

平成 21 年 4 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790779  
 研究課題名（和文） 皮膚筋炎/多発性筋炎における抗 155/140kDa 蛋白抗体の抗原特定  
 研究課題名（英文） Identification of antigen for anti p155/140 autoantibody in dermatomyositis/polymyositis  
 研究代表者  
 加治 賢三 (KAJI KENZO)  
 金沢大学・医学系・助教  
 研究者番号：40401913

## 研究成果の概要：

皮膚筋炎には多数の自己抗体が見出されるが、内臓悪性腫瘍合併皮膚筋炎に関連する自己抗体については未だに見出されていなかった。我々は 2007 年 1 月に免疫沈降法を用いて検索した結果、155kDa と 140kDa に沈降する自己抗体を見出し、臨床的解析を行った結果、本自己抗体が悪性腫瘍合併皮膚筋炎のマーカーであることを見出した (Rheumatology)。したがって本自己抗体の対する自己抗原を検出するため抗原解析を行った。

白血病細胞由来の K562 培養細胞を  $1.0 \times 10^9$  以上の大量の培養細胞と患者血清を使い、抗原抽出をした。最終的に 100ul に精製した。その中の 20ul を使い SDS-PAGE で電気泳動し、クマシーブルー染色、銀染色を行った。染色した結果クマシーブルー染色では染色されなかったが、銀染色にて 155kDa 付近に沈降する一群が認められ、本バンドを切り出し、LC-MS 解析を行ったが核内タンパク質の抗原は見出すことができなかった。

その後、2008 年 Targoff らが、抗原が Transcriptional intermediary factor 1- $\gamma$  (TIF1- $\gamma$ ) であることを見出し報告した。Targoff とともに確認実験したところ本自己抗体の抗原も TIF1- $\gamma$  であることが判明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	330,000	2,430,000

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：皮膚科診断学

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚筋炎(dermatomyositis:DM)/多発性筋炎(Polymyositis: PM)は全身性自己免疫疾患であり、PMに皮膚症状を有するのがDMである。DM/PMの原因は現在でも明らかではないが、その原因の一つとして自己免疫が示唆されている。DM/PMには核および細胞質に対する抗体(抗核抗体、抗細胞質抗体)が検出され、その抗原解析が近年多数解析されている。抗ARS抗体は抗Jo-1抗体を初め少なくとも7つ見出されており、それぞれ臨床的な差異があるものの概ね、慢性間質性肺炎、多発関節痛、手指の角化性局面(mechanic's hand)を有する事が多く、これらの自己抗体を持つ一群を抗ARS抗体症候群と言う。抗ARS抗体症候群ではDM/PMの生命予後を左右する急速進行性間質性肺炎や内臓悪性腫瘍の合併は低率であることも分かっている。抗Mi-2抗体は核内抗原蛋白の一つであり、臨床としては圧倒的にDMに多く認められ、PMでの抗体出現率は非常に少ない。また筋炎症状が強く、間質性肺炎の合併が低率であることも報告されている。最近見出された抗CADM-140抗体は、筋炎症状は軽微もしくはなく、皮膚筋炎に特徴的な皮疹を有する抗体であるが、本自己抗体陽性例の約50%が急速進行性間質性肺炎を合併することが分かっている。これらに示すように自己抗体の違いにより臨床的違いがあり、また生命予後なども左右する可能性があるため、PM/DMにおいて自己抗体を検出することは非常に大切である。

DMにおいて生命予後を左右する合併症の一つとして内臓悪性腫瘍がある、DMにおける内臓悪性腫瘍の合併率は約20-30%と言われ、胃癌などの消化器系悪性腫瘍や悪性リンパ腫など様々であり、DMに特徴的な悪性腫瘍というのではない。また悪性腫瘍合併皮膚筋炎は比較的進行癌が多く、速やかに悪性腫瘍を発見せねば治療が遅れるため、以前より悪性腫瘍合併皮膚筋炎における新しいマーカーを必要としていた。自己抗体の観点からいうと、悪性腫瘍合併皮膚筋炎の疾患特異的マーカーは未だかつて見出されておらず、もし悪性腫瘍合併皮膚筋炎のマーカーが見つければ、DMおよび悪性腫瘍の早期発見、早期治療ができるため、悪性腫瘍合併皮膚筋炎の疾患特異的マーカーの発見は急務であった。

