

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 伊藤 嘉浩

平成 20 (2008) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

- 免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究…………… 3
伊藤 嘉浩

II. 分担研究報告

1. 免疫疾患診断プロテイン・チップの開発に関する研究…………… 13
上阪 等
2. 免疫疾患診断プロテイン・チップ開発用の抗ヒストン抗体標準血清確立
に関する研究…………… 17
諏訪 昭

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 33

I .総括研究報告

免疫疾患診断プロテイン・チップの開発

主任研究者 伊藤嘉浩

独立行政法人理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

研究要旨

前年度までに従来法との相関性を詳しく調べるなど、自己免疫疾患診断プロテイン・チップおよびそれに伴う診断システムの構築を目指した研究を行ってきた。その結果、多項目同時測定を可能とするシステムを構築した。しかし一方で、医療分野で多く求められるのは、多検体を同時に測定する方法であり、構築した本システムではそれが難しい。そこでプロジェクトの最終年度にあたる本年度は、このような背景をもとに、本システムをより臨床診断応用しやすいようなシステムに改良し、最終的な成果として完成させた。

分担研究者

上阪 等：東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 膠原病・リウマチ内科学 准教授

諏訪 昭：東海大学 医学部内科学系 リウマチ内科 准教授

A. 研究目的

自己免疫疾患は免疫系が内因性自己抗原に反応して起こる疾患で、自己細胞成分に対する種々の自己抗体が血清中に産生されることを基本的特徴とする。これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し、疾患の診断や病型分類、治療効果判定、生命予後推定など臨床的に極めて重要である。しかしながら、現在の抗体測定法は多数の抗体の解析に適さず、旧来の ELISA 法に基づく方法であるため、測定できる抗原の種類も限られていた。本研究では、我々が開発した抗原マイクロアレイを応用し、細胞内外の分子に対する自己抗体およびこれら分子発現や相互作用を自己免疫疾患患者において解析することを目的としている。この技術の特徴は、

- 1) どのような生体分子も共有結合で安定にマイクロアレイ固定化が可能。
- 2) ランダム配向で固定化でき、固定化物の有効濃度が高い。
- 3) 非特異的吸着を抑制して高い S・N 比を実現。

であり、この技術を用いれば、多数の自己抗体を短期間に検出でき、かつ従来にない自己抗体も検出可能であることから、疾患の早期診断や従来診断が困難だった自己免疫疾患の診断を容易にするものと期待される。かかる研究は、自己免疫疾患の診断や病態の把握、治療効果判定など日常臨床に直ちに応用可能なばかりでなく、病気解明の端緒となる先駆的な技術となることが期待される。

B. 研究方法

自己免疫診断チップの作製は以下のように行った。

- 1) フェニルアジド基と分子量約 500 のポリエチレングリコール基を側鎖にもつメタクリル系ポリマーを光反応性マトリックスとし、終濃度 1% となるように調製した。

- 2) スピンコート(5000rpm×30sec)によってチップ上へ調製したポリマーサンプルのプレコートを行った。
- 3) 0.09Mpa で 15 分間減圧乾燥した。
- 4) ブラックライトにて7分間 UV 照射した。
- 5) ビスアジドを抗原に対して10%となるように混合し、抗原サンプルを調製した。
- 6) 調製した抗原サンプルをプレコートしたチップ上に DNA アレイヤーを用いてスポットした。
- 7) 常温常圧で7分間乾燥後、ブラックライトにて7分間 UV 照射した。

化学発光法による検出は以下のように行った。

- 1) チップを PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて3分間洗浄した。
- 2) 0.1MPa で 5 分間減圧乾燥した。
- 3) 固定化した抗原に対応する抗体または血清(各種自己抗体陽性血清、インフォームドコンセントのもとに頂いた患者血清(リン酸緩衝液で100倍希釈)など)を一次反応溶液とし反応させた。
- 4) PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて3分間洗浄した。
- 5) HRP labeled anti-rabbit IgG(GE healthcare 製、10%BSA 入り PBS にて100倍希釈) または HRP labeled anti-human IgG(Amersham 製、10%BSA 入り PBS にて4000倍希釈)を滴下し、ミキサーにて20分間反応した。
- 6) PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて3分間洗浄した。
- 7) ECL Advance(GE healthcare 製)を用いて化学発光法による検出を行った。

Hep-2 細胞からの核画分の抽出は PIERCE 社製の抽出キットを用いてプロトコールに従って行った。

- 1) PBS にて2回洗浄を行い、回収した細胞： 1.4×10^7 cells に CER I を加えた。
- 2) ボルテックスにて15秒間激しく攪拌した。
- 3) CER II を加え、5秒間ボルテックスにて激しく攪拌を行い、その後氷中で1分間、インキュベートした。
- 4) ボルテックスにて5秒間、再度激しく攪拌し、15000rpm にて5分間遠心した。
- 5) 得られた上澄みを冷やしておいたチューブに移す。これを細胞質画分とした。
- 6) NER を加えて15秒間ボルテックスにて激しく攪拌、その後氷中で10分間、インキュベートした。これを4回繰り返す、その後15000rpm にて5分間遠心した。
- 7) 得られた上澄みを冷やしておいたチューブに移した。これを核画分とし、 -80°C で保存した。

※CER I、CER II、NER にはあらかじめ protease inhibitor を加えておいた。

(倫理面への配慮)

患者血清は、慶應義塾大学倫理委員会での承認を経てインフォームドコンセントを得て取得し、独立行政法人理化学研究所での倫理委員会の承認をへて研究を行った。

C. 研究結果

これまで全身性の自己免疫疾患を対象とし抗核抗体を中心とした検査項目を搭載して、評価を行ってきたが、さらに肝臓、甲状腺、腎臓など局所的な自己免疫疾患に関与する自己抗体も新たなコンテンツとして追加し、より多項目を同時に検査できる自己免疫疾患診断チップの確立を目指した。そのためには、これまでよりも高密度にアレイデザインされたチップが要求される。しかし、従来使用していたインクジェット式のマイクロアレイではこの実現は難しいと考えられた。そこで本年度よりマイクロアレイには、微小領域へのマイクロアレイを可能にし、より少ない試料から多くの情報が得られるように、従来のインクジェットタイプ(吐出型)のアレイヤーではなく、スタンプタイプ(接触型で、DNA マイクロアレイに多用される)のアレイヤーを用いた。この変更に伴い、抗原固定化量、スポット間隔等、これまでのマイクロアレイ・チップの作成条件を見直し、新規アレイヤーでの最適化を図った。

その結果、サンプル濃度はインクジェットタイプよりも高い濃度が求められると考えられるが、新規アレイヤーによって 2.5mm^2 に 1~64 スポットができるようになり、図1に示すようにアレイの高密度化を図ることができた。

