

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

免疫疾患診断プロテインチップ開発用の抗リボソーム抗体標準血清確立  
に関する研究

分担研究者 諏訪 昭

東海大学医学部 内科学系リウマチ内科学 助教授

共同研究者 平形 道人

慶應義塾大学 医学部内科 専任講師

共同研究者 鈴木 康夫

東海大学 医学部内科学系 教授

研究要旨

生体内で蛋白合成に関わるリボソームを標的とする自己抗体として、抗 ribosomal P 抗体、抗 L10 抗体、抗 S10 抗体、抗 28S ribosome RNA 抗体などの自己抗体が全身性エリテマトーデス（SLE）患者血清中に報告されている。L5/5S RNP 複合体の L5 蛋白に対する抗体（抗 L5/5S RNP 抗体）も欧米の B 型肝炎や SLE 患者血清に見出されているが、本邦での同抗体の報告はなく、その臨床的意義は不明である。この理由の一つとして、スクリーニングに適した抗 ribosome 抗体の簡便な検出法が確立されておらず、多数血清を対象とした検討が困難であったことがあげられ、マイクロアレイ上にリボソーム抗原を固相化し、網羅的に自己抗体を検出する測定系の開発は重要と考えられる。本研究では、免疫疾患診断用プロテインチップにおいて抗 ribosome 抗体検出を可能とするため、多数の日本人膠原病患者血清を対象とし、抗 ribosome 抗体の免疫学的特異性と臨床的意義を追究した。RNA 免疫沈降法（RNA-IPP 法）により膠原病血清をスクリーニングし、76 例の抗 ribosome 抗体陽性血清を得た。さらに免疫沈降物中の蛋白成分を分析した結果、抗 ribosomal P 抗体 31 例に加え、3 例の抗 L5/5S RNP 抗体陽性血清を新たに見出した。抗 ribosomal P 抗体陽性例の臨床診断では、SLE が 15 例と最も高頻度であったが、シェーグレン症候群 5 例、亜急性皮膚ループス症候群 2 例、混合性結合組織病 2 例、全身性硬化症 2 例、抗リン脂質症候群 1 例、結節性多発動脈炎 1 例、リウマチ性多発筋痛症 1 例、関節リウマチ 1 例、未分類膠原病 1 例など他の膠原病にも低頻度ながら検出され、注目された。つぎに SLE 672 例を対象として抗 ribosomal P 抗体の有無により臨床特徴を比較検討したが、差はみられなかった。本研究において見出された抗 L5/5S RNP 抗体陽性例の臨床診断はいずれも SLE で、同抗体が SLE 診断に有用な新たな疾患特異自己抗体と考えられた。これらの自己抗体陽性血清が、免疫疾患診断プロテインチップの標準血清として有用なツールになる可能性が示唆された。

## A.研究目的

膠原病は原因不明の炎症性疾患であり、自己細胞成分に対する多彩な自己抗体産生を特徴とする。これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し、診断や治療反応性、予後推定など臨床的に有用であるばかりでなく、細胞内分子の構造と生物学的機能解明にも役立つ。リボソーム構成成分に対する自己抗体として、抗 ribosomal P 抗体、抗 L10 抗体、抗 S10 抗体、抗 28S ribosome RNA 抗体（抗 28S rRNA 抗体）、抗 S10 抗体などが報告されている。酸性リン蛋白を抗原とする抗 ribosomal P 抗体は、全身性エリテマトーデス（SLE）患者血清中に高頻度に見出され疾患特異的であることに加え、中枢神経症状との密接な関連が指摘されている。一方、抗 L5/5S RNP 抗体は免疫沈降法（IPP）により B 型肝炎患者血清およびシェーグレン症候群（SjS）患者血清中に欧米の二施設から報告されてきた自己抗体である。しかし、本邦での同抗体の報告はなく、その臨床的意義は不明である。本研究では、多数の日本人膠原病患者血清を用い、抗 ribosome 抗体の免疫学的特異性と臨床的意義を明確にすることで、免疫診断プロテインチップ開発のために抗 ribosome 抗体標準血清を確立することを目的とした。

## B.研究方法

### 1. 血清

1993 年から 2002 年 3 月までに自己抗体測定に依頼があった慶應義塾大学病院および関連施設の膠原病患者のうち、6,870 例と健常人 60 例を対象とした。各種自己抗体の標準血清は、教室で既報の方法によりその特異性を確認し、保存している血清を用いた。抗 L5/5S RNP 抗体の標準血清（PF 血清）は、米国 Yale 大学 Craft 博士より供与された。

### 2. RNA 免疫沈降法（RNA-immunoprecipitation assay; RNA-IPP 法）

#### 1) HeLa 細胞抽出物の作製と免疫沈降反応

免疫沈降法（IPP 法）は、Lerner & Steiz の方法に準じた。HeLa 細胞（ $6 \times 10^6$  個/1 検体）を回収後、HeLa 細胞を NET-2 バッファー（50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5）に浮遊、超音波破碎後その上清を細胞抽出物として使用した。

プロテイン A セファロース（Pharmacia 社）3 mg に IPP バッファー（10mM Tris, pH 8.0, 500mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40）500 $\mu$ l, 被験血清 10 $\mu$ l を加え、室温で混和した。この IgG 結合セファロースに IPP バッファー 500 $\mu$ l を添加した。IPP バッファーで洗浄後のセファロース粒子に、IPP バッファー 400 $\mu$ l と HeLa 細胞抽出物 100 $\mu$ l を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間混和した。洗浄操作を 5 回繰り返した後、セファロース粒子に NET-2 バッファー 300 $\mu$ l, 20%ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）15 $\mu$ l, 3M 酢酸ナトリウム 30 $\mu$ l, フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（PCA）300 $\mu$ l を加え、遠心した。同時に全 RNA マーカーとして細胞抽出物 10 $\mu$ l をとり、同様にフェノール抽出した。水層を回収し、冷却 100%エタノール 900 $\mu$ l を加え、-20 $^{\circ}$ C で核酸成分を沈降させた。その後遠心し、上清を捨てた。冷却 70%エタノール 300 $\mu$ l で洗浄後、乾燥さ

せた。

## 2) 電気泳動および銀染色

核酸成分を 7M 尿素-ポリアクリルアミド電気泳動 (Urea-PAGE) で分画した。泳動後のゲルに 10% 酸化反応液を加え、脱イオン水で洗浄後、10% 硝酸銀水溶液を加えた。さらに洗浄後、現像液 (silver stain developer, BIO RAD 社) で核酸バンドを染色し、5% 酢酸で反応を停止させた。この後ゲルを乾燥させた。

## 3. 蛋白免疫沈降法 (protein immunoprecipitation assay; P-IPP 法)

### 1) 標識 HeLa 細胞の抽出と免疫沈降反応

HeLa 細胞 ( $2 \times 10^6$  個/1 検体) をメチオニン除去 RPMI1640 (GIBCO 社) 培地に浮遊させ、 $[35S]$ メチオニン (Tran-35S label, ICN 社) 18.5 MBq を加え、培養し標識した。細胞を回収後、IPP バッファーに浮遊させ、超音波破碎装置で破碎後、その上清を細胞抽出物として使用した。

RNA-IPP 法と同様に プロテイン A セファロース (Pharmacia 社) 3 mg に IPP バッファー 500 $\mu$ l, 被験血清 10 $\mu$ l を加え、室温で混和した。この IgG 結合セファロース粒子を遠心し、上清を捨て、IPP バッファー 500 $\mu$ l を加え混和し、遠心した。この洗浄操作を 3 回繰り返した。洗浄後のセファロース粒子に IPP バッファー 400 $\mu$ l と、標識 HeLa 細胞抽出物 100 $\mu$ l を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間混和した。洗浄操作を 5 回繰り返した後、3 $\times$ SDS サンプルバッファー (62.5mM Tris-HCL, 2% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.005% ブロムフェノールブルー, pH 6.8) を 30 $\mu$ l 加え、5 分間 100 $^{\circ}$ C で加熱し、蛋白成分を抽出した。

また、一部の実験では、ラジオアイソトープを用いない未標識の HeLa 細胞 ( $2 \times 10^7$  個/1 検体) 抽出物より免疫沈降物を得た。

### 2) 電気泳動およびオートラジオグラフィ

免疫沈降物中から抽出した蛋白成分を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、ゲルを乾燥させ、X 線フィルム (Kodak 社) に -70 $^{\circ}$ C で 7 日間感光させ、現像した。

## 4. 免疫ブロット法 (Immunoblots)

免疫ブロット法は Towbin らの方法に準じた。すなわち、SDS-PAGE で分画した蛋白をニトロセルロース膜 (BA-85, Schleicher & Schuell 社) に転写、5% スキムミルク溶液でブロック後、200 倍希釈患者血清を一次抗体として、4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG (Promega 社) を二次抗体 (1:5000 倍希釈) として、4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。再度洗浄後、NBT/BCIP 発色反応により抗体を検出した。

## 5. 蛍光抗体法 (Fluorescent anti-nuclear antibodies; FANA)

フルオロ HEPANA テスト (MBL 社) により、HEp-2 細胞を基質とし、患者血清中

の抗体を蛍光抗体法で検出した。

## 6. 臨床的特徴の分析

抗 ribosome 抗体陽性患者についてその臨床的特徴を分析した。

(倫理面への配慮)

患者への説明の上同意を得た。また、得られた調査票の管理を厳重にし、プライバシーの保護に留意した。

## C. 研究結果

### 1. RNA-IPP 法による抗 ribosome 抗体の検出

膠原病患者血清 6,870 例を対象として RNA-IPP 法により、自己抗体の検索を行った。一部の血清は 5.8S RNA または 5S RNA を免疫沈降し、これらの患者血清中には、リボソーム上の蛋白-核酸複合体に対する自己抗体 (抗 ribosome 抗体) が含まれると考えられた (図 1)。

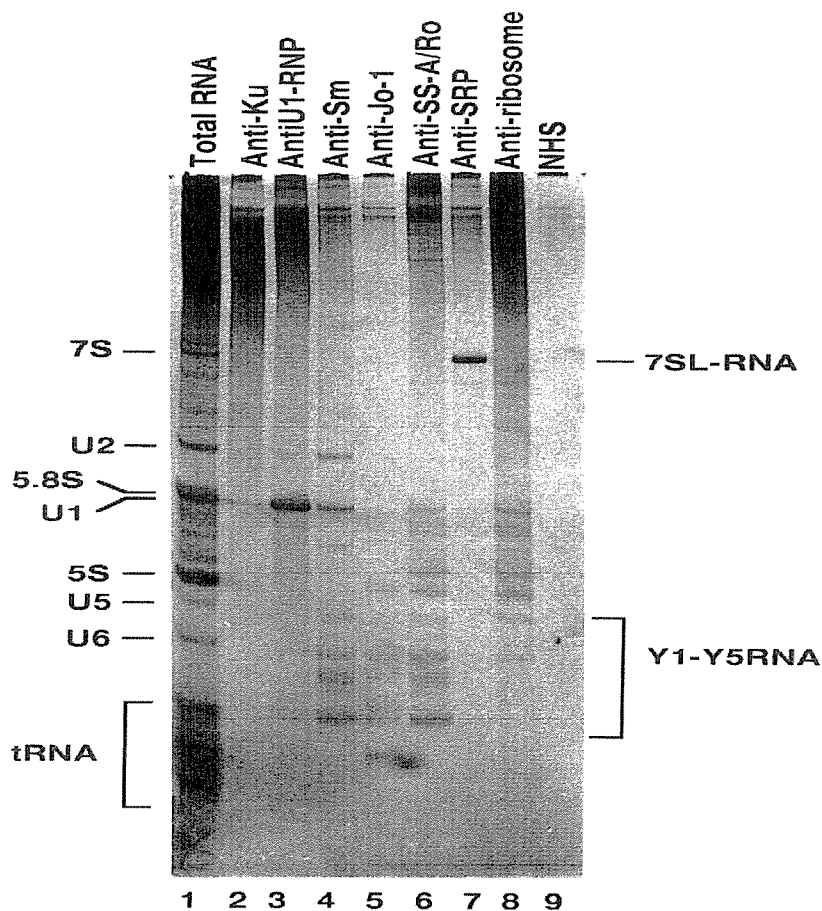


図 1 RNA-IPP 法による抗 ribosome 抗体の認識する核酸成分の分析

## 2. P-IPP 法による抗 ribosome 抗体の検出

RNA-IPP 法により抗 ribosome 抗体陽性とした 76 患者血清が免疫沈降する蛋白成分を P-IPP 法により分析した. 代表例の SDS-PAGE の成績を図 2 に示す. 抗 ribosomal P 抗体陽性血清は, P<sub>0</sub> (37 kDa), P<sub>1</sub> (19 kDa), P<sub>2</sub> 蛋白 (17 kDa) を免疫沈降した (レーン 3). また 3 血清 (MY, TS, KS) は, 34 kDa 蛋白を免疫沈降した (レーン 7-9). この 34 kDa 蛋白は免疫ブロット法で抗 L5/5S RNP 抗体標準血清 (PF) により認識され, これら 3 血清中には抗 L5/5S RNP 抗体が存在すると考えられた. (図は省略).

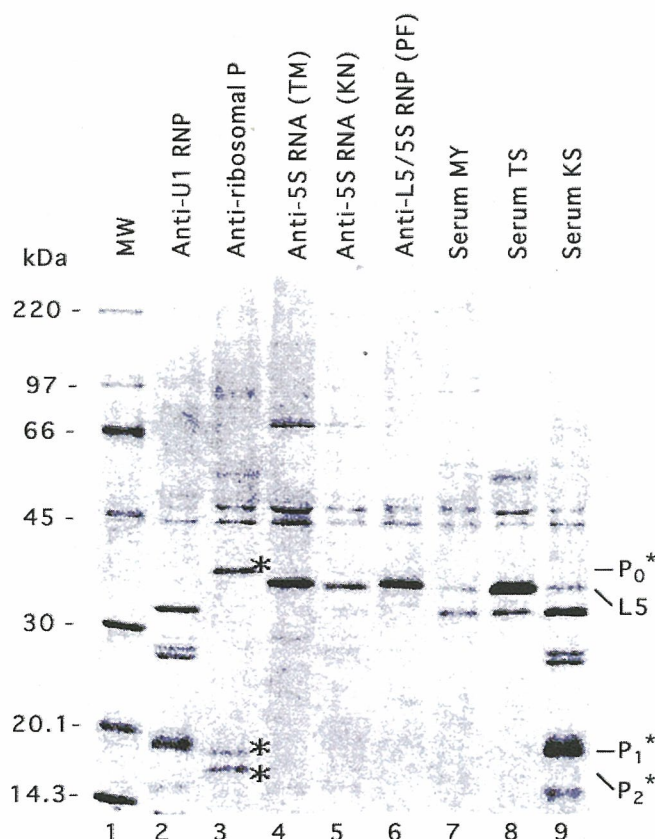


図 2 P-IPP 法による抗 ribosome 抗体の認識する蛋白成分の分析

## 3. 抗 ribosome 抗体の特異性の検討

抗 ribosome 抗体陽性患者血清 76 例中の自己抗体を P-IPP 法により検討した成績のまとめを表 1 に示す. 抗 ribosomal P 抗体が 31 例と最も多く検出された. 抗 L5/5S RNP 抗体は 3 例に検出された. その他の自己抗体の中では, 抗 U1 RNP 抗体が 19 例と最も多く, ついで抗 SS-A/Ro 抗体 12 例, 抗 RNA helicase A 抗体 12 例が検出された. 陽性患者数は少ないものの, 抗 Ku 抗体, 抗 Sm 抗体, 抗 PL-7 抗体, 抗 SRP 抗体も一

部の血清で認められた。また、分子量約 200 kDa 蛋白, 100 kDa 蛋白, 75 kDa 蛋白, 70 kDa 蛋白を免疫沈降する患者血清がみられ, これらの蛋白を対応抗原とする未同定の自己抗体の存在が示唆された。一方で, いずれの蛋白成分も免疫沈降しない血清も 8 例みられた。

表 1. 抗 ribosome 抗体陽性患者血清中の自己抗体

| 自己抗体              | 陽性患者数 |
|-------------------|-------|
| 抗ribosomal P抗体    | 31    |
| 抗L5/5S RNP抗体      | 3     |
| 抗U1 RNP抗体         | 19    |
| 抗SS-A/Ro抗体        | 12    |
| 抗RNA helicase A抗体 | 12    |
| 抗Ku抗体             | 5     |
| 抗Sm抗体             | 3     |
| 抗PL-12抗体          | 1     |
| 抗SRP抗体            | 1     |
| 未同定自己抗体 (対応抗原蛋白)  | 32    |
| 200kDa            | 3     |
| 100kDa            | 8     |
| 75kDa             | 3     |
| 70kDa             | 10    |
| その他の蛋白            | 8     |
| 自己抗体陰性            | 8     |

#### 4. 抗 ribosomal P 抗体の臨床的意義の検討

抗 ribosome 抗体陽性例のうち 31 例と最も多く認められた抗 ribosomal P 抗体についてその臨床的意義を検討した。抗 ribosomal P 抗体陽性例の臨床診断は SLE が 15 例と, 約半数を示した。一方で, これまでの報告とは異なり, 同抗体は SjS 5 例, 亜急性皮膚ループス症候群 (SCLE) 2 例, 混合性結合組織病 (MCTD) 2 例, 全身性硬化症 (SSc) 2 例, 結節性多発動脈炎 (PN) 1 例, リウマチ性多発筋痛症 (PMR) 1 例, 抗リン脂質症候群 (APS) 1 例, 関節リウマチ (RA) 1 例, 未分類膠原病 (UCTD) 1 例にも検出された (表 2)。次に, 教室の SLE 患者 672 例について, 抗 ribosomal P 抗体陽性 SLE 患者 15 例について同抗体陰性 SLE 患者 657 例とその臨床特徴を比較した (表 3)。中枢神経病変は抗 ribosomal P 抗体陽性例の 33.3%に認められたが, 一方で, 陰性例にも 26.6%に認められ, その出現頻度に差は認められなかった。血液病変は, 同抗体陽性例の全例に認められたが (白血球減少 66.7%, リンパ球減少 66.7%, 血小板減少 53.3%, 貧血 20%), これは陰性例の 85.4%と比較して差はなかった。