2007年1月に我々が見出した、抗核抗体

の一つである抗155/140kDa蛋白抗体は皮膚筋炎に特異的に見出された自己抗体で約70%に悪性腫瘍が合併する自己抗体であり、本自己抗体が悪性腫瘍合併皮膚筋炎の疾患特異的マーカーであることが示された。しかしながら、155kDaと140kDaに対応する抗原は未だに見出されておらず、抗155/140kDa蛋白抗体の抗原解析をするのが主な目的となる。

## 2. 研究の目的

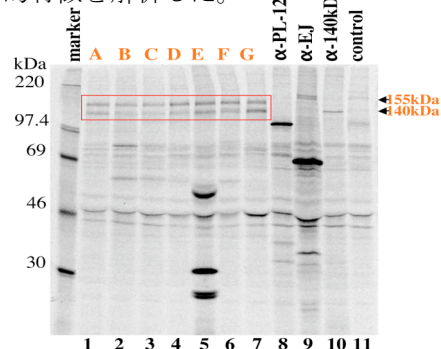
本研究の目的は抗155/140kDa蛋白抗体の疾患分布および臨床的特徴を調べ、また自己抗体の抗原を大量の培養細胞と患者血清を用い、抗原解析する。抗原解析後、その蛋白の特徴や、抗体陽性例ですべて反応するかを調べる。最終的にはリコンビナント蛋白を用いたELISA法を確立し、迅速に検査ができるようにする。

## 3. 研究の方法

実験は2年間で下記の順序で行った

### (1)抗155/140kDa蛋白抗体の疾患分布を調べた。

DM80例、PM30例、全身性エリテマトーデス130例、全身性強皮症250例、関節リウマチ30例、特発性間質性肺炎100例、正常人50例を用い、免疫沈降法を行い抗155/140kDa蛋白抗体の陽性群を特定した。免疫沈降法は蛋白成分の免疫沈降法である、protein-IPPとRNA成分の免疫沈降法であるRNA-IPPを用い、その中でProtein-IPPで155kDaと140kDaに反応する一群を抽出した(下図)。確認検査として標準血清をあらかじめ設定し、protein-IPPにおいて同時に泳動し、同じ位置に配列しているか確認した。これらの検査をした結果、抗体陽性例の臨床的特徴を解析した。



## (2)抗 155/140kDa 蛋白抗体の特異性解析

患者血清を大量に用い、また白血病細胞由来 K562 培養細胞を少なくとも  $1.0 \times 10^9$  用いて、抗原抽出し、その後 SDS-PAGE で展開し、クマシーブルー染色、銀染色を施行。155kDa もしくは 140kDa 付近に沈降したところを切り取り MS 解析した。

## (3)抗原蛋白を用いたウェスタンブロッティング法

見出された抗原蛋白のリコンビナント蛋白を購入し、患者血清を用いてウェスタンブロッティング法を施行する。具体的には各 well に 2ng のリコンビナント蛋白に IPP buffer 10ul で希釈した溶液を SDS-PAGE で電気泳動し、1 時間 transfer を行った後、blocking を行い、一次抗体に患者血清、二次抗体に anti-human AP-conjugated IgG を用い、AP 染色した。

## (4)抗原蛋白を用いた ELISA 法の確立

各 Well に 5ng のリコンビナント蛋白を 24 時間コーティングさせ、wash buffer で洗浄した後、抗体陽性例の血清、抗体陰性例の血清、一般健康人の血清を 100 倍希釈し、100ul 各 well に添加し、1 時間反応させる。その後二次抗体を加え、反応させた後、発色液を加えて、450nm の吸光度で吸光度を測定する。免疫沈降法、ウェスタンブロッティング法で陽性であった群と陰性であった群に ELISA 上、有意差があるかどうか解析した。