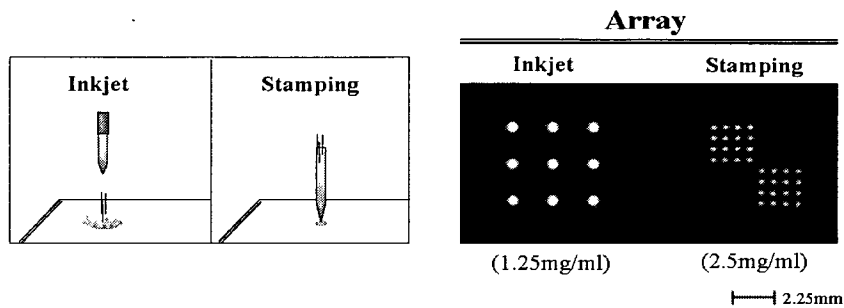


図1 インクジェットタイプとスタンプタイプの違い

次に、自己抗体の検出ツールにおいて、いまだに顕微鏡により細胞の蛍光観察を行う手法(間接蛍光抗体法)がとられているスクリーニングの抗核抗体検査(図2)について、検査項目としてマイクロアレイ・チップに組み込むことを目的として、HEP-2細胞より抽出した核画分溶液をマイクロアレイ固定化し、化学発光による測定を行った。その結果、各種血清に対応した結果が得られ、アレイ型検査でも測定可能であることがわかった。また異なる日に抽出・調製した核画分溶液でも同様の結果が得られ、再現性を確認することができた(図3)。

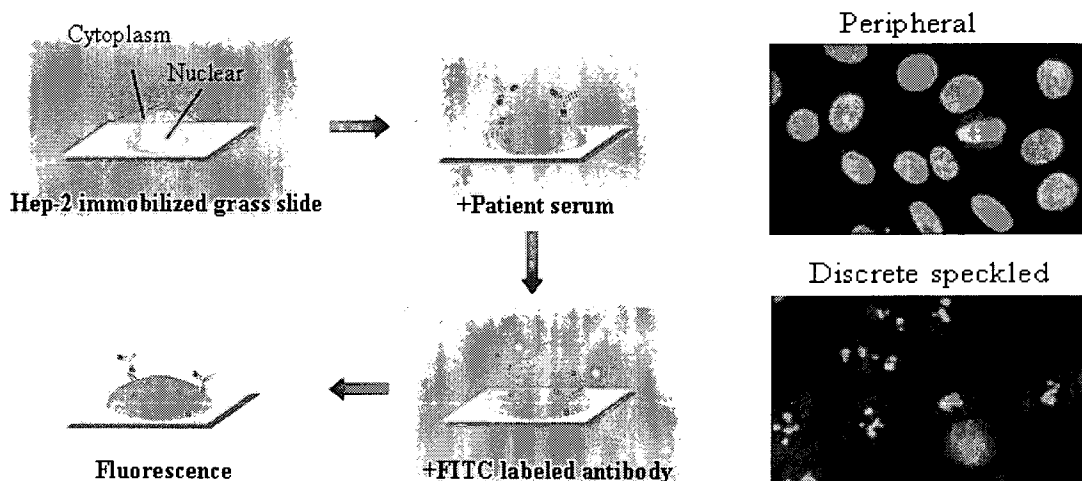


図2 間接蛍光抗体法

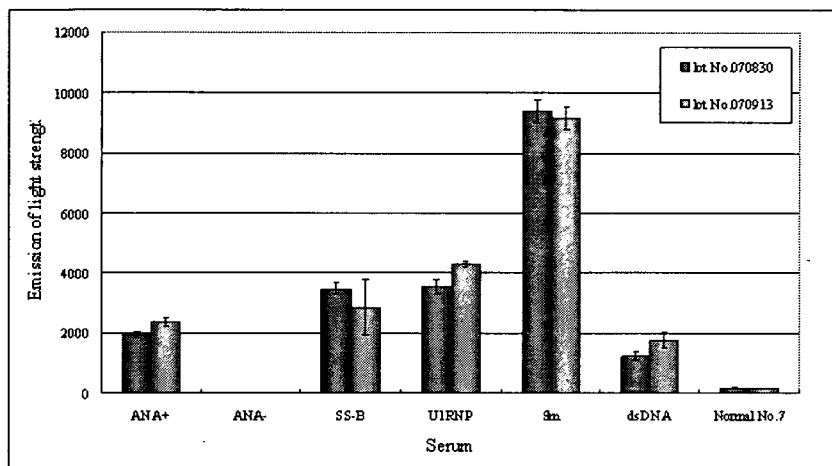
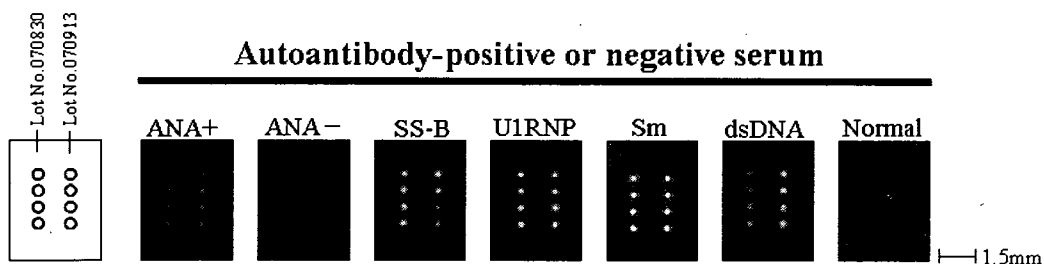


図3 マイクロアレイによる抗核抗体検査

また、これまでに8種の自己抗原を搭載した自己免疫疾患診断チップについて従来法であるELISA法との比較を行ったところ、各種検査項目で高い相関を得たが、臨床検査に用いるためには少なくとも $R=0.9$ 以上が要求されると考えられる。そのため、 $R=0.9$ を満たしていない項目について改善していかねばならないが、従来法と同様の自己抗原を用いることで高い相関が得られた抗SSA、Sm抗体の評価結果の例もあり、これらについても従来法に用いられるものと同様の抗原を用いることで、相関が $R=0.9$ 以上となるのではないかと考えられる(表1)。

Autoantigen	Detected	Correlation coefficient
SS-A	Anti SS-A antibody	0.94
SS-B/La	Anti SS-B antibody	0.92
U1snRNP68kDa	Anti U1RNP antibody	0.83
Sm	Anti Sm antibody	0.92
Scl-70	Anti Scl-70 antibody	0.97
dsDNA(Plasmid)	Anti dsDNA antibody	0.89
CENP-B	Anti Centromere antibody	0.97
IgG from goat serum	IgM-RF	0.85

表1 ELISA法による評価結果との相関(前年度までの結果)

本年度、従来法と同様の自己抗原を MBL より提供されたので、まず従来法との相関が 0.89 であった抗 dsDNA 抗体について新規アレイシステムによる診断チップの作製が可能であることを示す意味も含め、標準血清を用いて評価を行った。結果、ELISA データとの高い相関を示し、従来法と同一の自己抗原による相関性向上の可能性、および新規アレイシステムによる診断チップの作製が可能であった (図 4)。

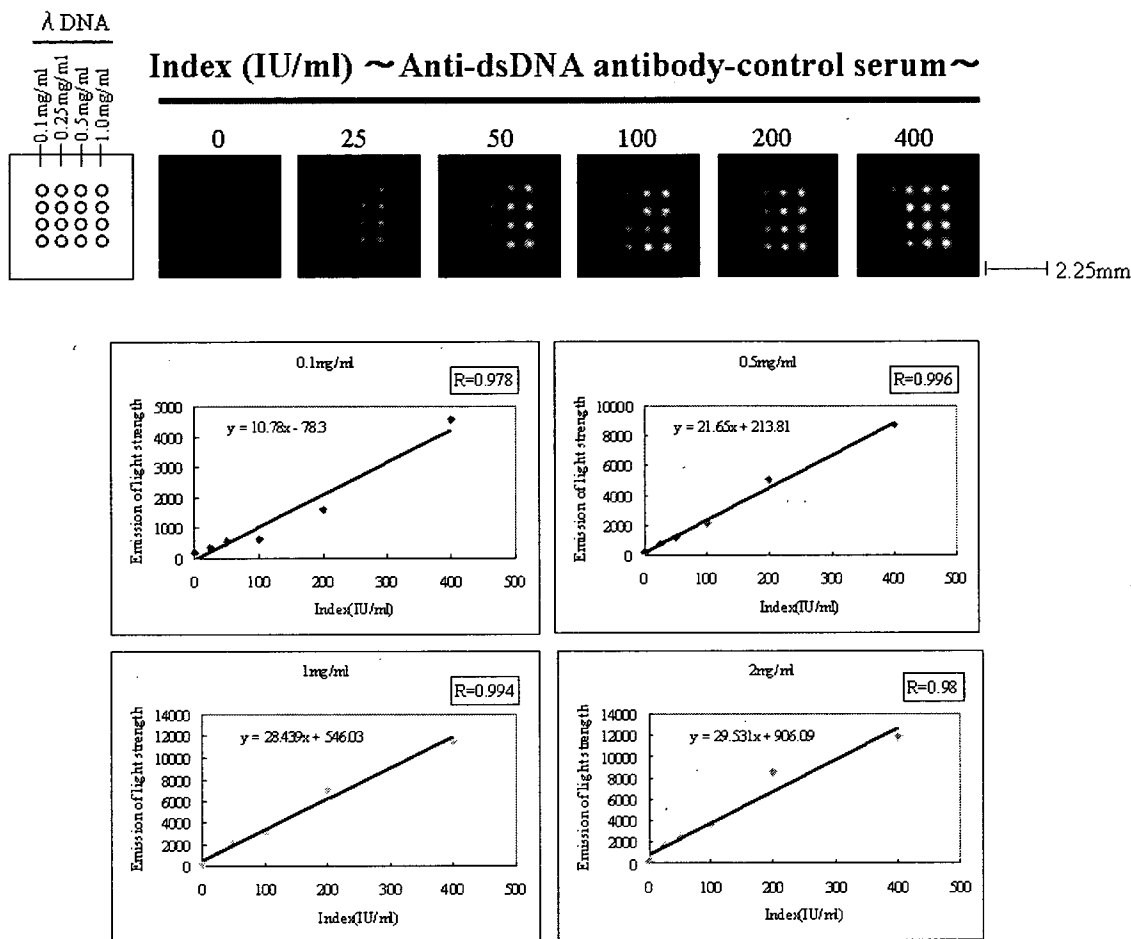


図 4 λ DNA を用いた抗 dsDNA 抗体検査

これまでハイインパクトポリスチレン(HIPS)基板を使用してきたが、HIPS は材質上、加工時に反り、傷がつきやすく、また比較的しなるため、基板に接触させてアレイする新規アレイヤーではその特徴が欠点となり、評価に影響すると考えられる。このような材質上の問題がないのは金属基板と考えられ、性能としても HIPS と同等の基板があれば代替基板となりうると思われる。そこで、金属基板として金蒸着基板 (Au)、クロム蒸着基板 (Cr) を候補として考え、固定化サンプルとして λ DNA を用いて検討を行った。その結果、図 5 に示すように Au ではシグナルが非常に低かったのに対し、Cr 基板は高いシグナルを示し、HIPS の代替基板となりうるということがわかり、Cr 基板を用いたシステムとすることを決定した。

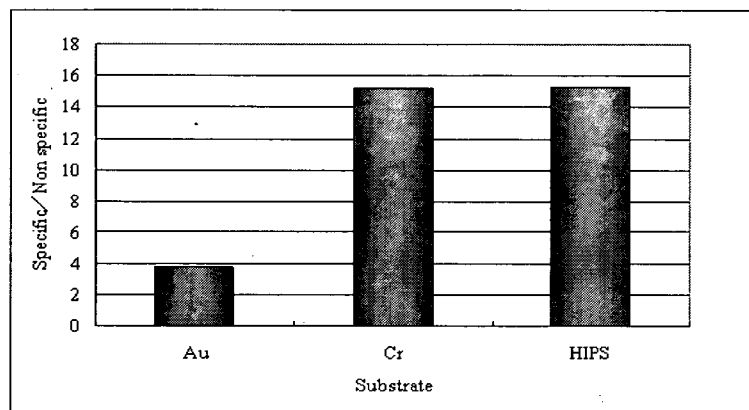
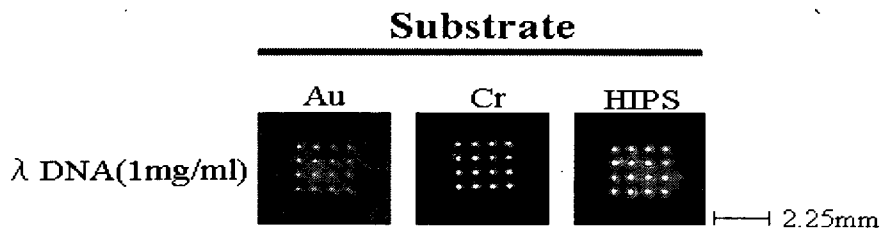


図5 金属基板の検討

最終的に自己免疫疾患診断プロテインチップをより臨床診断に応用しやすくするためには、多検体をできるだけ短時間に測定できるシステムへ改良することが必須である。これまで開発した多項目同時測定が可能なマイクロ流路デバイスは、一測定に40-50分を要し、複数検体の同時測定を行うためには、装置がさらに大型化かつ高価になってしまうという問題点があった。そこでマイクロプレートを用いたウェル型の開放系測定システムとすることにより、それが可能となるのではないかと考え(図6)、装置の開発を株式会社モリテックスとの共同で行いとして完成させた(図7)。マイクロアレイ・チップにウェル(黄色)を載せ、自動化装置へ装填し(図7では手前)、装置内で血清サンプル滴下、洗浄、反応を経て化学発光を測定する。分注用のピペットチップを図7奥のように配し、サンプル分、洗浄液、および反応液分注のたびに交換できるようにした。最高48検体を並行して連続的に処理できるようにした。

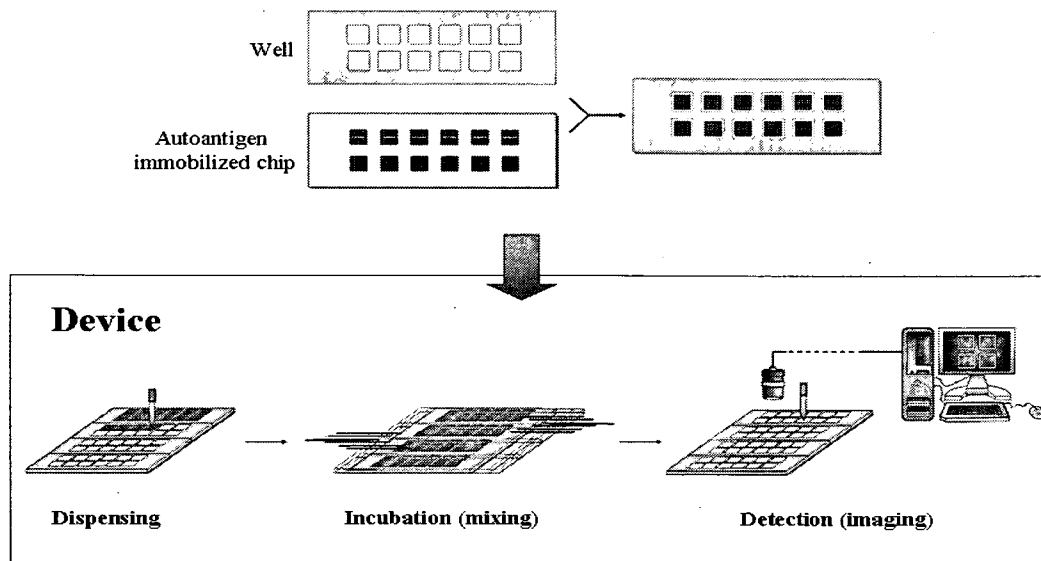


図6 新規自動装置の概要

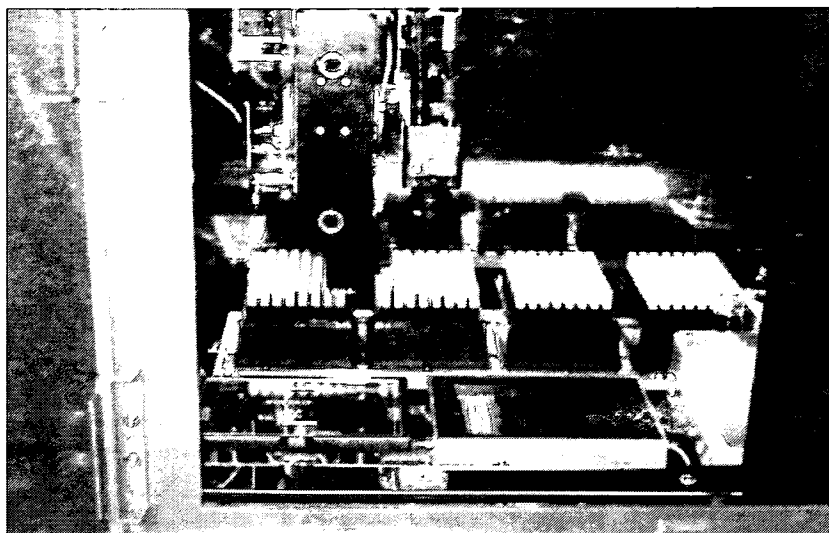


図7 完全自動化測定装置の内部写真

D. 考察

従来法の方法にくらべ多項目検査が短時間で高効率に行うことができるプロテイン・チップ測定システムを開発することができた。また、従来は不可能であった検査項目も同時に測定できるようになり検査の効率化に向けた基盤を作ることができた。

E. 結論

臨床ニーズに対応した検査システムを完成することができたので、臨床検査会社などと製品化にむけた展開を行いたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

1. 伊藤嘉浩、「マイクロアレイ・バイオチップの最新技術：マイクロアレイ・バイオチップの基礎」伊藤嘉浩監修、シーエムシー出版、p.3-10 (2007)
2. 伊藤嘉浩、「マイクロアレイ・バイオチップの最新技術：固定化技術－生体分子のマイクロアレイ固定化法」伊藤嘉浩監修、シーエムシー出版、p.91-109 (2007)
3. 伊藤嘉浩、「マイクロアレイ・バイオチップの最新技術：マイクロアレイ・バイオチップの応用」伊藤嘉浩監修、シーエムシー出版、p.165-180 (2007)
4. 和田章、阿部洋、伊藤嘉浩、「抗体医薬の最前線：アプタマー医薬」植田充美監修、シーエムシー出版、p.213-225 (2007)

雑誌

1. H. Mojgan, H. Hasuda, M. Sakuragi, Y. Yoshida, K. Suzuki, and Y. Ito, “Modification of the titan surface with photoreactive gelatin to regulate cell attachment”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **83**, 906-914 (2007)
2. T. Ishii, A. Wada, S. Tsuzuki, M. Casolaro, and Y. Ito, “Copolymers Including L-histidine and hydrophobic moiety for preparation of nonbiofouling surface”, *Biomacromolecules*, **8(11)**, 3340-3344 (2007)
3. Y. Ito, H. Hasuda, M. Sakuragi, and S. Tsuzuki, “Surface modification of plastic, glass and titanium by photoimmobilization of polyethylene glycol for antibiofouling”, *Acta Biomater.*, **3**, 1024-1032 (2007)
4. G. Chen, N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, and T. Tateishi, “Grip pattern of nanothick mic rogel network” *Langmuir*, **23**, 5864-5867 (2007)
5. L. Guo, N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, J. Tanaka, T. Tateishi, X. Zhang, and G. Chen, “Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on photoreactive polymer-modified surfaces,” *Biomaterials*, **29**, 23-32 (2008)
6. Y. Ito, “Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering,” *Soft Matter*, **4(1)**, 46-56 (2008)
7. M. Casolaro, Y. Ito, T. Ishii, S. Bottari, F. Spaperi, and R. Mendichi, “Stimuli-responsive poly (ampholyte)s containing L-histidine residues : synthesis and protonation thermodynamics of metacrylic polymers in the free and in the cross-linked gel forms” *Express Polymer Letters*, **2(3)**, 165-183(2008)
8. Y. Ito, “Control of water droplet movement” *高分子*, **56(12)**, 973 (2007)
9. 伊藤嘉浩、「再生医療のための幹細胞増殖基材」、*膜*, **32(5)**、276-280 (2007)
10. 伊藤嘉浩、「幹細胞培養のためのナノ界面創成バイオリアクター」*化学*, **62(7)**、38-41 (2007)
11. 伊藤嘉浩「ナノ界面テクノロジーによる機能表面創出」、*高分子論文集*, **65**, 6-19 (2008)

2. 学会発表

松平崇弘、伊藤嘉浩、上阪等、諏訪昭「自己免疫診断プロテインチップ」第19回日本アレルギー学会春季臨床大会、2007年6月

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

伊藤嘉浩、特許公開2007-302745、共重合体、表面改質剤、物質吸着抑制剤および親水化処理剤 他2件出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ.分担研究報告

免疫疾患診断用プロテインチップの開発に関する研究

分担研究者 上阪 等

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科 准教授

研究要旨

〔目的〕新たに開発したプロテインチップを用いて、多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）の免疫診断に使われる抗核抗体である抗 Jo-1 抗体について、その発症との関連を研究し、疾患の早期発見と病態解明に役立てる。〔方法〕まず、骨格筋 C タンパクを用いて多発性筋炎のモデルマウスを開発し、そのマウスの血清中の自己抗体を解析した。さらに、マウスの抗 Jo-1 抗体の抗原であるヒスチジル tRNA 合成酵素（Jo-1）タンパクを作成した。方法は、6xHis タグが付加されたベクターにマウス Jo-1 の DNA を組み込み、タンパク発現プラスミドを作成し、タンパク誘導させた後、ニッケルアフィニティーカラムにて精製、PBS 中にてリフォールディングを行うものである。〔結果〕C タンパクの免疫で筋炎を惹起することが出来、抗核抗体が検出された。作成した組換え Jo-1 タンパクは可溶性で、SDS-PAGE 及びウエスタンプロットにて一本のバンドとして確認でき、プロテインチップへの搭載が可能なレベルに精製できた。新しいマウスモデルとチップを用いて、Jo-1 抗体の関与を研究する展望が開けた。

A. 研究目的

免疫診断用チップを疾患の早期発見、病態解明に役立てるため、膠原病の一つである多発性筋炎(PM)のモデルマウスを開発し、その自己抗体のできる過程を経時的に明らかにする。さらに、PMに特徴的な自己抗体とされる抗ヒスチジルtRNA合成酵素/Jo-1自己抗体を能動免疫によって人為的に誘導し、筋炎との関連を探索する。に病態解析や、特異的治療法開発が遅れてきた。我々は、新しく多発性筋炎のマウスモデルを確立し、自己免疫性筋炎の病態解析とともに、とくにサイトカインを標的とした、新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. ヒトまたはマウス骨格筋 C 蛋白フラグメント誘導性関節炎の樹立

ヒトまたはマウス骨格筋 C 蛋白フラグメントを遺伝子組み換え技術を用いてタンパク発現ベクターpQE-30に挿入し、大腸菌内で発現させて精製した。このタンパクと Complete Freund's Adjuvant (CFA)と混合してアジュバントを作成、B6 マウスの背部と足底に1回皮内注射するとともに、百日咳毒素(PT)を腹腔内投与した。このマウスの大腿筋について組織学的解析にて筋炎評価を行い、筋力低下も評価した。筋炎筋組織は、浸潤炎症性細胞の免疫組織学的検討も行った。血清中の自己抗体を HEp-2 細胞を基質として解析した。

2. 組換えマウスJo-1タンパクの作成と抗体誘導

pQE-30ベクターに、マウスJo-1DNAを挿入し、大腸菌内でJo-1タンパクを発現誘導させた。これらは不溶画分にあるため、細胞膜破碎後、得られた上清をNi-NTA gelを充填したカラムに通し精製を行った。その後

エンドトキシン処理を施し、PBSを用いて段階的に尿素バッファの濃度を希釈しながら約48時間リフォールディングを行った。ブラッドフォード法にてタンパク濃度及び収量を測定し、再生セルロース膜3.000MWCOのスピカラムで目的濃度1mg/mlまでタンパクを濃縮した。完成したタンパクをSDS-PAGE及び銀染色を行い、分子量を確認した。また、多発性筋炎患者より採取した血清、抗6xHis抗体を用いたウエスタンブロットを行った。さらに、この精製マウスJo-1をCFAと混合してマウスに免疫した。

C. 研究結果

1. C蛋白フラグメントを免疫し、21日目に、筋組織をHE染色で組織学的に評価したところ、筋束周囲の結合織であるperimysium、perivascular areaに比較して、筋束内の結合織であるendomysium優位に単核球の浸潤を認めた。また、PM同様、未壊死筋線維への単核球のinvasionの像が認められ、その大部分はCD8陽性であった。さらに、Rotarod testで有意に走行時間の短縮を認めた。経時的な組織学的解析では、7日目から筋組織への単核球浸潤を認め、14-21日目をピークに軽快し、49日目には筋炎はほぼ治癒した。

次に、免疫組織学的解析で、CD4、CD8 陽性細胞、マクロファージ、B 細胞の局在を検討した。CD4 陽性細胞は筋肉全体に局在していたのに対して、CD8 陽性細胞は endomysium に相対的に多く浸潤していた。マクロファージは各部位で最も多く浸潤しており、B 細胞は少数のみ浸潤していた。また、大部分のパーフォリン陽性細胞は、CD8 陽性細胞同様、endomysium の未壊死筋線維周囲に浸潤していた。抗核抗体は、免疫後 28 日では、抗細胞質抗体が、免疫 49 日後では抗核抗体が認められた(図1)

2. 組換えマウスJo-1タンパクをSDS-PAGEで展開して、Coomassie blueでcDNAから推測されると同じ分子量60kDa付近に染色されるタンパクが認められた(図2)。

このタンパクを抗 Jo-1 抗体陽性の多発性筋炎患者血清で染色したところ、組換えタンパクが特異的に染色された。現在、この抗原をマウスに免疫している。

D. 考察

プロテインチップを使う応用研究の基盤として、自己抗体を血清中に産生する多発性筋炎のマウスモデルを作ること成功した。この抗体の性格付けに重要となる組換え Jo-1 抗原の精製にも成功し、プロテインチップ搭載が可能となった。今後、Jo1 抗原の免疫によって得られる自己抗体と、モデル動物の作る自己抗体についてチップでの解析を進めることにより、両者のエピトープの差、疾患発症と抗体産生の関連などが解析できる。

E. 結論

多発性筋炎における抗 Jo-1 自己抗体産生に関し、プロテインチップ技術を応用して用いることができる実験系を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Sugihara T, Sekine C, Nakae T, Kohyama K, Harigai M, Iwakura Y, Matsumoto Y, Miyasaka N, and Kohsaka H. "A new murine model to define critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis" *Arthritis Rheumatism* 56(4):1304-1314, 2007

学会発表

1. 杉原毅彦、沖山奈緒子、宮坂信之、上阪 等. 新規多発性筋炎モデルマウスにおけるIL-1レセプターアンタゴニストの治療効果の検討. 第51回日本リウマチ学会総会、横浜、2007年4月
2. 沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等. 新規モデルマウスが示す多発性筋炎 Interleukine-6 標的治療の有効性. 第 51 回日本リウマチ学会総会、横浜、2007 年 4 月
3. 沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等. 多発性筋炎新規モデルマウスが示す Interleukine-6 の役割とその標的治療の有効性. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007 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

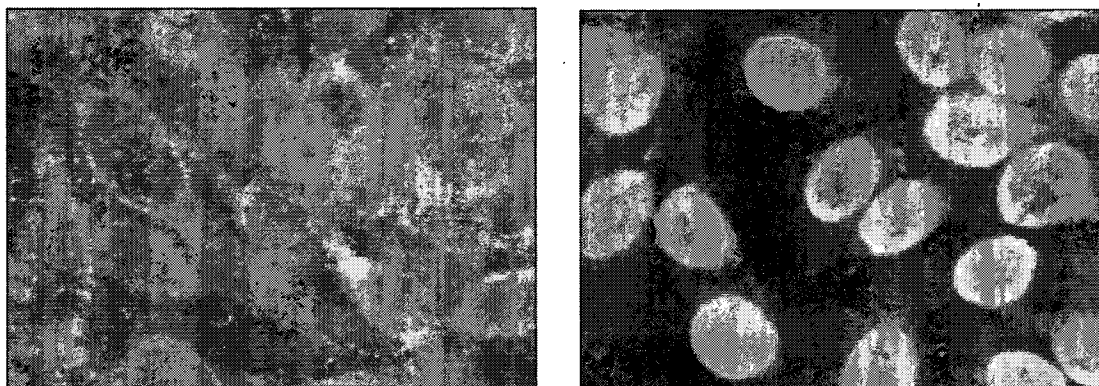


図1 抗核抗体 実験筋炎誘導のための免疫後 28 日目と 49 日目のマウス血清中の自己抗体

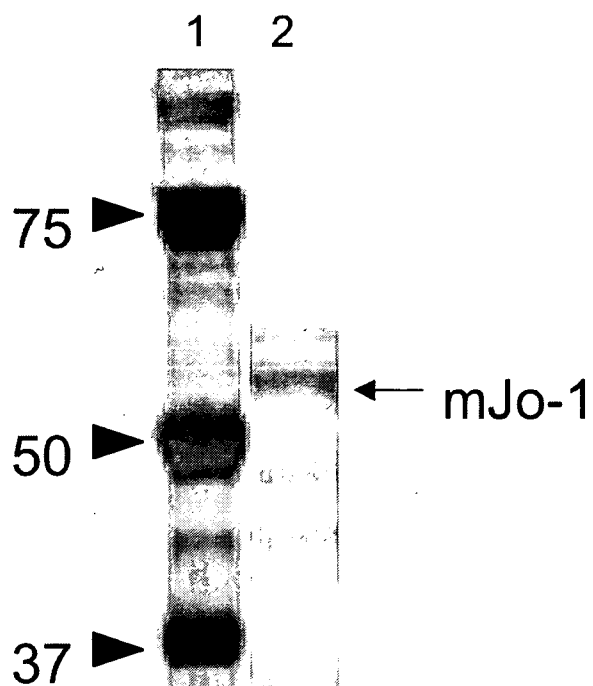


図2 マウス Jo-1 タンパク精製後における SDS-PAGE 及び銀染色図
 レーン1:分子量マーカー(単位 kDa)、レーン2;マウス Jo-1 精製タンパク

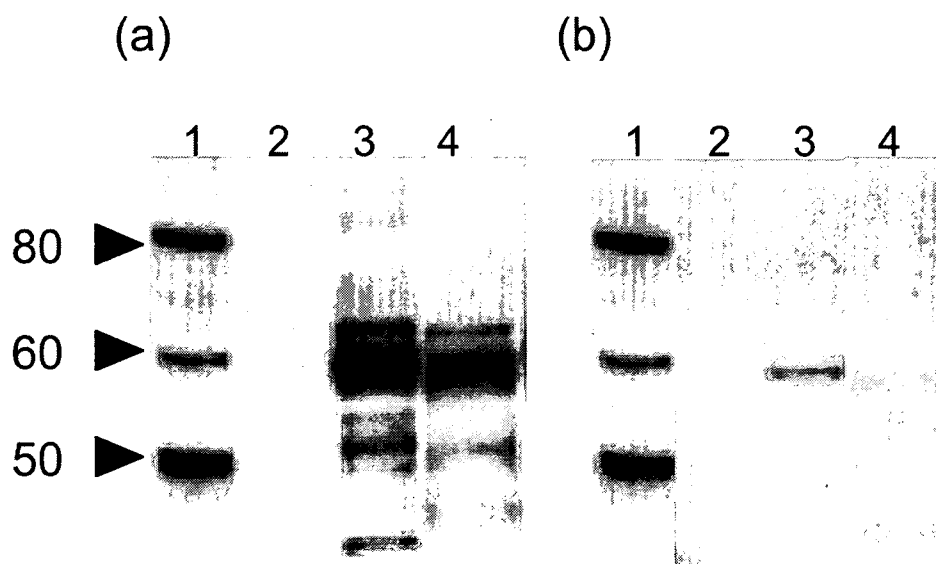


図3 マウス Jo-1 タンパクのウエスタンブロット
 (a)多発性筋炎患者血清、(b)抗 6xHis 抗体。レーン1;蛍光標識分子量マーカー(単位 kDa)、レーン2:
 マウス Jo1 タンパク IPTG 非誘導大腸菌タンパク溶出物 レーン3:マウス Jo1 タンパク IPTG 誘導大腸菌
 タンパク溶出物レーン4: マウス Jo-1 精製タンパク

免疫疾患診断プロテインチップ開発用の抗ヒストン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 准教授

研究研究者 平形道人 慶應義塾大学医学部内科 専任講師

鈴木康夫 東海大学医学部内科学系 教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス（SLE）は多彩な自己抗体産生を特徴とし、その血清中には疾患特異抗体である抗 Sm 抗体のほか、抗ヒストン抗体や、抗二本鎖 DNA（dsDNA）抗体が高頻度に見出される。近年、ヒストンと DNA の巨大分子複合体であるヌクレオソームが、自己免疫応答の標的として重要であることが示唆され、さらにヒストン構成蛋白である H1 に対する自己免疫の病因的意義も SLE モデルマウスにおいて報告されている。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ヒストン抗体検出を可能とするため、SLE 患者における抗ヒストン抗体とその対応抗原エピトープにつき追究した。ELISA による抗ヌクレオソーム抗体は SLE 123 血清中 112 血清が陽性（陽性率 91.1%）で、ヌクレオソームが主要な自己抗原であることが確認された。一方、SLE 患者血清中には抗 dsDNA 抗体も高頻度に検出され、抗ヌクレオソーム抗体との間に強い相関が認められた。さらに免疫プロットでヒストン各サブユニットに対する自己抗体を検討したところ、H1 と H2B に対する自己抗体が高率で、一部は H3 とも反応したが、H2A および H4 との反応はまれであった。SLE モデルマウスにおいて抗ヒストン抗体の主要なエピトープとされた H1⁰₂₂₋₄₂ は、ヒト SLE 患者血清中の抗ヒストン抗体では認識されず、SLE 患者における T 細胞および B 細胞エピトープの解析が必要と考えられた。

A.研究目的

膠原病は原因不明の炎症性疾患で、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、診断や治療法の選択、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機能の解明にも役立つ。抗ヒストン抗体および抗二本鎖 DNA（dsDNA）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る自己抗体であるが、ヒストンと DNA の結合したヌクレオソームが自己免疫応答を誘導する可能性が示唆され、抗ヒストン抗体産生機序の解明は重要と考えられている。クロマチンの最小基本単位であるヌクレオソームを構成するヒストンは H1, H2A, H2B, H3, H4 の 5 種類のサブユニットから構成されるが、H1 はヌクレオソーム構造に関与せず、ヌクレオソーム間の結合とクロマチンの構造保持に関わる他に、細胞の分化との関連も指摘されている¹⁻³⁾。近年、H1 のバリエーションである H1⁰ に対する自己免疫応答の病因的意義が SLE モデルマウスにおいて指摘され、そのエピトープが明らかにされている。本研究では、多数の日本人膠原病患者血清を用い、抗ヒストン抗体の免疫学的特異性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ヒストン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. 試料

1) 血清

1993年から2002年3月までに慶應義塾大学病院内科を受診したSLE患者123例およびDLE患者1例の保存血清を用いた。米国Albrecht Einstein医科大学Hardin博士より供与されたヒトヒストンH1⁰のアミノ酸22-42番目(STDHPKYSDMIVAAIQAEKNR)由来の合成ペプチドH1⁰₂₂₋₄₂を免疫して得たマウスモノクローナル抗体(C34)を、抗ヒストンH1⁰抗体の標準血清として用いた。SLEの診断は、米国リウマチ学会分類基準(1982年改訂, 1997年小改訂)に従った。

2) ヒストン蛋白

既報の方法で精製され、Hardin博士より供与されたヒストン蛋白を用いた。

2. 固相化酵素免疫抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA 法)

1) 抗ヌクレオソーム抗体の測定

抗ヌクレオソーム抗体は、Blue WELL NUCLEOSOME IgG Elisa キット (MBL 社) を用い、ELISA 法により行った。ヌクレオソームを固相化した ELISA プレートと 1:51 倍に希釈した血清を、室温で 30 分間反応させた。3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgG モノクローナル抗体と室温で 30 分間反応させた。3 回洗浄後、テトラメチルベンチジン/過酸化水素水 (TMB/H₂O₂) を加え、室温で 10 分間反応させた。自動分光高度計 (BIO-RAD 社, Model650) にて波長 450nm の吸光度 (OD 450) を測定した。判定にあたっては抗ヌクレオソーム抗体標準血清を用いた標準曲線により測定結果を標準化した。抗ヌクレオソーム抗体標準血清 S25 (25 U/ml) の示す OD 450 に 0.9 を乗じた値以下を示すものを陰性とした。

2) 抗二本鎖 DNA 抗体 (抗 dsDNA 抗体) の測定

抗 dsDNA 抗体は、MESACUP DNA-II テスト「ds」Elisa キット (MBL 社) を用い、ELISA 法により行った。λ ファージ由来の dsDNA を固相化した ELISA プレートと 1:101 倍に希釈した血清を、室温で 1 時間反応させた。4 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト γ 鎖モノクローナル抗体と室温で 1 時間反応させた。4 回洗浄後、TMB/H₂O₂ を加え、室温で 30 分間反応させた。自動分光高度計にて、OD 450 を測定した。判定にあたっては、WHO First international standard, 1985 (WO/80) に準拠したヒト標準血清を用い、測定結果を Index 値に換算した。12.0 IU/ml 以下を示すものを陰性とした。

3) 抗ヒストン H1⁰抗体の測定

ヒトヒストン H1⁰のアミノ酸 22-42 番目 (STDHPKYSDMIVAAIQAEKNR) 由来のペプチド H1⁰₂₂₋₄₂を抗原とした ELISA で抗ヒストン H1⁰抗体を測定した⁵⁾。すなわち、抗原をトリス緩衝液 (TBS, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.2) により 10µg/ml の濃度で希釈し、ELISA プレート (DYNATEC 社 IMMULON) に 4°C, 14 時間反応させ、固相化した。ELISA 洗浄液 (0.1% Tween 20/TBS) にて 3 回洗浄後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) /TBS と 4°Cで 14 時間反応させた。3 回洗浄後、血清を 1% BSA/TBS で 1:200~6,400 倍に希釈し、室温で 2 時間反応させた。

洗浄後、1:4,000倍希釈したアルカリホスファターゼ（ALP）標識抗マウスIgGモノクローナル抗体（Promega社）と、室温で2時間反応させた。3回洗浄後、パラニトロフェニルリン酸（PNPP, Sigma Aldrich社）を1mg/mlで溶解したジエタノールアミン酵素基質液（pH9.8）と反応させた。自動分光高度計（BIO-RAD社, Model650）にて、波長405nmの吸光度(OD 405)を測定した。

4. 免疫ブロット法 (immunoblotting)

免疫ブロット法は Towbin らの方法に準じた。すなわち、精製蛋白に3×ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）サンプルバッファー（62.5 mM 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30μl加え、5分間100°Cで加熱し、蛋白成分を抽出した。18% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）後、分画され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°Cで1時間反応させた。洗浄後、ALP標識抗ヒトIgG（Promega社）を二次抗体（1:5,000倍希釈）として、4°Cで1時間反応させた。再度洗浄後、ケミルミネッセンスキット（Santa Cruz社）による化学発光をオートラジオグラフィで検出した。

（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. ELISAによる抗ヌクレオソーム抗体の検出

抗ヌクレオソーム抗体は、Blue WELL NUCLEOSOME IgG Elisa キット（MBL社）を用い、検出した（図1）。SLE 123血清のOD 405は 2.26 ± 0.81 （平均±SD）であり、標準化後には 113.1 ± 114.8 U/mlとなった。SLE 123血清中112血清が陽性で、陽性率は91.1%と高率であった。陽性例のうち10血清が測定上限の400 U/mlを上回る高値を示した。

2. ELISAによる抗dsDNA抗体の検出

抗dsDNA抗体は、MESACUP DNA-IIテスト「ds」Elisaキット（MBL社）を用い、測定した（図2）。SLE 123血清のOD 405は 0.62 ± 0.77 （平均±SD）であり、標準化後には 104.9 ± 128.9 IU/mlとなった。SLE 123血清中113血清が陽性で、陽性率は91.9%と高率であった。陽性例のうち17血清が測定上限の400 IU/mlを上回る高値を示した。

2. 抗ヌクレオソーム抗体と抗dsDNA抗体の相関

抗ヌクレオソーム抗体と抗dsDNA抗体の相関を調べたところ、相関係数 $r = 0.84$ を示し、両者の間には強い相関が認められた（図3）。抗ヌクレオソーム抗体高値（ ≥ 400 U/ml）の10例では、9例が抗dsDNA抗体も高値（ ≥ 400 IU/ml）を示した。一方、抗dsDNA抗体高値（ ≥ 400 IU/ml）の17例中9例では抗ヌクレオソーム抗体が高値（ ≥ 400 U/ml）を示した。

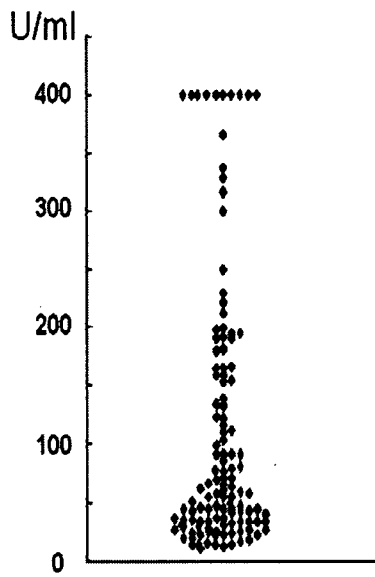


図1 全身性エリテマトーデスにおける抗ヌクレオソーム抗体

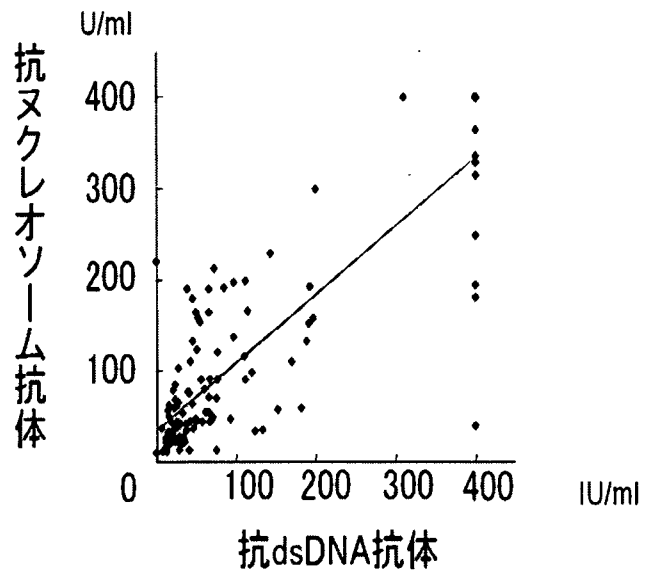


図3 抗ヌクレオソーム抗体と抗dsDNA抗体の相関

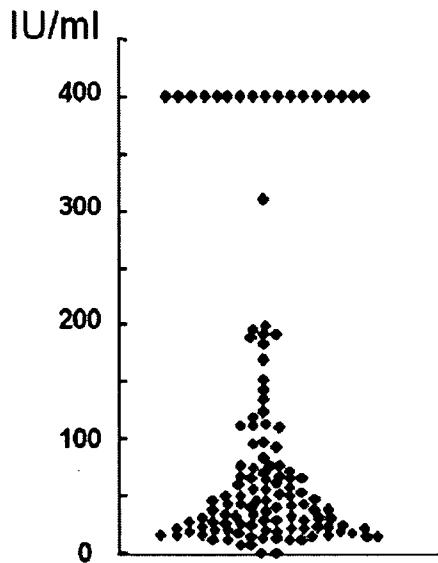


図2 全身性エリテマトーデスにおける抗dsDNA抗体

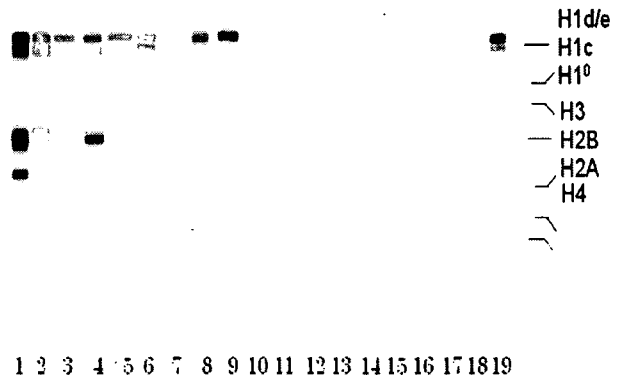


図4 SLE患者血清中の抗ヒストン抗体のヒストンサブユニットに対する反応性

4. ELISAによる抗ヒストンH1⁰抗体の検出

抗原としてH1⁰₂₂₋₄₂を5, 10, 50 μ g/mlの各濃度とし、一次抗体はC34を1:200~1:6,400倍に希釈し、至適条件を求めた。H1⁰₂₂₋₄₂を10 μ g/mlで固相化し、C34を1:400, 1:800, 1:1,600倍希釈したところ、OD 405は1.40, 0.81, 0.11を示した。一方、同条件下での正常マウス血清20匹のOD 405は、 0.06 ± 0.04 を示した。そこで、H1⁰₂₂₋₄₂を10 μ g/mlで固相化し、C34を1:400, 1:800, 1:1,600倍希釈した血清の示すOD 405を1,000, 100, 10 unitとし、測定値を標準化した。