表 2. 抗 ribosomal P 抗体陽性患者の臨床診断

| 診 断                 | 陽性患者数 |
|---------------------|-------|
| 全身性エリテマトーデス (SLE)   | 15    |
| シェーグレン症候群 (SjS)     | 5     |
| 亜急性皮膚ループス症候群 (SCLE) | 2     |
| 混合性結合組織病 (MCTD)     | 2     |
| 全身性硬化症 (SSc)        | 2     |
| 結節性多発動脈炎 (PN)       | 1     |
| リウマチ性多発筋痛症 (PMR)    | 1     |
| 抗リン脂質症候群 (APS)      | 1     |
| 関節リウマチ (RA)         | 1     |
| 未分類膠原病 (UCTD)       | 1     |
| 計                   | 31    |

表 3. 抗 ribosomal P 抗体陽性 SLE の臨床特徴

| 臨床特徴          | 抗ribosomal P抗体 |            |
|---------------|----------------|------------|
|               | 陽性 (N=15)      | 陰性 (N=657) |
| 女性            | 73.3 (%)       | 91.2 (%)   |
| 発熱            | 80.0           | 76.9       |
| リンパ節腫脹        | 40.0           | 37.8       |
| 顔面紅斑          | 46.7           | 67.0       |
| Discoid疹      | 13.3           | 19.2       |
| 口腔内潰瘍         | 13.3           | 15.3       |
| 脱毛            | 13.3           | 28.9       |
| 光線過敏症         | 26.7           | 21.8       |
| レイノー現象        | 40.0           | 49.7       |
| 関節病変          | 93.3           | 84.4       |
| 筋病変           | 13.3           | 34.4       |
| 腎病変           | 40.0           | 52.8       |
| 肺・胸膜病変        | 13.3           | 26.0       |
| 心病変           | 6.7            | 10.8       |
| 中枢神経病変        | 33.3           | 26.6       |
| 消化器病変         | 6.7            | 25.4       |
| 血液病変          | 100            | 85.4       |
| 低補体血症         | 73.3           | 58.9       |
| 梅毒血清反応生物学的偽陽性 | 20.0           | 17.9       |
| 自己抗体 抗dsDNA抗体 | 76.9           | 61.9       |
| 抗U1 RNP抗体     | 23.1           | 49.7       |
| 抗Sm抗体         | 23.1           | 26.7       |
| 抗SS-A/Ro抗体    | 23.1           | 53.6       |
| 抗SS-B/La抗体    | 0              | 12.1       |



## 5. 抗 L5/5S RNP 抗体の臨床的意義の検討

抗 L5/5S RNP 抗体陽性 3 例の臨床特徴につき検討した (表 4)。臨床診断は全例 SLE であった。性別では、2 例が男性で他の 1 例は女性であった。3 例に共通して、顔面紅斑、レイノー現象、低補体血症の所見が認められた。腎症状は 2 例に認められ、腎生検で 1 例はループス腎炎 WHO 分類 II 型 (focal segmental glomerulonephritis, no wire loop lesion) と診断され、他の 1 例は WHO 分類 IVb 型 (diffuse proliferative glomerulonephritis) と診断された。抗核抗体は 3 例とも陽性で、その染色型は 1 例が核小体型を示し、2 例が均質型と斑紋型の両方を示した。抗細胞質抗体はいずれも陰性であった。

表 4. 抗 L5/5S RNP 抗体陽性患者の臨床的特徴

| 臨床特徴             | MY    | TS    | KS  |
|------------------|-------|-------|-----|
| 臨床診断             | SLE   | SLE   | SLE |
| 性別               | 女性    | 男性    | 男性  |
| 発熱               | +     | -     | -   |
| リンパ節腫大           | -     | -     | -   |
| 顔面紅斑             | +     | +     | +   |
| Discoid 疹        | -     | -     | +   |
| 口腔内潰瘍            | -     | -     | +   |
| 脱毛               | +     | -     | -   |
| 光線過敏症            | +     | -     | -   |
| レイノー現象           | +     | +     | +   |
| 関節病変             | +     | +     | -   |
| 筋病変              | -     | -     | -   |
| 腎病変              | +     | -     | +   |
| 肺・胸膜病変           | +     | -     | -   |
| 心病変              | -     | +     | +   |
| 中枢神経病変           | -     | -     | -   |
| 消化器病変            | -     | -     | -   |
| 血液病変             | +     | +     | -   |
| 低補体血症            | +     | +     | +   |
| 梅毒血清反応生物学的偽陽性    | -     | +     | -   |
| 自己抗体 抗核抗体        | +     | +     | +   |
| (染色型)            | (H,S) | (H,S) | (N) |
| 抗細胞質抗体           | -     | -     | -   |
| 抗 dsDNA 抗体       | -     | -     | +   |
| 抗 U1 RNP 抗体      | -     | -     | +   |
| 抗 Sm 抗体          | -     | -     | +   |
| 抗 SS-A/Ro 抗体     | +     | +     | -   |
| 抗 SS-B/La 抗体     | -     | -     | -   |
| 抗 ribosomal P 抗体 | -     | -     | -   |