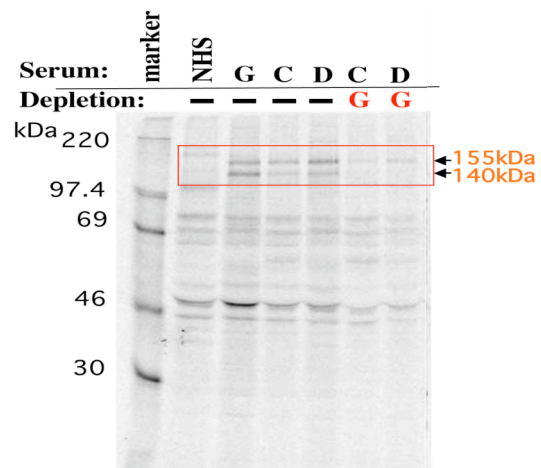
## 4. 研究成果

### (1) 抗 155/140kDa 蛋白抗体の疾患分布

DM80 例、PM30 例、全身性エリテマトーデス 130 例、全身性強皮症 250 例、関節リウマチ 30 例、特発性間質性肺炎 100 例と対象として正常人 50 例も用い免疫沈降法再度行った。DM80 例中、9 例に 155/140kDa に沈降する抗体が見出された。その他 PM、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、関節リウマチ、特発性間質性肺炎では本自己抗体は陰性であった。また正常人も陰性であった。9 例の抗体陽性例を詳しく調べると、HEp-2 細胞を用いた蛍光抗体法間接法では核内に染色され speckled pattern を呈し、その抗原が核内蛋白 (抗核抗体) であることが分かった。抗体陽性例 9 例のうち 6 例(67%)に悪性腫瘍を合併しており、悪性腫瘍合併皮膚筋炎 10 例中 6 例(60%)に本自己抗体が陽性であった。悪性腫瘍と皮膚筋炎の発生時期であるが、ほぼ同時期もしくは担癌患者であり、皮膚筋炎発症後数年を経て悪性腫瘍が見つかる症例が抗体陽性例では認められなかった。またその他の臓器病変であるが、間質性肺炎の合併は 1 例もなく、高率に flagellate

erythema を合併していた。

抗体陽性例 9 例について抗原が同一であるかの確認をするため、免疫沈降法を用いた Immunodepletion で調べた。具体的にはある一人の抗体陽性例を用いる。K562 培養細胞を sonication した後通常、ビーズと結合した患者血清 IgG を反応させ、抗原をとらえるが、その前に、抗体陽性例の一人の血清+ビーズを sonication した K562 培養細胞に添加し、あらかじめ目的の抗原をある程度除去した後、上澄みだけ抽出 (155/140kDa 蛋白が除去された抗原) をその他の患者血清+ビーズに反応させる。もし抗原が同一であるならば、バンドは減少もしくは消失する (下図)。



### 【図の説明】

標準血清である抗体陽性例 : G

抗体陽性例 : C, D

正常人血清 : NHS

G の血清で C, D の血清で depletion を行った。結果、右側 2 個のレーン (C, D) は 155kDa と 140kDa の沈降線は減少もしくは消失した。

したがって抗体陽性 9 例すべての自己抗原は同一であることが分かった。

### (2) 抗 155/140kDa 蛋白抗体の特異性解析

下記のごとく抗原解析を行った。患者血清 1cc に protein A sepharose 1000mg、IPP buffer 50ml を加え、一日転倒混和する。その後洗浄し、架橋剤である DMP を加え、1 時間転倒混和。その後、IPP buffer で洗浄した。K562 培養細胞を  $1.0 \times 10^9$  個集め、sonication した後、培養細胞とビーズ結合-IgG を混合し一日転倒混和する。

その後ビーズ結合 IgG+抗原を抽出し、Elution buffer を加え、抽出した抗原を SDS-PAGE で電気泳動し、銀染色を施行。155kDa 付近に沈降したバンドを切り出し、MS 解析を行った。

結果は変性 IgG とデスマブラキンが見出されたのみで、目的とする抗原は見出されなかった。

その後 Targoff らが、抗原を TIF1- $\gamma$  であることを見出した。その後、Targoff に依頼し、ウェスタンブロットで確認したところ同一抗体であることが判明した。

#### 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 1 件)

- ① 加治賢三、皮膚筋炎における新たな自己抗体  
皮膚科の臨床、2008年、3巻、p251-256  
査読なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

加治 賢三 (KAJI KENZO)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：40401913

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし