リンパ球のP糖蛋白質の発現が、薬剤抵抗性の臨床的指標として普及すれば、SLEの治療のアルゴリズムに於いて、P糖蛋白質が高発現する薬剤不応性の症例に対しては強化療法(ステロイドパルス療法や生物学的製剤)、薬剤耐性の症例にはP糖蛋白質拮抗薬(シクロスポリンなど)の併用療法などが推奨されるはずで、薬剤抵抗性の観点からのテーラーメイド医療の具現化を可能とするものである。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tokunaga M, Tsujimura S, Nakatsuka K, Adachi T, Tanaka Y. Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in patients with connective tissue diseases: Reevaluation of clinical features of *P. carinii* pneumonia in rheumatic diseases.

- Rheumatology* (2004) **43**, 479-485
2. Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Fibroblast growth factor-2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* (2004) **50**, 2450-2458
  3. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tsukada J, Kohno K, Tanaka Y. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells* (2004) **9**, 1265-1273
  4. Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* (2005) **44**: 176-182
  5. Tsujimura S, Saito K, Tokunaga M, Nakatsuka K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Overcoming treatment unresponsiveness mediated by P-glycoprotein overexpression on lymphocytes in refractory active systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* (2005) **15**: 28-32
  6. Nakayamada S, Kurose K, Saito K, Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (in press)
  7. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (in press)
  8. 田中良哉. SLE一病態に応じた急性期治療と維持治療の実際. *Medical Practice* (2003) **20**, 568-576
  9. 田中良哉. 全身性エリテマトーデス. *今月の治療* (2003) **11**, 1238-1245
  10. 田中良哉. 生物製剤の使い方. *Mebio* (2003) **20**, 46-52
  11. 田中良哉. リウマチ・膠原病. *内科*(2003) **92**, 1143-1148
  12. 田中良哉. 免疫学的生物製剤をいかに膠原病に適応するか. *Molecular Medicine* (2004) **41**, 204-209
  13. 田中良哉. CD20 を標的とした SLE 等の自己免疫疾患の分子治療. *医学のあゆみ* (2004) **208**, 349-354
  14. 辻村静代, 田中良哉. 多剤耐性遺伝子を標的とする新規治療. *リウマチ科* (2004) **31**, 55-61
  15. 辻村静代, 齋藤和義, 河野公俊, 田中良哉. SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御. *臨床免疫*(2004)**42**, 442-447
  16. 田中良哉, 辻村静代. P-糖蛋白質に対するシクロスポリンの作用: 薬剤抵抗性の克服. *医薬ジャーナル*(2004)**40**, 178-182
- ## 2. 学会発表
1. 田中良哉. 生物学的製剤. 第48回日本リウマチ学会総会学術集会(シンポジウム)岡山 平成16年4月
  2. 田中良哉. B細胞を標的とした治療. 第16回日本アレルギー学会春季臨床大会(シンポジウム)前橋 平成16年5月
  3. Tsujimura S, Saito K, Azuma T, Nakayamada S, Nakano K, Tsukada J, Tanaka Y. Clinical relevance of Characteristically High Expression of P-glycoprotein on Peripheral Lymphocytes to Steroid-Resistance in Refractory SLE Patients The 68<sup>th</sup> National Meeting of American college of Rheumatology, San Antonio. 平成16年10月
  4. Tanaka Y, Tokunaga M, Fujii K, Nawata M, Tsujimura S, Nakayamada S, Saito K. A pilot study of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus: relevance of quantity and quality reduction of B cells to clinical efficacy. The 68<sup>th</sup> National Meeting of American college of Rheumatology, San Antonio. 平成16年10月
  5. 田中良哉. SLE の治療の進歩: 新規生物学的製剤の可能性. 第54回日本アレルギー学会総会(シンポジウム)横浜. 平成16年11月
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

膠原病における難治性病態に関連する因子の検討

分担研究者 橋本 博史 所属施設 順天堂大学膠原病内科

**研究要旨**

難治性病と関連のあるステロイド治療反応性について、グルココルチコイド受容体 (GR) 多型とステロイド治療抵抗性の関連の解析を行った。検出された SNPs 及びハプロタイプと SLE の病態との関連が認められたが、ステロイド反応性との関連性は見出せなかった。

**A.研究目的**

GR 遺伝子多型と SLE 患者のステロイド治療反応性との関連を解明するために、グルココルチコイド受容体 (GR) 遺伝子多型について解析をおこない、検出された多型とステロイド感受性との関連について詳細に検討する。

**B.研究方法**

SLE 患者 (165 人) 及び健常人 (52 人) のゲノム DNA を用いて、GR 遺伝子全 coding 領域 (一部 intron も含む) おいて direct sequence 法により遺伝子多型解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における DNA 解析については、その正当性については当大学倫理委員会の諮問をうけ受諾されている。

**C.研究結果**

1, SLE 患者及び健常人において、GR 遺伝子の全 coding 領域 (一部 intron も含む) において、6 箇所の SNPs (Exon4 箇所、intron2 箇所) を検出した (図.1)。2, 検出された SNPs の発現頻度は、SLE 患者と健常

人において、有意差を認めなかった (表.1)。3, 抗 Sm 抗体陽性 SLE 患者に有意に発現頻度が高い genotype (IVS4-16G>T の GT genotype、c.21 66 C>T の CT genotype) を認めた (表.2)。4, ステロイド感受性と関連のある SNPs は認められなかった。5, Major Haplotype01 以外の Haplotype frequency が正常人と比べて SLE 患者で有意に高かった (表.3)。6, Major Haplotype01 以外の Haplotype をもつ SLE 患者では、Major Haplotype01 をもつ SLE 患者と比べ抗 Sm 抗体陽性率及び腎症の合併例が有意に高かった (表.4)。7, ステロイド感受性と関連のある Haplotype は認められなかった (図.2)。

**D.考察**

SLE 患者において抗 Sm 抗体、腎炎と関連のある SNPs を検出したが、ステロイド感受性と関連のある SNPs は検出されなかった。検出された SNPs の GR 蛋白発現及び、機能に対する影響について今後解析が必要である。また、GR 多型とステロイド感受性との関連について、promotor 領域について解析を行う予定である。

## E. 結論

GRの全coding領域(一部intronも含む)で6箇所のSNPsを検出したがステロイド感受性との関連性は認められなかった。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1, Murashima A, Fukazawa T, Hirashima M, Takasaki Y, Oonishi M, Nijima S, Yamashiro Y, Yamataka A, Miyano T, Hashimoto H. Long term prognosis of children born to lupus patients. *Ann rheum dis.*, 63(1): 50-53, 2004

2, Hirashima M, Fukazawa T, Abe K, Morita Y, Kusaoi M, Hashimoto H. Expression and activity analyses of CTLA4 in peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *Lupus.*, 13, 24-31, 2004

3, Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Ohashi J, Suzuki T, Kyogoku C, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Betty P. Tsao, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with FCGR2B. *Hum. Mol. Genet.*, 13(23): 2907-2917

### 学会発表

The Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphism in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

Toru Fukazawa, Mika Hirashima, Yuko Morita, Makio Kusaoi, Hiroshi Hashimoto  
リウマチ, 43, 255, 2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

論文投稿中

図.1 検出されたGR多型

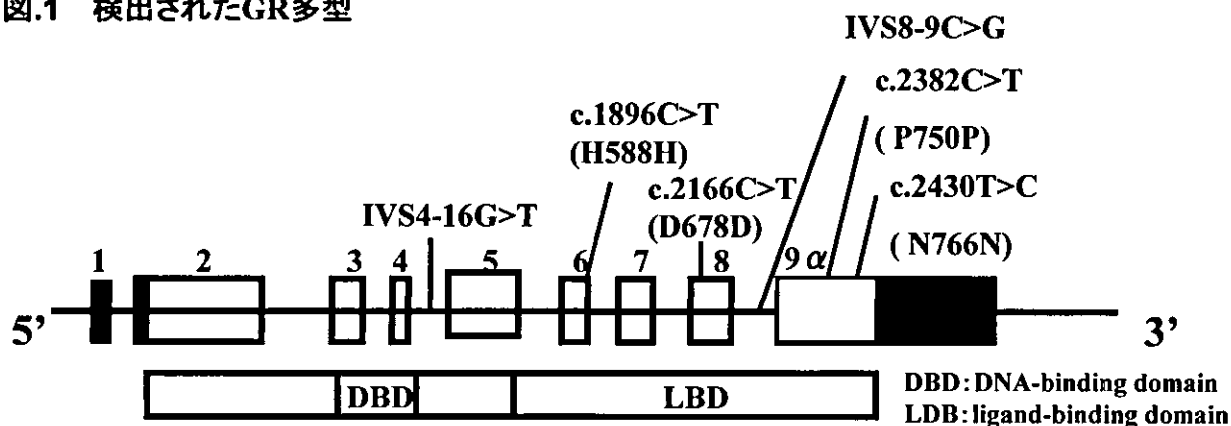


表.1 Genotype and allele frequencies in SLE patients and controls.

		Genotype frequency(%)			Allele frequency(%)		95%CI	P
		SLE(n=165)	control(n=52)		SLE	Control		
IVS4-16G>T	G/G	135(81.8)	48(92.3)	G	300(90.9)	100(96.2)	0.97-8.1	NS
	G/T	30(18.2)	4(7.7)	T	30(9.1)	4(3.8)		
c.1896C>T (H588H)	C/C	138(83.6)	48(92.3)	C	303(91.8)	100(96.2)	0.85-7.29	NS
	C/T	27(16.4)	4(7.7)	T	27(8.2)	4(3.8)		
c.2166C>T (D678D)	C/C	139(84.2)	48(92.3)	C	304(92.1)	100(96.2)	0.81-6.99	NS
	C/T	26(15.8)	4(7.7)	T	26(7.9)	4(3.8)		
IVS8-9C>T	C/C	161(97.6)	52(100)	C	326(98.8)	104(100)		
	C/T	4(2.4)	0(0.0)	T	4(1.2)	0(0.0)		
c.2382C>T (P750P)	C/C	161(97.6)	52(100)	C	326(98.8)	104(100)		
	C/G	4(2.4)	0(0.0)	G	4(1.2)	0(0.0)		
c.2430T>C (N766N)	T/T	137(83.0)	48(92.3)	T	302(91.5)	100(96.2)	0.89-7.60	NS
	T/C	28(17.0)	4(7.7)	C	28(8.5)	4(3.8)		

95%CI=95% confidence interval.

表.2 IVS4-16G>T and c.2166C>T genotype in SLE patients with and without anti-Sm antibodies

Genotype	anti-Sm antibody	
	Positive (n=28)	negative (n=130)
IVS4-16G>T	G/G	19
	G/T	9 a
c.2166C>T (D678D)	C/C	116
	C/T	14

a,b P=0.0136(anti-Sm Ab positive VS anti-Sm Ab negative)

Numbers in parentheses indicate the percentage

表.3 Estimated GR haplotype frequencies in patients with SLE and controls

	Position						Frequency(%)	
	IVS4-16	1896	2166	IVS8-9	2382	2430	SLE	control
GR.01	G	C	C	C	C	T	78.2	92.3
GR.02	T	T	T	C	C	C	12.7	7.7
GR.03	T	C	C	G	T	T	2.4	
GR.04	G	C	T	C	C	T	1.8	
GR.05	T	T	C	C	C	C	1.8	
GR.06	G	T	C	C	C	C	0.6	
GR.07	G	C	C	C	C	C	0.6	
GR.08	T	T	T	C	C	T	0.6	
GR.09	T	C	C	C	C	C	0.6	
GR.10	G	T	T	C	C	C	0.6	

表.4 Comparison of the frequency of the clinical characteristics between GR haplotypes

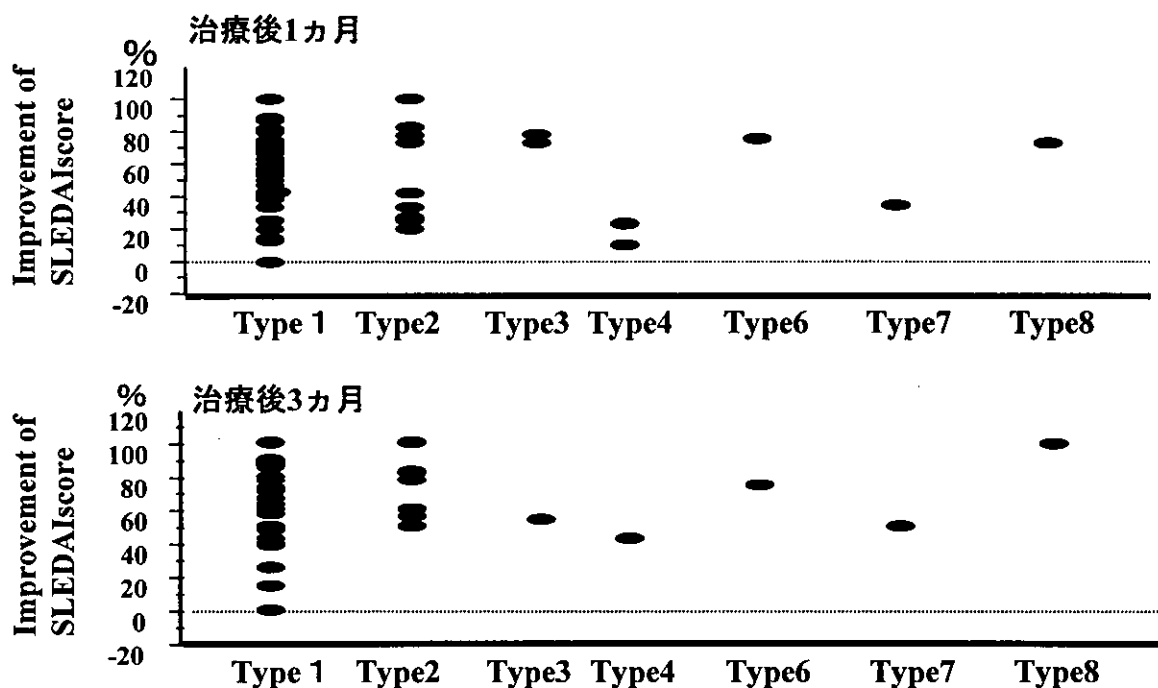
	anti-Sm antibody	
	Positive (n=28)	negative (n=130)
Haplotype01	17	109
Haplotype02~10	11 <sup>a</sup>	21

	Nephritis	
	Positive (n=97)	negative (n=61)
Haplotype01	72	54
Haplotype02~10	25 <sup>b</sup>	7

<sup>a</sup> P=0.0057(anti-Sm Ab positive VS anti-Sm Ab negative), <sup>b</sup> P=0.02958 (Nephritis positive VS Nephritis negative)  
 Numbers in parentheses indicate the percentage

図.2 Distribution of improvement of SLEDAI score(%) in GR haplotypes



## 腎障害性抗 DNA 抗体の惹起因子に関する研究

分担研究者

佐々木 毅 東北大学大学院医学系研究科免疫・血液病制御学 教授  
平林 泰彦 東北大学大学院医学系研究科免疫・血液病制御学 講師

### 研究要旨

腎障害性抗 DNA 抗体を惹起する因子の同定は SLE の病因解明および原因療法開発に不可欠である。活動期ループス腎炎患者由来のヒトモノクロナル抗 DNA 抗体 O-81 に結合する蛋白として小胞体ストレス応答性蛋白 Herp を同定した。正常マウスに Herp を免疫すると抗 ssDNA および抗 dsDNA 抗体が産生され、腎糸球体に IgG 免疫複合体の沈着を認めた。また、抗 Herp 抗体は SLE 患者のみならず正常人血清にも検出されたが、DNA 結合能を有する抗 Herp 抗体は SLE でのみ認められた。今後、Herp 上にある DNA を mimic するエピトープを認識させる SLE 特異的因子の同定が重要と考えられた。

### A. 研究目的

抗 DNA 抗体はループス腎炎の病態形成に直接的に関与する。しかし、DNA 自身は免疫原性に乏しいため DNA が抗 DNA 抗体の直接的な産生誘導抗原とは考えにくく、その産生機序は不明である。我々は活動期ループス腎炎患者末梢血 B リンパ球よりヒトモノクロナル抗 DNA 抗体産生クローン O-81 を樹立し、O-81 抗体のイディオタイプ (O-81 Id) が WHOIV 型ループス腎炎の腎糸球体や血中免疫複合体に検出されることを示してきた。すなわち O-81 Id(+)抗 DNA 抗体はループス腎炎での腎障害性抗 DNA 抗体の一つと考えられる。これに基づき O-81 抗体をプローブとして、これに特異的に結合する DNA 以外の因子を探索し、抗 DNA 抗体産生との関連を追求することにより抗 DNA 抗体の産生機序を解明することを目的とした。

### B. 研究方法

#### (1) 細胞培養と抗体精製

活動性ループス腎炎患者の末梢血リンパ球由来ヒト IgM 型抗 DNA 抗体産生クローン O81 (Sasaki, T., F. Endo, M. Mikami, Y. Sekiguchi, K. Tada, Y. Ono, N. Ishida and Y. Yoshinaga. 1984. Establishment of human monoclonal anti-DNA producing cell lines. J. Immunol. Methods 72:156.)を、20% 胎児ウシ血清、200 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン 含有 RPMI1640 培地を用いて培養した。培養上清からプロテイン L

(Pierce)カラムを用いて IgM 型抗 DNA 抗体 O81 を精製した。

#### (2) O81 単鎖抗体(O81scFv)の作成

既に pUC19 ベクターにクローニングしてある O81 クローンの V<sub>H</sub> および V<sub>K</sub> 遺伝子を用いた (O81V<sub>H</sub>pUC19 および O81V<sub>K</sub>pUC19) (Hirabayashi, Y., Y. Munakata, Y. Sasaki, T. Sano. 1992. Variable regions of a human anti-DNA antibody O-81 possessing lupus nephritis-associated idiomotype Nucl. Acid. Res. 20:2601)。まず、O81V<sub>K</sub>pUC19 を基質として、O81KFR1HindNot(5'-GAAAAG CTTGCGGCCGCTGATGTTGTGATGACTCAG-3') と O81KFR4linkerBam(5'-ACC GGATCCTCCACCACCACTTCCACCTCCACCTCGTTTAATCTCCAGTCGTG-3')の二つのプライマーを用いて PCR 法にて V<sub>K</sub> 遺伝子を増幅した。増幅された DNA 断片を制限酵素 HindIII と BamHI で切断し、これを PinPoint™Xa-1 vector (Promega) のマルチクローニングサイト (MCS)の同じ制限酵素部位に挿入した (O81VKPinPointXa1)。次に、O81V<sub>H</sub>pUC19V<sub>H</sub> を基質として、O81HFR1linkerBgl(5'-GGAAGATCTGTGGAGGTGGATCAGAGGTGCAGCTGGTGGAG-3') と O81HFR4Bam(5'-GTTGGAT CCTTATGAGGAGACGGTGACCAG-3')の二つのプライマーを用いて PCR 法に

て O81 V<sub>H</sub> 遺伝子を増幅した。増幅された DNA 断片を制限酵素 BglII と BamHI I で切断し、O81VKPinPointXa1 の BamHI サイトに挿入した。(O81scFvPinPointXa1)。この O81scFvPinPointXa1 にて大腸菌 JM109 株を形質転換し、LB 培地にて大量培養した。PinPoint™ Xa Protein Purification System (Promega) を用いて産生された O81scFv を精製した。

(3) cDNA ライブラリー作成と大腸菌を用いたツーハイブリッド法 (図 2)

O81scFvPinPointXa1 を制限酵素 NotI と BamHI にて切断し、BacterioMatch™ Two-Hybrid System (Stratagene) の pBT ベクターの MCS の同じ制限酵素部位に挿入した (O81scFvpBT)。また、同システムの pTRG ベクターに SfiI サイトを導入したものを作成した (pTRG-SfiI)。活動性ループス腎炎患者より同意を得た上で末梢血を採取し、Ficoll-Paque™ Plus (Pharmacia) を用いて単核球を分離した。これより Micro Fast Track mRNA isolation kit (Invitrogen) を用いて mRNA を調製した。この mRNA を基質として SMART™ cDNA library construction kit (Clontech) を用いプロトコールに従って double-strand cDNA (ds cDNA) を調製した。この ds cDNA を制限酵素 SfiI で切断し、pTRG-SfiI ベクターの SfiI サイトに挿入したのち、XL1-Blue MRF' Kan Library Pack Competent 大腸菌株を形質転換した。これを NZY 培地で培養後、プラスミド DNA を抽出し cDNA ライブラリーを作成した。この cDNA ライブラリーと O81scFvpBT とを同時に BacterioMatch two-hybrid system reporter 大腸菌株に加えて形質転換し、BacterioMatch™ Two-Hybrid System のプロトコールに従い O81scFvpBT に結合する可能性のあるクローンのスクリーニングを行った。

(4) リコンビナント Herp 蛋白の作成  
ツーハイブリッド法によるスクリーニングで得られたクローンより Herp cDNA を分離し、制限酵素 SfiI で切断しインサート DNA を精製した。これを pGEX6P1 ベクターに挿入し、大腸菌 BL21 株を形質転換した。プロトコールに従って融合蛋白を発現させ、B-PER bacterial protein extraction reagent (Pierce) を用いて大腸菌蛋白を抽出し、GST

purification module (Pharmacia) を用いて精製した。さらに Preission protease (Pharmacia) を用いて GST 部分を除去し、高純度のリコンビナント Herp 蛋白 (rHerp) を作成した。

(5) ELISA

まず、適正な濃度の抗原を Immulon 2 プレート (Dynatech) に一晩 4℃ で結合させた。次に 3% ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液にてブロッキングを行った後、一次抗体を反応させた。ついでペルオキシダーゼ結合二次抗体を加え、TMB 発色試薬にて検出した。

(6) マウス

6 週令雌の BALB/c マウスにリコンビナント Herp あるいは Hen Egg Lysozyme を腹腔内投与した。day 0 と 14 には Ribi アジュバントと共に 100µg を、day 28 にはアジュバントなしで 50µg を投与し、day 35 でサクリファイし血液と腎を採取した。

(7) 腎組織染色

採取した腎臓の凍結切片を作成し、ブロッキングの後、Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG · FITC を加えた。洗浄の後、蛍光顕微鏡で観察した。

(8) 血清からの抗 Herp 抗体の精製

プロテイン A/G セファロース (Pierce) にてまず血清より IgG を精製し、次に前もって作成した rHerp 固相化カラムを用いて Herp に結合する IgG (抗 Herp 抗体) を精製した。

## C. 研究結果

(1) 大腸菌の PinPoint™ 蛋白発現システムを用いて作成した O81scFv は ssDNA およびマウスモノクローナル抗 O81 イディオタイプ抗体 D1E2 への結合を示し、抗原結合部位およびイディオタイプはオリジナルの O81 抗体を良く反映していると考えられた。

(2) 活動性ループス腎炎患者の末梢白血球由来の cDNA ライブラリーを pTRGSfiI ベクター上に作成し、O81scFvpBT に結合する蛋白をコードする cDNA を BacterioMatch™ Two-Hybrid System を用いて数段階のスクリーニングを行い (図 1)、最終的に 1 つのクローンを得た。この cDNA の塩基



配列を決定したところ、homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible protein (Herp) 遺伝子 (NCBI#AB034990) に一致した。

(3) リコンビナント Herp 蛋白 (rHerp) を作成し、これを抗原として、オリジナルの O81 抗体を用いて ELISA を行ったところ結合が示唆された。更にその結合に対して ssDNA および rHerp による競合阻害実験を行い競合阻害が生じる事を確認した (図 2)。この事より O-81 抗体は Herp に特異的に結合すると考えられた。

(4) rHerp を免疫したマウスでは、抗 ssDNA 抗体のみならず抗 dsDNA 抗体の産生が見られた。Hen Egg Lysozyme を免疫したコントロールマウスの血清は Herp への結合性も示さず、また、抗 DNA 抗体の産生も見られなかった (図 3)。腎臓組織標本を抗マウス IgG 抗体で免疫染色すると rHerp を免疫したマウスでは糸球体に IgG 免疫複合体の沈着が認められた (図 4)。

(5) SLE 患者のみならず正常人からも Herp 結合性 IgG (抗 Herp 抗体) が得られた。しかし、正常人由来抗 Herp 抗体は DNA への結合性を示さなかったのに対し、SLE 由来抗 Herp 抗体は DNA への結合性を示した (図 5)。

#### D. 考察

腎障害性抗 DNA 抗体に特異的に結合しうる DNA 以外の抗原として小胞体ストレス応答性蛋白 Herp を同定した。正常マウスに Herp を免疫すると抗 ssDNA 抗体のみならず抗 dsDNA 抗体の産生がみられ、腎糸球体に IgG の沈着が見られたことより、Herp には DNA を mimic する構造があり、自己寛容の破綻と組織障害の惹起に Herp が関与しうる可能性が示唆された。

抗 Herp 抗体は SLE 患者のみならず正常人にも検出されるが、正常人由来抗 Herp 抗体に DNA 結合性は無い。一方、SLE 患者由来抗 Herp 抗体は DNA 結合性を示したことより、Herp 上のエピトープのうち DNA を mimic するものは SLE 患者でのみ認識されるのではないかと考えられた。

今後、DNA を mimic する Herp 上のエ

ピトープのペプチド配列を同定することにより、その配列を有するウイルスなどの非自己抗原の探索が可能となる。すなわち、この DNA を mimic するエピトープを認識させる因子を追求することにより抗 DNA 抗体産生の trigger に到達することが可能になると思われる。

#### E. 結論

SLE における臓器障害性抗 DNA 抗体は DNA 以外の蛋白とも交叉反応し、更に、その蛋白が抗 DNA 抗体の産生に関与する可能性が示唆された。DNA を mimic するエピトープを持ち、かつ、抗 DNA 抗体産生を惹起できる自己抗原の報告はこれまでなく、本研究を進展させることによりヒト自己抗体の発現機序、すなわち自己寛容の破綻機序を明らかにしうる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) T. Fujiwara, H. Harigae, J. Kameoka, H. Yokoyama, S. Takahashi, Y. Tomiya, M. Yamada, K. Ishizawa, M. Imaizumi, and T. Sasaki. A case of familial thrombocytosis: possible role of altered thrombopoietin production. Am. J. Hematol. 76: 395-397, 2004
- 2) T. Fujiwara, R. Ichinohasama, I. Miura, T. Sugawara, H. Harigae, H. Yokoyama, S. Takahashi, Y. Tomiya, M. Yamada, K. Ishizawa, J. Kameoka, and T. Sasaki. Primary effusion lymphoma of the pericardial cavity carrying t(1;22)(q21;q11) and t(14;17)(q32;q23). Cancer Genet. Cytogenet. 156: 49-53, 2005
- 3) T. Fujiwara, M. Yamada, K. Miyamura, Y. Tomiya, K. Ishizawa, H. Harigae, J. Kameoka, M. Minegishi, S. Tsuchiya, and T. Sasaki. Fludarabine- and cyclophosphamide-based nonmyeloablative conditioning regimen for transplantation of chronic granulomatous disease: possible correlation with prolonged pure red cell aplasia. Int. J. Hematol. 79: 293-297, 2004

- 4) T. Funato, H. Harigae, S. Abe, and T. Sasaki. Assessment of drug resistance in acute myeloid leukemia. Expert Rev Mol Diagn 4: 705-713, 2004
- 5) T. Funato, S. Tsukamoto, and T. Sasaki. Laboratory testing for rheumatic diseases. Rinsho Byori. 51: 225-230, 2003
- 6) H. Harigae, O. Nakajima, N. Suwabe, H. Yokoyama, K. Furuyama, T. Sasaki, M. Kaku, M. Yamamoto, and S. Sassa. Aberrant iron accumulation and oxidized status of erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase (ALAS2)-deficient definitive erythroblasts. Blood 101: 1188-1193, 2003
- 7) Y. Hirabayashi, T. Ishii, T. Kodera, H. Fujii, Y. Munakata, and T. Sasaki. Acute cytomegalovirus infection and transient carotid intimal-medial thickening in a young, otherwise healthy woman. J. Clin. Microbiol. 41: 3978-3980, 2003
- 8) A. Hoshino, T. Funato, Y. Munakata, T. Ishii, S. Abe, K. Ishizawa, R. Ichinohasama, J. Kameoka, K. Meguro, and T. Sasaki. Detection of clone-specific immunoglobulin heavy chain genes in the bone marrow of B-cell-lineage lymphoma after treatment. Tohoku J. Exp. Med. 203: 155-164, 2004
- 9) S. Ine, M. Yamada, K. Miyamura, and T. Sasaki. [Immunological mechanisms of graft versus tumor effect]. Nippon Rinsho. 61: 1495-1502, 2003
- 10) K.K. Ishii, and T. Sasaki. Human parvovirus B19. Nippon Rinsho. 61 Suppl 3: 608-614, 2003
- 11) Y.M. Lee, J. Fujiwara, Y. Munakata, T. Ishii, A. Sugawara, M. Kaku, S. Kokubun, T. Sasaki, and T. Funato. A mutation of the glucocorticoid receptor gene in patients with systemic lupus erythematosus. Tohoku J. Exp. Med. 203: 69-76, 2004
- 12) T. Miura, H. Yokoyama, N. Minegishi, T. Sasaki, M. Kaku, and H. Harigae. Flow cytometry of GATA transcription factors. Cytometry B Clin Cytom 56: 1-7, 2003
- 13) T. Saito, Y. Munakata, Y. Fu, H. Fujii, T. Kodera, E. Miyagawa, K. Ishii, and T. Sasaki. Evaluation of anti-parvovirus B19 activity in sera by assay using quantitative polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 107: 81-87, 2003
- 14) M. Shimura, Y. Tatehana, K. Yasuda, S. Saito, T. Sasaki, and M. Tamai. Choroiditis in systemic lupus erythematosus: systemic steroid therapy and focal laser treatment. Jpn. J. Ophthalmol. 47: 312-315, 2003
- 15) T. Suzuki, S. Saito, Y. Hirabayashi, H. Harigae, T. Ishii, T. Kodera, H. Fujii, Y. Munakata, and T. Sasaki. Human parvovirus B19 infection during the inactive stage of systemic lupus erythematosus. Internal Medicine 42: 538-540, 2003
- 16) S. Takahashi, H. Harigae, M. Kaku, T. Sasaki, and J.D. Licht. Flt3 mutation activates p21WAF1/CIP1 gene expression through the action of STAT5. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316: 85-92, 2004
- 17) N. Takasawa, Y. Munakata, K.K. Ishii, Y. Takahashi, M. Takahashi, Y. Fu, T. Ishii, H. Fujii, T. Saito, H. Takano, T. Noda, M. Suzuki, M. Nose, S. Zolla-Patzner, and T. Sasaki. Human parvovirus B19 transgenic mice become susceptible to polyarthritis. J. Immunol. 173: 4675-4683, 2004
- 18) Y. Tohmiya, Y. Koide, S. Fujimaki, H. Harigae, T. Funato, M. Kaku, T. Ishii, Y. Munakata, J. Kameoka, and T. Sasaki. Stanniocalcin-1 as a novel marker to detect minimal residual disease of human leukemia. Tohoku J. Exp. Med. 204: 125-133, 2004
- 19) M. Yamada, K. Miyamura, T. Fujiwara, H. Yokoyama, Y. Tomiya, K. Ishizawa, H. Harigae, J. Kameoka, and T. Sasaki. Imatinib mesylate in conjunction with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with Philadelphia chromosome positive leukemias: report of 4 cases. Tohoku

- J. Exp. Med. 204: 79-84, 2004
- 20) H. Yokoyama, H. Harigae, S. Takahashi, J. Kameoka, K. Miyamura, K. Ishizawa, M. Kaku, and T. Sasaki. High expression of YB-1 gene in erythroid cells in patients with refractory anemia. Int. J. Hematol. 78: 213-218, 2003
- 21) H. Yokoyama, H. Harigae, S. Takahashi, S. Takahashi, K. Furuyama, M. Kaku, M. Yamamoto, and T. Sasaki. Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 303: 140-145, 2003
- 22) Y. Hirabayashi, S. Saito, M.W. Takeshita, T. Kodera, Y. Munakata, T. Ishii, H. Fujii, M. Shimura, and T. Sasaki. Mononeuritis multiplex, protein-losing gastroenteropathy, and choroidopathy seen together in a case of systemic lupus erythematosus. Mod. Rheumatol. 13:265-269, 2003.
- 23) 大槻久美, 金澤雅之, 佐々木裕子, 亀岡淳一, 宮村耕一, 佐々木毅, 上月正博. 同種造血幹細胞移植後患者の QOL における Spiritual Well-being の重要性. Quality of Life Journal 5(1):103-110, 2004
- 24) 佐々木毅. 関節リウマチでの QOL. クニシアン 51:(5-6) 606-608, 617-620, 2004
- 25) 佐々木毅. ヒトパルボウイルス B19 と関節リウマチ. 臨床と微生物 31(2): 163-169, 2004
- 26) 佐々木毅. 全身性エリテマトーデス. 内科 93(2): 242-247, 2004
- 27) 宗像靖彦, 佐々木毅. ヒトパルボウイルス B19 と自己免疫疾患. リウマチ科 30(5): 484-489, 2003
- 28) 井根省二, 山田実名美, 宮村耕一, 佐々木毅. 免疫システムと抗腫瘍効果. 日本臨床 61(9): 1495-1502, 2003
- 29) 船渡忠男, 塚本さなえ, 佐々木毅. リウマチ性疾患の検査. 臨床病理 51(3): 225-230, 2003
- 30) 佐々木毅. どんな自己抗体を測定するのか、その意義. 日本医師会雑誌 129(7): 899-903, 2003
- 31) 石井恵子, 佐々木毅. ウイルスの遺伝子学 1 本鎖 DNA ウイルス パルボウイルス科 ヒトパルボウイルス B19. 日本臨床 61(3): 608-614, 2003
2. 学会発表
- 1) Y. Hirabayashi, M. Tada, H. Fujii, T. Kodera, T. Ishii, Y. Munakata, T. Sasaki. Is Endoplasmic Reticulum Stress the Trigger of Anti-DNA Antibody Production? American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting San Antonio U.S.A. 10/16-21, 2004. Arthritis & Rheumatism 50:S205, 2004.
- 2) T. Ishii, Y. Hirabayashi, Y. Munakata, H. Fujii, T. Sasaki. New Approach for an Assessment of Activity in Takayasu Disease by Phased Tracking Ultrasonic Method. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting San Antonio U.S.A. 10/16-21, 2004. Arthritis & Rheumatism 50:S, 2004.
- 3) Y. Munakata, T. Saito, K. Ishii, T. Sasaki. Ku80 Autoantigen Functions as a Receptor for Human Parvovirus B19 Infection and Mediates Its Infection to Immune Cells. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting San Antonio U.S.A. 10/16-21, 2004. Arthritis & Rheumatism 50:S, 2004.
- 4) 周穎哲, 石井智徳, 平林泰彦, 宗像靖彦, 藤井博司, 佐々木毅. 抗 DNA 抗体の細胞内侵入と細胞機能への影響. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌 12/1-3, 2004. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 281, 2004
- 5) 平林泰彦, 多田真知子, 山下雅大, 小寺隆雄, 石井智徳, 宗像靖彦, 佐々木毅. ヒト抗 DNA 抗体 O-81 の認識する自己抗原 Herp による抗 DNA 抗体産生の惹起. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌 12/1-3, 2004. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 281, 2004
- 6) 宗像靖彦, 伊藤貴子, 石井恵子, 佐々木毅. ヒトパルボウイルス B19 と関節リウマチ hypoxia との関連. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌 12/1-3, 2004  
日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 164, 2004
- 7) 伊藤貴子, 宗像靖彦, 石井恵子, 佐々木毅. 免疫系細胞へのヒトパルボウイルス B19 感染:RA 病態との関連. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌

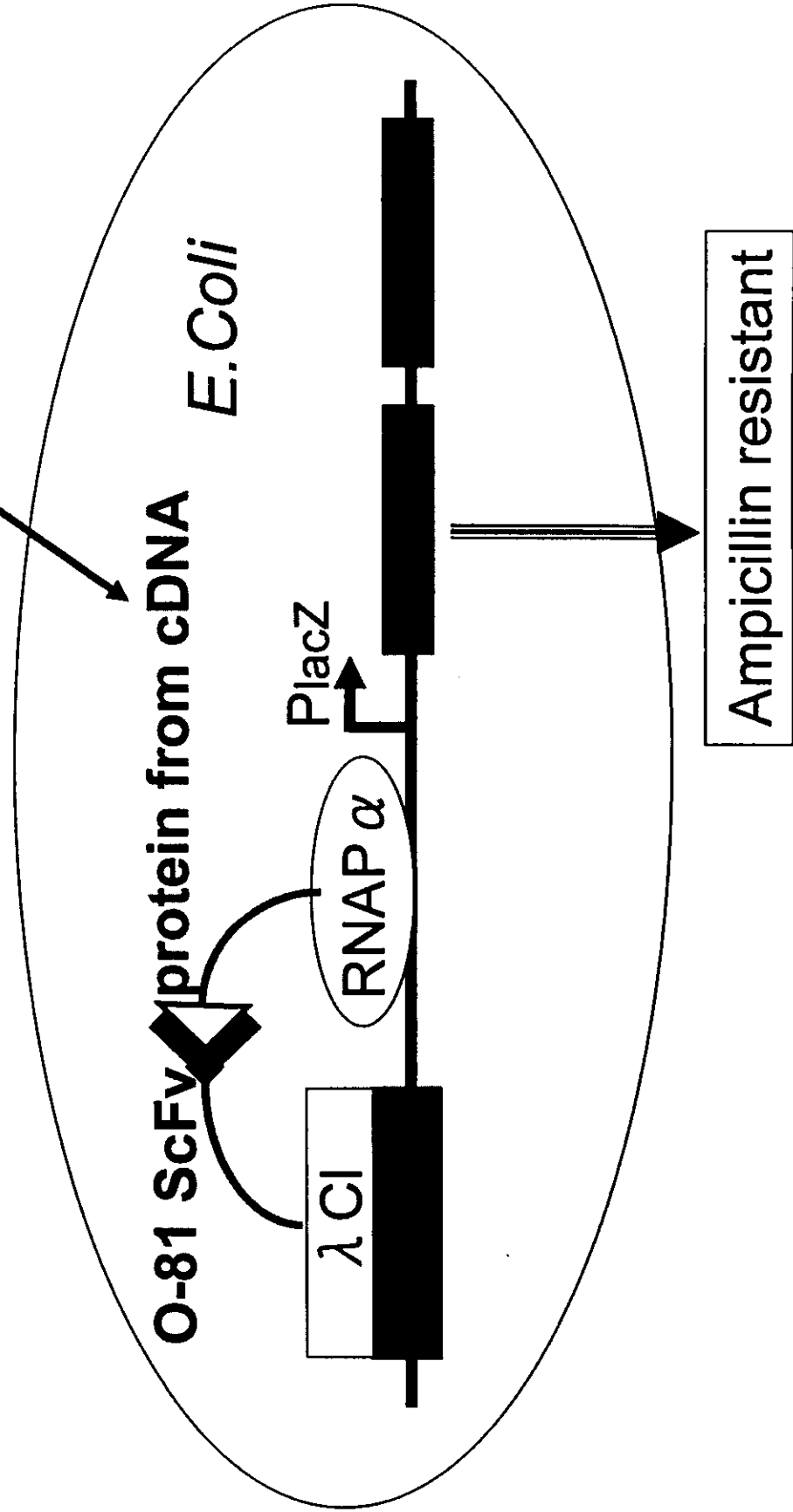
- 12/1-3, 2004. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 157, 2004
- 8) 内山徹, 杜緯, 笹原洋二, 吉成みやこ, 久間木悟, 土屋滋, 峯岸正好, 藤原亨, 山田実名美, 宮村耕一, **佐々木毅**. 骨髓非破壊的前処置により同胞間造血幹細胞移植を施行した慢性肉芽腫症の一例. 第 46 回日本小児血液学会 京都 11/22-23, 2004. 日本小児血液学会雑誌 18(4): 519, 2004
- 9) **平林泰彦, 佐々木毅**. 抗 CD40 抗体及び抗 Ig 抗体共刺激により発現が誘導される新規 PHD フィンガー蛋白. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 福岡 12/8-10, 2003. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33: 310, 2003
- 10) 山本譲司, 亀岡淳一, 小林美津恵, 井根省二, 横山寿行, 遠宮靖雄, 藤原実名美, 石澤賢一, **佐々木毅**. 妊娠合併急性白血病 当施設における 6 例. 第 66 回日本血液学会・第 46 回日本臨床血液学会総会 横浜 9/12-15, 2004. 臨床血液 45(8): 968, 2004
- 11) 藤原亨, 張替秀郎, 高橋伸一郎, 石澤賢一, 亀岡淳一, 賀来満夫, **佐々木毅**. マウス ES 細胞由来赤芽球を用いた赤血球特異的ヘム制御遺伝子の同定. 第 66 回日本血液学会・第 46 回日本臨床血液学会総会 横浜 9/12-15, 2004. 臨床血液 45(8): 936, 2004
- 12) 横山寿行, 張替秀郎, 石澤賢一, 亀岡淳一, 賀来満夫, **佐々木毅**. 再生不良性貧血 CD34 陽性細胞における HOXB4 遺伝子発現の抑制. 第 66 回日本血液学会・第 46 回日本臨床血液学会総会 横浜 9/12-15, 2004. 臨床血液 45(8): 808, 2004
- 13) 関正則, 亀岡淳一, 高橋伸一郎, 張替秀郎, **佐々木毅**. 骨髓間質細胞における Tenascin-C の発現とその赤芽球造血支持能の解析. 第 66 回日本血液学会・第 46 回日本臨床血液学会総会 横浜 9/12-15, 2004. 臨床血液 45(8): 790, 2004
- 14) 高橋伸一郎, 張替秀郎, 石井恵子, 横山寿行, 藤原亨, 石澤賢一, 亀岡淳一, **佐々木毅**, 賀来満夫. Flt3 過剰発現による NF $\kappa$ B 標的遺伝子の発現誘導. 第 66 回日本血液学会・第 46 回日本臨床血液学会総会 横浜 9/12-15, 2004. 臨床血液 45(8): 774, 2004
- 15) 高橋伸一郎, McconnellMelanie, 張替秀郎, **佐々木毅**, 賀来満夫, MelnickAri, LichtJonathan. Flt3 の変異は転写抑制因子の機能を阻害する. 第 66 回日本血液学会・第 46 回日本臨床血液学会総会 横浜 9/12-15, 2004. 臨床血液 45(8): 740, 2004
- 16) 高橋伸一郎, 張替秀郎, 船渡忠男, **佐々木毅**, 賀来満夫. 急性骨髄性白血病における Flt3 変異と p21WAF1/CIP1 高発現との関連の検討. 第 44 回日本臨床化学学会年会 東京 9/3-5, 2004. 臨床化学 33(3): 281, 2004
- 17) 鹿股直子, 岡友美子, 小寺隆雄, 石井智徳, 宗像靖彦, **平林泰彦, 佐々木毅**. 頸動脈エコーが経過観察に有用であった大動脈炎症候群の一例. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山 4/15-17, 2004. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 333, 2004
- 18) 宗像靖彦, 小寺隆雄, 加藤一郎, 石井恵子, **佐々木毅**. 関節リウマチとヒトパルボウイルス B19 マクロファージへの B19 感染. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山 4/15-17, 2004. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 288, 2004
- 19) 石井智徳, 鹿又直子, **平林泰彦**, 宗像靖彦, 小寺隆雄, **佐々木毅**. 大動脈炎症候群における免疫抑制剤の効果の検討. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山 4/15-17, 2004. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 247, 2004
- 20) 小寺隆雄, 岡友美子, 鹿股直子, 石井智徳, 宗像靖彦, **平林泰彦, 佐々木毅**. 自己免疫機序による Heparin-induced thrombocytopenia(HIT)抗体発現と臨床的特徴. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山 4/15-17, 2004. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 246, 2004
- 21) 周穎哲, 石井智徳, **平林泰彦**, 宗像靖彦, 小寺隆雄, 鹿又直子, **佐々木毅**. 抗 DNA 抗体の細胞機能に与える影響の検討. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山 4/15-17, 2004. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 244, 2004
- 22) **平林泰彦**, 鹿股直子, **佐々木毅**. ヒト腎障害性抗 DNA 抗体の対応抗原 Herp 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山 4/15-17, 2004. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 233, 2004.
- 23) 張替秀郎, 藤巻慎一, 高橋伸一郎, 船渡忠男, **佐々木毅**, 賀来満夫. 再生不良性貧血における造血幹細胞特異的遺

- 伝子の発現. 第44回日本臨床化学学会年会 東京 9/3-5, 2004. 臨床化学 33(3): 154, 2004
- 24) 船渡忠男, 李栄茂, 藤原淳子, 宗像靖彦, 石井智徳, 菅原明, 張替秀郎, 賀来満夫, 国分正一, **佐々木毅**. SLEにおけるグルココルチコイド受容体遺伝子の変異解析. 第44回日本臨床化学学会年会 東京 9/3-5, 2004. 臨床化学 33(3): 110, 2004
- 25) 高橋伸一郎, 張替秀郎, 石井恵子, 猪股美津恵, 船渡忠男, **佐々木毅**, 賀来満夫. 急性骨髄性白血病における Flt3 過剰発現とNF $\kappa$ B 経路活性化の関連の検討. 第44回日本臨床化学学会年会 東京 9/3-5, 2004. 臨床化学 33(3): 83, 2004
- 26) 宗像靖彦, 伊藤貴子, **佐々木毅**. FK506 のCD29 関連 T 細胞機能抑制効果. 第25回日本炎症・再生医学会 東京 7/13-14, 2004. 炎症・再生 24(4): 501, 2004
- 27) 宗像靖彦, **佐々木毅**, 水島裕. 関節リウマチ治療におけるCOX II 阻害薬の位置付け メロキシカム, ピロキシカム二重盲検比較試験結果の分析. 第25回日本炎症・再生医学会 東京 7/13-14, 2004. 炎症・再生 24(4): 446, 2004
- 28) 小寺隆雄, 宗像靖彦, **佐々木毅**. ヒトパルボウイルスB19 感染を契機とし関節リウマチへ移行した尋常性乾癬の一例. 第45回日本臨床ウイルス学会 大阪 6/12-13, 2004. 臨床とウイルス 32(2): S63, 2004
- 29) 千葉賢治, 賀来満夫, 石井智徳, **佐々木毅**. 大動脈炎症候群に合併した総頸動脈瘤の1例. 第77回日本超音波医学会学術集会 宇都宮 5/17-19, 2004. 超音波医学 31(3): J205, 2004
- 30) 千葉賢治, 賀来満夫, 石井智徳, **佐々木毅**, 長谷川英之, 金井浩, 小岩喜郎. 位相差トラッキング法を用いた大動脈炎症候群における頸動脈病変の評価. 第77回日本超音波医学会学術集会 宇都宮 5/17-19, 2004. 超音波医学 31(3): J205, 2004
- 31) 石井智徳, 平林泰彦, 宗像靖彦, 小寺隆雄, **佐々木毅**. 大動脈炎症候群診断治療における位相差トラッキングエコー法の有用性の検討. 第101回日本内科学会総会・講演会 大阪 4/7-9, 2004. 日本内科学会雑誌 93: 200, 2004
- 32) 遠宮靖雄, 小出芳夫, 張替秀郎, 亀岡淳一, 石澤賢一, 船渡忠男, 山田実名美, 賀来満夫, **佐々木毅**. 急性白血病患者の微少残存病変マーカーとしてのスタニオカルシン mRNA の有用性の検討. 第101回日本内科学会総会・講演会 大阪 4/7-9, 2004. 日本内科学会雑誌 93: 141, 2004

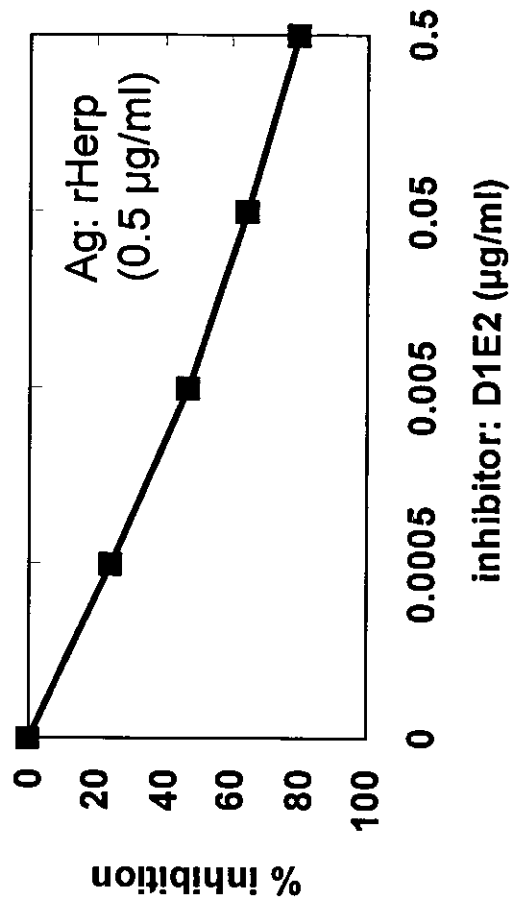
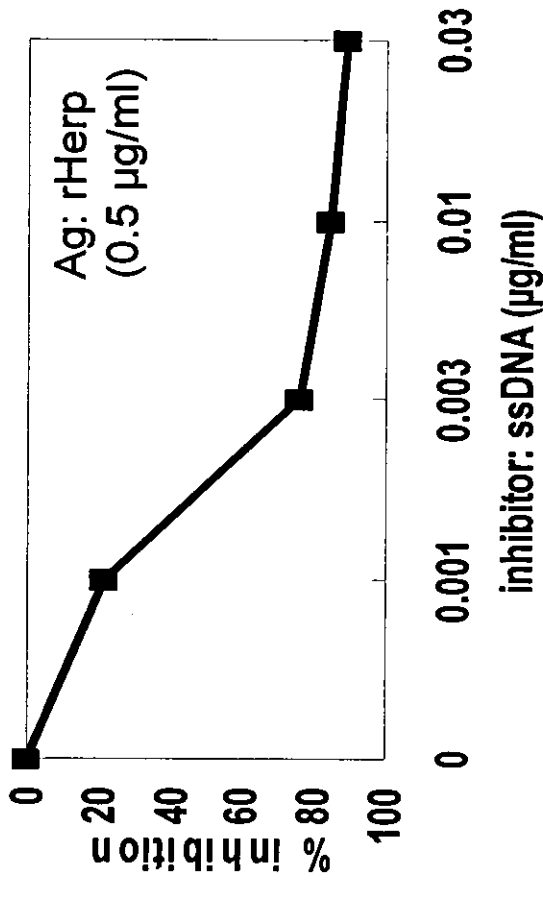
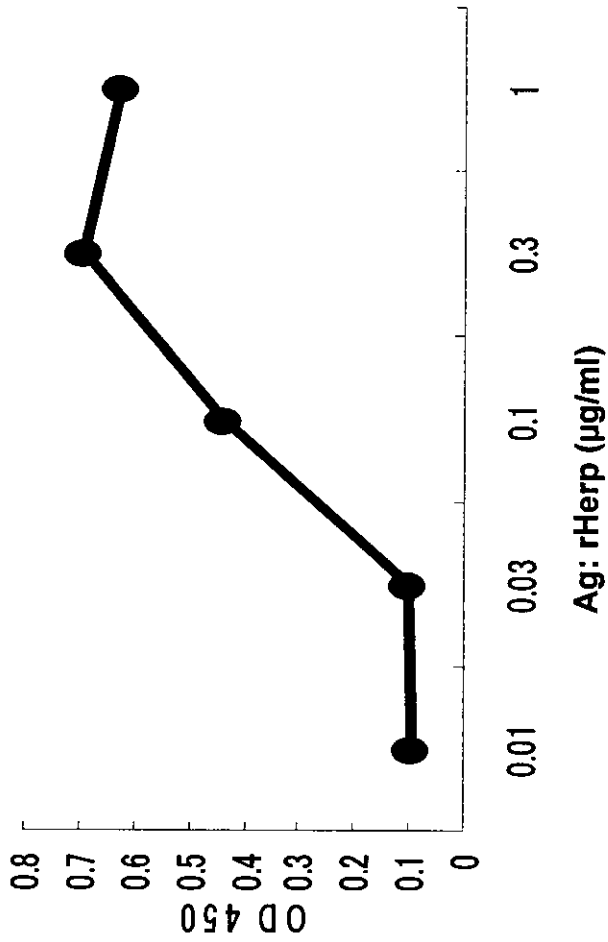
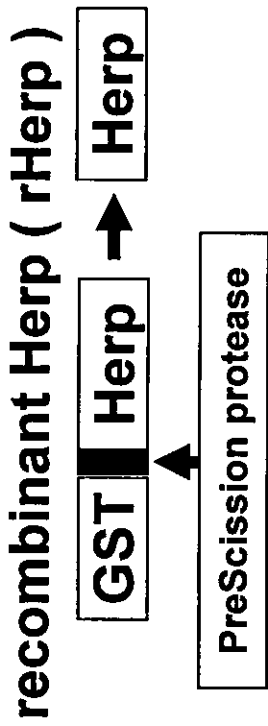
图1