SLE: 全身性エリテマトーデス, H: 均質型, S: 斑紋型, N: 核小体型

#### D. 考察

真核細胞のリボゾームは、60Sの大亜粒子上の3種類のRNA(28S, 5.8S, 5S RNA)と49種類の蛋白および40Sの小亜粒子上の18S RNAと33種類の蛋白からなる巨大複合体であり、蛋白合成をつかさどる。これらのリボゾーム構成成分を標的とする自己抗体として、大亜粒子中の3種類の酸性リン蛋白(P0, P1, P2)を認識する抗 ribosomal P抗体が同定され、SLE疾患特異抗体として位置づけられてきた。その他のリボゾーム構成成分に対する自己抗体としては、これまでに大亜粒子中の20 kDa蛋白に対する抗 L12抗体や28S rRNAのGTPase domainに対する抗28S rRNA抗体、小亜粒子中の20 kDa蛋白に対する抗 S10抗体などが報告されているが、その臨床的意義の詳細についてはなお不明な点が多い。この理由の一つとして、スクリーニングに適した抗 ribosome 抗体の簡便な検出法が確立されておらず、多数血清を対象とした検討が困難であったことが考えられ、マイクロアレイ上にリボゾーム抗原を固相化し、網羅的に自己抗体を検出するプロテインチップの開発は重要と考えられてきた。

本研究では、RNA-IPP法により、5.8S RNAまたは5S RNAを免疫沈降する血清に注目し、抗 ribosome 抗体の検出を試みた。抗 ribosome 抗体76例中、抗 ribosomal P抗体は31例と最も多く認められた。抗 ribosomal P抗体陽性患者血清中に同時に検出された自己抗体は抗 U1 RNP、抗 SS-A/Ro、抗 RNA helicase A抗体であった。60S大亜粒子上のL5/5S RNPは、34 kDaのL5蛋白と5S RNAからなる蛋白-核酸複合体であり、抗 L5/5S RNP抗体は、L5蛋白を認識する自己抗体として、B型肝炎患者血清中に最初に報告され、その後SLE患者血清中に見出された。本邦での報告はこれまでみられなかったが、本研究により初めて膠原病患者血清中に検出された。また、種々の蛋白成分を免疫沈降する血清がみられたことから、リボゾーム構成成分を認識する新たな自己抗体の存在が示唆される。一方で、本研究では、5.8SRNAまたは5S RNAを免疫沈降する血清にのみ注目したため、28S RNAや18S RNA、あるいはリボゾーム構成蛋白成分のみを認識する抗 ribosome 抗体については、検討し得なかった。今後追究すべき課題と考えられる。

抗 ribosomal P抗体はSLE患者で最も多く検出されたが、これまでの報告と異なり、SjS, SCLE, MCTD, SSc, PN, PMR, APS, RA, UCTDなど他の膠原病患者でも稀少ながら検出された。これは、従来スクリーニングに用いた血清が少なかったため検出し得なかったためと考えられる。抗 ribosomal P抗体の陽性頻度は、欧米でSLE患者の10-20%とされ、本邦での頻度はSLE患者の40%前後とこれより高いとされている。こうした陽性頻度の違いは人種差によるものかもしれない。しかし、今回の研究では抗 ribosomal P抗体の疾患特異性はSLEに高いものの、その頻度はSLEの数%であり、諸家の報告に比べて低かった。この理由として、まず第一点は、Satoらは、抗 ribosomal P抗体の陽性率は無作為に抽出したSLE患者血清では10%にすぎないが、活動期症例では陽性率は40%まで増加することを示しており、今回の対象患者の抗体測定時期を反映している可能性も考えられる。第二点目は、従来抗 ribosomal P抗体の検出には、免疫ブロット法やELISA, RIAが用いられており、今回の研究でRNA-IPP

法を用いたためである可能性も挙げられる。こうした抗体検出法の違いによる抗体陽性頻度についても考慮すべきかもしれない。Bonfa らが抗 ribosomal P 抗体が SLE の精神症状と関連することを報告して以来、Schneebaum らや Sato ら、Nojima らにより脳器質症候群や、非器質性精神病といった精神症状との関連が報告されている。一方で、VanDam らや Teh らは、両者の相関に否定的な報告をしている。実際、今回の研究でも明らかな相関は指摘し得なかったが、これは抗 ribosomal P 抗体の陽性頻度が低率であったことを考えあわせると、解釈にあたっては慎重なべきかもしれない。中枢神経症状の診断、症例の選択基準、抗体測定方法と測定時期などを統一した prospective な多施設共同研究による多数例の解析が必要と考える。

本研究において、本邦で初めて抗 L5/5S RNP 抗体陽性 3 例を同定することに成功した。これまでに抗 L5/5S RNP 抗体は、B 型肝炎患者と SLE 患者血清中に見出された 2 例以外には、同抗体の報告はなく、その臨床的意義は不明であった。Suwa らは、L5/5S RNP 複合体を認識する新たな自己抗体を膠原病患者血清中に見出し、その対応抗原の分析から、同抗体が 5S RNA を認識することを明らかにしたが、うち 1 例の RA 患者血清中の抗体は 5S RNA のみを認識したのに対して、他の 1 例の SjS 患者血清中の抗体は 5S RNA に加えて、L5 蛋白も同時に認識していると考えられた。膠原病患者血清中に見出される自己抗体のうちあるものは経過中に抗体価が変動することが知られている。例えば抗 DNA 抗体は腎症状などその疾患活動性と抗体価が平行して変動することが多いとされる。抗 L5/5S RNP 抗体に関しても、Guialis らはループス腎炎の患者 (WHO IV 型) の活動性特に蛋白尿の出現と抗 L5/5S RNP 抗体の消長の間に相関があることを示した。今回検出された 3 例中、1 例については 2 年間に渡り抗 L5/5S RNP 抗体が検出されることを確認したが、抗体価については検討し得なかった。今後、ELISA や二重免疫拡散法などの方法により経時的に抗体価と臨床症状との相関を検討する。今回見出した抗 5S/L5 RNP 抗体陽性例はいずれも SLE 症例であり、同抗体が他の抗 ribosome 抗体と同様に SLE に特徴的な自己抗体と考えられた。

## E. 結論

多数の膠原病患者血清を対象とし、RNA-IPP 法を用いたスクリーニングにより、抗 ribosome 抗体の検出とその臨床的意義について検討した。従来、SLE に特異的で中枢神経症状との密接な関連が指摘されてきた抗 ribosomal P 抗体は、本研究では SLE 患者血清中に最も高頻度に検出されるものの、他の膠原病患者血清中にも存在することが明らかとなり、さらに、本邦で初めて見出した抗 L5/5S RNP 抗体が SLE は特異自己抗体の一つと考えられた。本研究により同定された抗 ribosome 抗体陽性血清が、免疫疾患診断プロテインチップの標準血清として有用なツールになる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. 鈴木康夫, 斉藤栄子, 若林孝幸, 諏訪 昭. ステロイド骨粗鬆症の海外の予防・治療ガイドライン. 痛みと臨床 6(2) : 29-36, 2006.
2. 鈴木康夫, 若林孝幸, 小宮喜代里, 斉藤栄子, 諏訪 昭. RA の薬物療法と免疫抑制薬. 臨床リウマチ 18 (1) : 15-23, 2006.
3. 鈴木康夫, 諏訪 昭, 若林孝幸, 斉藤栄子, 小宮喜代里. 抗リウマチ薬 (DMARDs). 内科 97(4) : 647-651, 2006.
4. 鈴木康夫, 諏訪 昭, 若林孝幸, 斉藤栄子, 小宮喜代里. MTX とその問題. カレントセラピー24(5) : 46-50, 2006.
5. 鈴木康夫, 諏訪 昭, 若林孝幸, 斉藤栄子, 小宮喜代里. 内科医のための関節痛, 筋肉痛の診かた : その他の膠原病と関節痛・筋肉痛. 診断と治療 94(7) : 79-83, 2006.
6. 鈴木康夫, 諏訪 昭, 若林孝幸. 抗リウマチ薬の選び方と使用法のコツ. 日本医師会雑誌 135(5) : 1057-1062, 2006.
7. 鈴木康夫, 斉藤栄子, 若林孝幸, 諏訪 昭. 抗リウマチ薬, 免疫抑制薬. 診断と治療 94(10) : 1929-1937, 2006.
8. 鈴木康夫, 若林孝幸, 斉藤栄子, 諏訪 昭. メトトレキサートの使い方と注意すべき副作用. 治療 89(2) : 277-283, 2007.
9. 諏訪 昭. 免疫血清学的検査. 池田康夫, 鈴木則宏編集「内科研修マニュアル (改訂第2版)」。南江堂, p522-525, 2006.
10. 諏訪 昭. 混合性結合組織病 (MCTD)・重複症候群 (OL). 池田康夫, 鈴木則宏編集「内科研修マニュアル (改訂第2版)」。南江堂, p548-549, 2006.
11. 諏訪 昭. 二次性アミロイドーシス. 池田康夫, 鈴木則宏編集「内科研修マニュアル (改訂第2版)」。南江堂, p554, 2006.
12. 諏訪 昭. 成人 Still 病. 池田康夫, 鈴木則宏編集「内科研修マニュアル (改訂第2版)」。南江堂, p555, 2006.
13. 諏訪 昭. リウマチ性多発筋痛症. 池田康夫, 鈴木則宏編集「内科研修マニュアル (改訂第2版)」。南江堂, p565, 2006.

### 2. 学会発表

1. 木村納子, 野島崇樹, 佐藤慎二, 桑名正隆, 諏訪 昭, 平形道人. 関節リウマチに対するブシラミン(Bc)の効果. 第 103 回日本内科学会総会, 横浜市, 2006 年 4 月.
2. 諏訪 昭, 長谷川直樹, 佐藤慎二, 花岡洋成, 古屋善章, 高田哲也, 香月有美子, 木村納子, 金子祐子, 鈴木康夫, 平形道人. 関節リウマチ (RA) における全血 IFN- $\gamma$  応答検査法 (クウォンティフェロン TB2G (QFT)) を用いた潜在性結核感染 (LTBI) の診断に関する研究. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.

3. 金子祐子, 諏訪 昭, 花岡洋成, 古屋善章, 高田哲也, 香月有美子, 木村納子, 佐藤慎二, 平形道人. 膠原病患者における抗 U1RNP 抗体対応抗原エピトープの多様性. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.
4. 針馬日出美, 高田哲也, 花岡洋成, 古屋善章, 香月有美子, 木村納子, 岡 浩子, 金子祐子, 佐藤慎二, 諏訪 昭, 平形道人. 抗 SRP 抗体の免疫学的多様性と臨床像についての検討. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.
5. 香月有美子, 花岡洋成, 古屋善章, 高田哲也, 木村納子, 金子祐子, 岡 浩子, 徳丸裕美, 佐藤慎二, 諏訪 昭, 平形道人. 抗 EJ (glycyl tRNA 合成酵素) 抗体陽性例の臨床特徴に関する研究. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.
6. 木村納子, 野島崇樹, 佐藤慎二, 桑名正隆, 諏訪 昭, 平形道人. 関節リウマチに対するブシラミン (Bc) の効果. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.
7. 佐藤慎二, 桑名正隆, 諏訪 昭, 平形道人. 特発性間質性肺炎患者の臨床的免疫学的特徴の検討. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.
8. 高田哲也, 花岡洋成, 古屋善章, 香月有美子, 木村納子, 金子祐子, 岡 浩子, 徳丸裕美, 佐藤慎二, 諏訪 昭, 石原傳幸, 平形道人. 抗 SRP 抗体陽性筋炎の臨床・組織学的特徴に関する研究. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.
9. 花岡洋成, 古屋善章, 香月有美子, 木村納子, 高田哲也, 金子祐子, 岡 浩子, 徳丸裕美, 佐藤慎二, 諏訪 昭, 平形道人. 膠原病疾患におけるニューモシステイス肺炎 (PCP) 及びサイトメガロウイルス (CMV) 感染症の解析・検討. 第 50 回日本リウマチ学会総会, 長崎市, 2006 年 4 月.
10. 野島崇樹, 諏訪 昭, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 平形道人. 肺高血圧症を合併した混合性結合組織病患者の臨床免疫学的特徴. 第 6 回日本抗加齢医学会総会, 東京都, 2006 年 5 月.
11. 諏訪 昭, 鈴木康夫, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 平形道人, 佐藤 徹. 膠原病性肺高血圧に対するエポプレステロール療法の有用性に関する研究. 第 34 回日本臨床免疫学会総会, 東京都, 2006 年 10 月.
12. 諏訪 昭, 鈴木康夫, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 平形道人. 筋炎再燃に対してミゾリビンが有効であった関節リウマチに合併した多発性筋炎の一例. 第 34 回日本臨床免疫学会総会, 東京都, 2006 年 10 月.
13. Michito Hirakata, Hidemi Harima, Tstsuya Takada, Shinji Sato, Masataka Kuwana, Akira Suwa, John A. Hardin. Heterogeneity of autoimmune responses to the signal recognition particle (SRP): clinical Association in Japanese patients. American College of Rheumatology 70th Annual Meeting, Washington D.C., November, 2006.
14. Yumiko Katasuki, Michito Hirakata, Yuko Kaneko, Shinji Sato, Masataka Kuwana, Akira Suwa, John A. Hardin. Anti-glycyl tRNA synthetase

antibodies are associated with interstitial lung disease and dermatomyositis in Japanese patients. American College of Rheumatology 70th Annual Meeting, Washington D.C., November, 2006.

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

免疫疾患診断プロテイン・チップ開発用固定化技術の応用に関する研究

分担研究者 北嶋 隆

財団法人神奈川科学技術アカデミー

伊藤「再生医療バイオリアクタープロジェクト」プロジェクトサブリーダー

研究要旨

自己免疫疾患診断プロテイン・チップの開発において、これまで検討しているポリスチレン基板を用いた化学発光法で検出する診断システムのみでなく、多様な測定装置での診断システムを開発していくことを目指し、伊藤主任研究員の開発した光固定化法をSPR、QCMといったセンサーチップへ応用する検討を行った。SPRおよびQCMのセンサーチップ上にプロテインを始め様々な生体分子を固定化することを試み、金基板上への光固定化技術の確立を目指した。

A. 研究目的

光反応性マトリックスを用いた光固定化法は、これまでポリスチレンなどの有機基板への生体分子固定化法として開発を行い、様々な生体分子を固定化可能であることがわかっている。現在はポリスチレン基板を用いて化学発光法で検出するプロテイン・チップの開発を進めているが、生体分子間の相互作用を解析するシステムとしては、SPR(表面プラズモン共鳴)やQCM(水晶発振子マイクロバランス)を利用した測定システムも近年研究用として広く利用されるようになってきている。特にSPRにおいてはマイクロアレイによる多項目同時解析の可能な装置の開発も進んでいることから、このような測定システム用センサーチップにも多種類の生体分子が固定化できれば、診断システムを開発する上での多様性を広げることができると考えられる。そこで、光反応性マトリックスを用いた固定化技術をSPRおよびQCMセンサーチップ固定化法として応用し、タンパク質やDNAを始め、糖類、リン脂質、ウィルスなどの様々な生体分子を固定化する検討を行った。

B. 研究方法

1. SPRセンサーチップへの固定化検討

SPRセンサーチップの金薄膜をアルカンチオールで覆い自己集積化層 (self-assembled monolayer, SAM)を形成させた。この上に光反応性マトリックスをコートし、目的の抗原をスポット後、光照射を行うことにより固定化を行った。固定化したセンサーチップをBIACORE® 2000(Biacore社)にセットし、各抗体との相互作用の検出により固定

化の有無を確認した。SPRでは、タンパク質、DNA、糖鎖、リン脂質といった化学的構造や官能基の異なる生体分子の光固定化を検討した。

## 2. QCMセンサーチップへの固定化検討

QCMセンサーチップへも同様に、まず金薄膜をアルカンチオールで覆い、この上に光反応性マトリックスをコートし、目的の抗原をスポット後、光照射を行うことにより固定化を行った。固定化したセンサーチップについてAffinixQ(Initium社)で各抗体との結合量測定を行った。QCMでは、タンパク質の他にウイルスや低分子化合物の光固定化を検討した。

## C. 研究結果

### 1. SPR測定

SPR測定装置Biacore2000® (Biacore)で、光固定化法による各分子を固定化したチップに対する各抗体の結合量を測定した。タンパク質BSAについては、光固定化を行ったチップでも従来のアミンカップリング法と同程度の抗体結合量を示した。これより、光固定化法でBSAが固定化がされ、抗体との結合性も保っていることが確認された。糖鎖Heparin、DNA、リン脂質Phosphatidylserineに関しても、光固定化法で固定化したチップでは抗体の結合によるシグナルが観測され、これらの生体分子が固定化されていることが示された。また、固定化に用いている光反応性マトリックスは非特異的吸着抑制効果を持ち、マトリックスコートのみではインジェクト終了後に結合シグナルが見られていないことから、非特異的吸着が抑制されていることが確認できた。

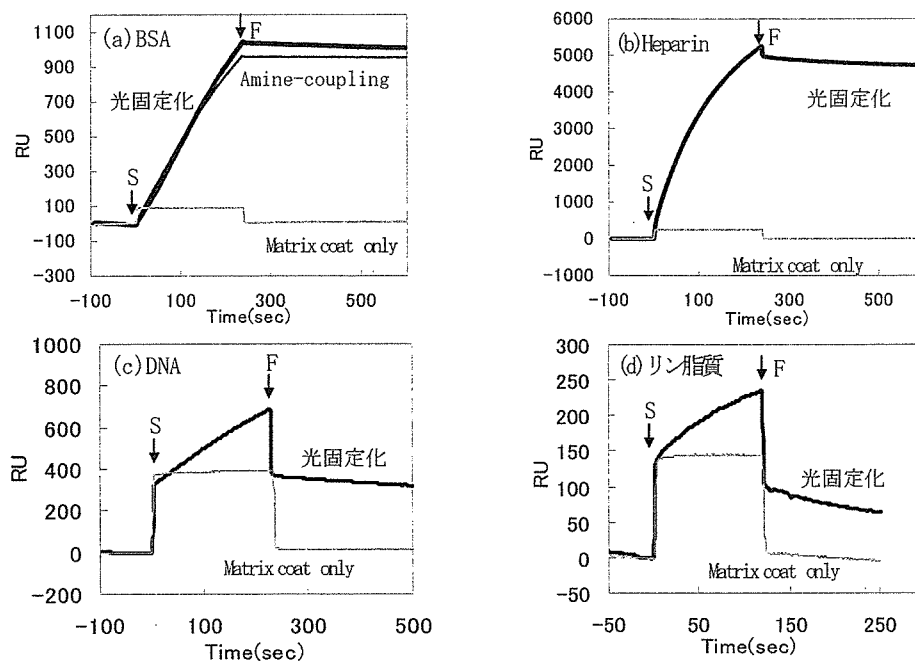


図1 SPRでの生体分子光固定化センサーチップに対する抗体結合量測定  
 (↓S:抗体インジェクト開始点、↓F:抗体インジェクト終了点  
 (a)BSA (b)Heparin (c)dsDNA (d)Phosphatidylserine )