# BacterioMatch™ Two-Hybrid System

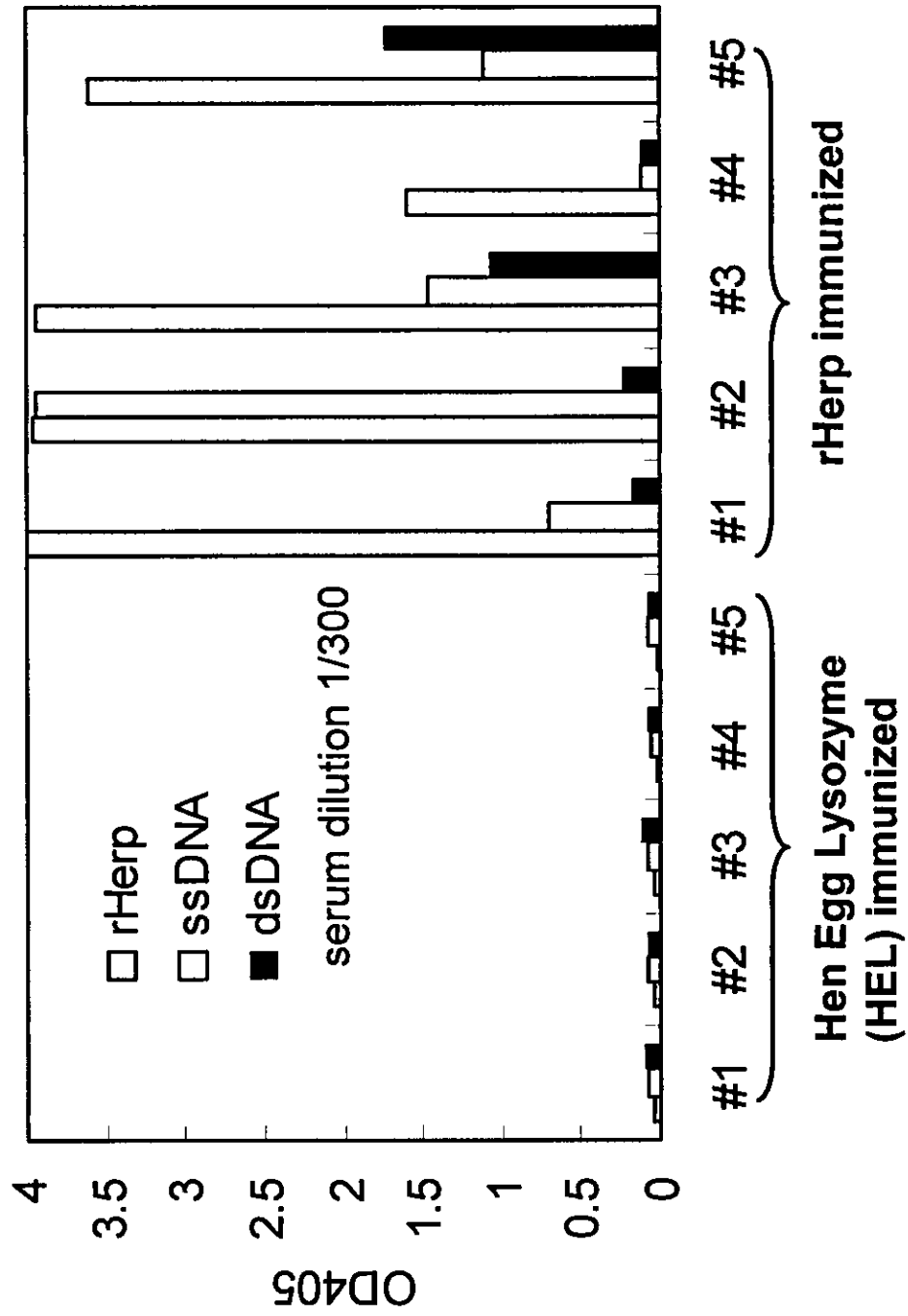
cDNA library from PBL of active lupus nephritis



## Figure 2 O-81 anti-DNA mAb binds to recombinant Herp



### Figure 3 anti-DNA Abs production in rHerp immunized mice



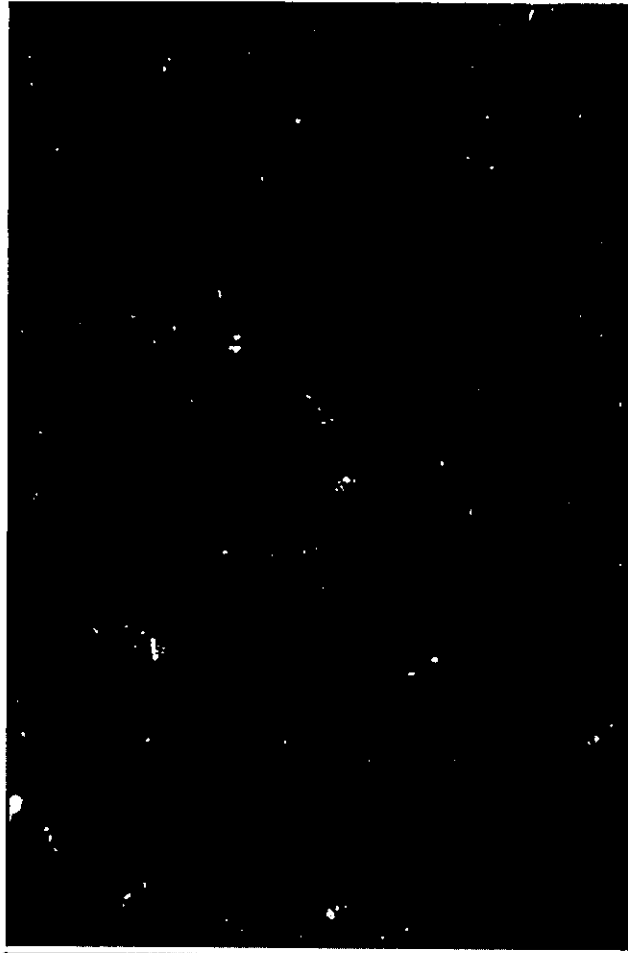


**图4 肾小球IgG沉积在Herp免疫小鼠**

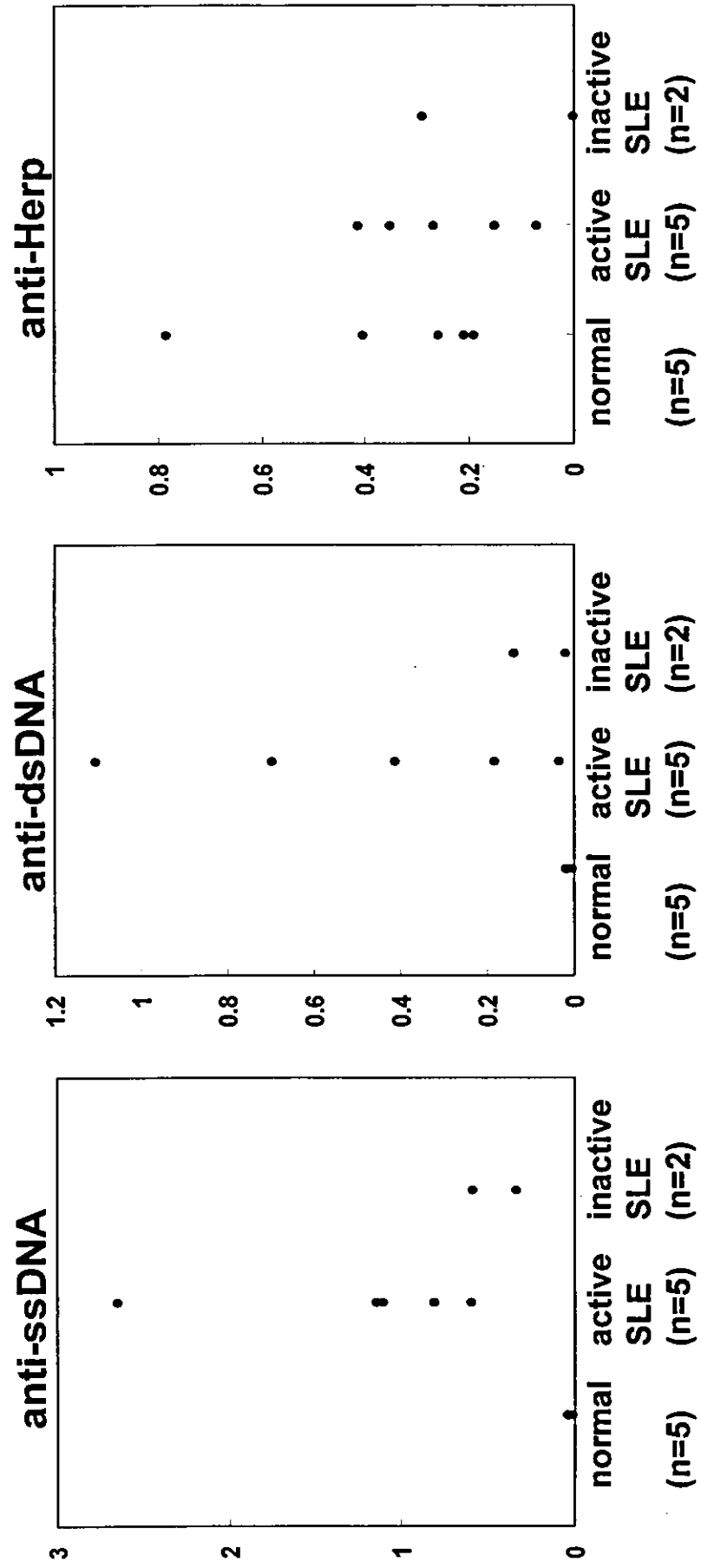
**Herp 免疫**



**Control**



**Figure 5 anti-DNA activity of anti-Herp antibodies**



## プロテオミクスを用いた自己抗体の解析に関する研究

分担研究者 加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター助教授

### 研究要旨

本研究はプロテオミクスを用いて自己抗体の解析を網羅的に行い、新規の自己抗原の同定や蛋白修飾と自己抗原性との関連を検討することを目的とした。2次元電気泳動後のウエスタンブロッティングで自己抗原を検出し、質量分析器と蛋白データベースサーチによる同定を行った。抗原ソースを工夫することで、筋炎で高頻度に検出される抗 cofilin1 自己抗体、内皮細胞に特異性の高い自己抗原 peroxiredoxin2、あるいは酸化ストレスにより修飾を受けた蛋白の抗原性変化などが検出された。自己抗原・自己抗体の解析にプロテオミクスはたいへん有用な手法であることが判明した。

### A. 研究目的

本研究は、自己免疫疾患の一大特徴である自己抗体・自己抗原の解析にプロテオミクスを応用し、新規自己抗原の検出と同定、蛋白修飾と抗原性との関連などの解析を目指したものである。全身性自己免疫疾患における典型的な自己抗体である抗核抗体の多くはエフェクターとしての作用が証明されていない。一方で、抗リン脂質抗体のように病態形成に直接関わっていると考えられる自己抗体もある。この意味から、プロテオミクスの網羅性を駆使してより多くの自己抗体・自己抗原系を検出解析し、自己抗体の全容を解明していく必要がある。また、糖鎖付加や酸化、あるいはシトルリン化など、蛋白の側鎖修飾と抗原性との関連はこれまであまり検討されておらず、調べられなければならない重要な課題である。

### B. 研究方法

基本的な方法論として、抗原ソースとなる細胞から尿素、チオ尿素、CHAPS を含む溶液で蛋白を抽出した。これを等電点電気泳動および分子量による SDS-PAGE を組み合わせた 2 次元電気泳動法で分離展開した。その後、ニトロセルロース膜に転写し、全身性自己免疫疾患患者血清を用いてエウスタンプロットを行った。血清に反応した蛋白スポット(自己抗原スポット)の蛋白を同定するために、同様に 2 次元電気泳動法で展開し、クマシー染色したゲルから、陽性蛋白スポットに一致するスポットを切り出して回収し、トリプシン消化後、ゲルから抽出した。これらの消化ペプチドの質量を、飛行時間型質量分析器を用いた mass-fingerprinting 法により決定し、マスコット(ソフトウェア)による蛋白データベース検索から質量の一致する候補蛋

白を選定した。候補蛋白は、報告されている mRNA 配列から、PCR を用いて cDNA を増幅、クローニングし、マルトース結合蛋白(MBP)との融合蛋白として大腸菌で発現させ、精製した。これを用いて抗原性の確認とともに、エウスタンプロット法と ELISA 法にて全身性自己免疫疾患患者および健常人の血清を広く検索した。

この際、酸化蛋白の抗原性検討のため、抗原ソースとして酸化ストレスを与えた後の HUVEC(臍帯静脈由来内皮細胞)と与えていない HUVEC を用い differential western blotting 法、あるいは血管内皮細胞に特異的な自己抗原を網羅的に検出では HUVEC と Hela 細胞を用い、differential western blotting 法を行う工夫をした。

### (倫理面への配慮)

血液試料の取得に関しては、所属大学の生命倫理委員会で承認された計画書に基づき、提供者のプライバシが守られるように配慮しつつ行われた。

### C. 研究結果

ベーチェット病患者血清を用いたスクリーニングでは、10 個以上の自己抗原を検出し、そのひとつは cofilin1 であった。ただし、その後の ELISA による検討で、抗 cofilin1 自己抗体はベーチェット病よりもむしろ筋炎で高頻度に出現することが判明した。酸化蛋白の抗原性に関する研究では HUVEC 由来の蛋白質の中には酸化により等電点あるいは分子量を変化させるものが数多く検出された。

また、見かけ上、酸化により等電点、分子量、あるいは存在量の変化しなかった蛋白質であっても、自己抗原性の減弱する蛋白質が多数認められた。さらに少数ではあったが、見かけ上、酸化により等

電点、分子量、あるいは存在量の変化しなかった蛋白質で、かつ、自己抗原性の増強する蛋白質が観察された。

血管内皮細胞特異的自己抗原の検索では HUVEC および Hela 細胞のプロテオームを用いた Differential Western Blotting 法を行い、約 50 個の HUVEC に特異性の高い自己抗原を検出した。同定した候補蛋白の中に peroxiredoxin2 があり、ELISA 法にて、本自己抗体は血管炎患者の 60% 以上で検出されるが、血管炎を有しない場合は 7% 程度であることが判明し、血管炎の存在に特異性の高いことが判明した。

#### D. 考察

細胞腫あるいは組織特異的に発現する自己抗原を同定するために、プロテオミクスを用いた 2 次元電気泳動と Differential Western Blotting 法の組み合わせは極めて有効であった。また、酸化など蛋白の修飾変化に対するアプローチとしても同方法が有効であると考えられた。

#### E. 結論

プロテオミクス手法を用いて、自己抗原の標的抗原を網羅的に解析することができると考えられた。また、蛋白の修飾変化と自己抗原性の関連の解析にも応用されうると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Guo-Hua Yuan, Atsuyuki Shibakawa, Michiaki Tanaka, Kayo Masuko-Hongo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, Hiroshi Nakamura. Characterization of Cells from Pannus-like Tissue over Articular Cartilage of Advanced Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Jan; 12(1):38-45.
2. Yao Z, Kurokawa MS, Masuko-hongo K, Tsuruha J, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. Characterization of arthropathy in mice immunized with cartilage intermediate layer protein. *Ann Rheum Dis*. 2004 Mar; 63(3):252-8.
3. Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M. Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circ J*. 2004 Jul; 68(7):677-82.
4. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: Identification of triose phosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* 2004; 50:1511-1521.
5. Tazzari PL, Bonifazi F, Bandini G, Kato T, Conte R, Ferrara GB, Pistillo MP. ATG/AMG immunosuppressive effect in mediated by anti-CTLA-4 antibodies.: In HLA2003 by International Hostpcompatibility Working Group. (in press)
6. Nakamura M, Tsutsumi, Sekine T, Koizuka, Nishioka K, Kato T. Identification of  $\beta$ -tubulin isoform as an autoantigen in allergic rhinitis. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48:427-434.
7. Kato T, Asahara H, Suzuki-Kurokawa M, Fujisawa K, Hasunuma T, Inoue H, Motokawa S, Sumida T, Nishioka K. HTLV-I env protein acts as a major antigen in patients with HTLV-I associated arthropathy. *Clin Rheumatol* 2004 Oct; 23(5):400-9.
8. Tanaka M, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. Suppressive effects of hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. *Rheumatol Int.* 2004 Dec 3 (in press)
9. Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K. Neo-antigens in oateoarthritis. *Curr Opinion Rheumatol* 2004; 16:604-608.
10. Nakamura H, Shibakawa A, Tanaka M, Kato T, Nishioka K. Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E2, nitric oxide and metalloproteases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:293-299.
11. Hui D, Masuko-Hongo K, Xiang Y, Boa CD, Wang XD, Chen SL, Kato T, Nishioka K. Prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: Evidence for a variety of autoimmune processes in OA patients *Rheumatol Int.* (in press)
12. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Noshioka K. A