## 2. QCM測定

QCM測定装置AffinixQ(Initium)を用いて、光固定化により分子を固定化したチップに対する、それぞれの抗体の結合量測定を行った。QCMでは、タンパク質の他にウイルスや低分子化合物の固定化を検討した。タバコモザイクウイルス、ノルフロキサシンともに光固定化を行ったチップにおいて、抗体の結合に伴う振動数の減少が見られた。また、光反応性マトリックスの非特異的吸着抑制効果によりマトリックスコートのみでは吸着による振動数の減少が見られなかった。これより、分子量数万kDaの巨大な天然生体分子から300程度の低分子化合物まで光固定化法で固定化可能であり、ブロッキングなしで抗体との相互作用測定が可能であることが示された。

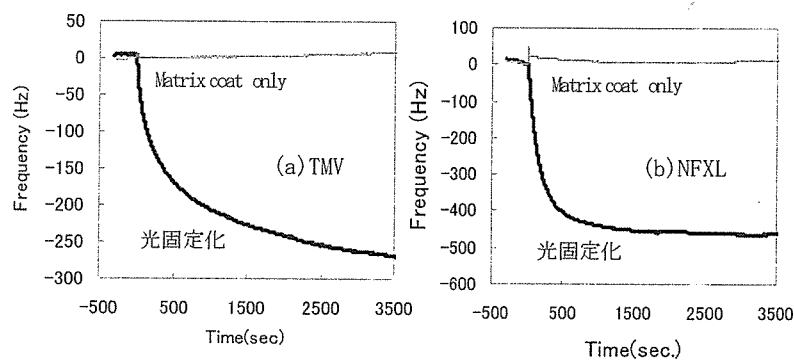


図2 QCMでの生体分子光固定化センサーチップに対する抗体結合量測定  
(a)Tabacco Mosaic virus (b)Norfloxacin)

## D. 考察

SPR, QCMセンサーチップにおいては、従来の固定化法では目的の生体分子によって基板の修飾基や固定化法を選択する必要があった。例えばアミンカップリング法ではタンパク質は固定化されるが、カップリングする官能基を持たない糖鎖やDNA、リン脂質などの生体分子はこの方法では固定化できない。しかし、光固定化法を用いることで、化学構造や官能基の種類、分子量などの異なる様々な生体分子をすべて同一の方法で固定化できることが示された。また、光固定化チップではマトリックスにより非特異的吸着が抑制され、ブロッキング操作なしで特異的な結合のみを観測することが可能であることが示唆された。このことから、光固定化法はSPR, QCMセンサーチップ固定化法としても有用であると考えられる。

SPRにおいては、マイクロアレイにより多項目の同時測定も可能となってきた。従来法ではタンパク質のみ、DNAのみであればひとつのセンサーチップ上に固定化することが可能だが、多様な生体分子を一度に固定化することは困難であった。しかし、この光固定化技術を用いることで多種の生体分子を金基板センサーチップ上に一斉に固定化し、測定することも可能であると考えられる。自己免疫疾患関連抗原であるタンパク質、DNAなども一斉にセンサーチップ上に搭載することが出来ると考えられるため、診断用システムのひとつとして今後進展することが期待される。

## E. 結論

光固定化法を応用することで、SPRやQCMの金基板センサーチップへも多様な生体分子を固定化可能であることが示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

S. Tsuzuki, A. Wada, and Y. Ito, "Photoimmobilization for SPR and QCM measurements", in preparation.

### 2. 学会発表

続佐紀, 伊藤嘉浩. SPRセンサーチップへの生体分子の光固定化法. 第28回バイオマテリアル学会大会, 東京都, 2006年11月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者：伊藤嘉浩

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名            | 書籍全体の編集者名     | 書籍名       | 出版社名    | 出版地 | 出版年  | ページ     |
|------|--------------------|---------------|-----------|---------|-----|------|---------|
| 伊藤嘉浩 | 「マイクロコンタクトプリンティング」 | 山根恒夫、松永是、民谷栄一 | 「ナノバイオ辞典」 | テクノシステム | 東京  | 2006 | 539     |
| 伊藤嘉浩 | 「マイクロパターン技術」       | 田畑泰彦、赤池敏宏     | 「再生医療」    | コロナ社    | 東京  | 2006 | 221-235 |

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名                     | 巻号    | ページ       | 出版年  |
|--|--|--------------------------|-------|-----------|------|
| Y. Ito, M. Heydari, A. Hashimoto, T. Konno, A. Hirasawa, S. Hori, K. Kurita, and A. Nakajima | "The movement of a water droplet on a gradient surface prepared by photodegradation" | <i>Langmuir</i>          | 23    | 1845-1850 | 2007 |
| Y. Ito   | "Photoimmobilization for microarrays,"   | <i>Biotechnol. Prog.</i> | 22(4) | 924-932   | 2006 |
| 阿部洋、和田章、伊藤嘉浩   | 「新機能性核酸・蛋白質を生み出すコンピナトリアル・エンジニアリング」   | 日本生物工学会誌                 | 84(8) | 310-312   | 2006 |
| 伊藤嘉浩、大村馨   | 「アレルギー診断用抗原マイクロアレイチップ」   | アレルギーと臨床                 | 26(7) | 557-560   | 2006 |
| 伊藤嘉浩、大村馨   | 「なんでも固定化バイオチップ」  | バイオインダストリー               | 23(6) | 27-34     | 2006 |