慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	抗CCP抗体陰性の関節リウマチ患者における特異的自己抗体の網羅的探索
Sub Title	Detection of specific antibody in patients with rheumatoid arthritis negative for anti-CCP antibody
Author	岩本, 卓士(Iwamoto, Takuji)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	関節リウマチ(RA)は多関節に炎症を生じる自己免疫疾患であり, 進行性の関節破壊を生じる難治性の疾患である. 本研究ではRAの早期診断を目的として, 血清中に存在する自己抗体を探索した. 約9000種類のヒトタンパク質に対する自己抗体を探索し, RA患者に高発現する自己抗体を複数抽出した. この結果を検証するためにさらに大規模サンプルにて詳細に検証したが, 特異的な自己抗体の確定には至らなかった.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2011 ~ 2012 課題番号 : 23791669 研究分野 : 医歯薬学 科研費の分科・細目 : 外科系臨床医学・整形外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23791669seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23791669
研究課題名（和文）　抗 CCP 抗体陰性の関節リウマチ患者における特異的自己抗体の網羅的探索
研究課題名（英文）　Detection of specific antibody in patients with rheumatoid arthritis negative for anti-CCP antibody
研究代表者
岩本　卓士（IWAMOTO TAKUJI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10348675

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）は多関節に炎症を生じる自己免疫疾患であり，進行性の関節破壊を生じる難治性の疾患である．本研究では RA の早期診断を目的として，血清中に存在する自己抗体を探索した．約 9000 種類のヒトタンパク質に対する自己抗体を探索し，RA 患者に高発現する自己抗体を複数抽出した．この結果を検証するためにさらに大規模サンプルにて詳細に検証したが，特異的な自己抗体の確定には至らなかった．

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease characterized by polyarthritis leading to progressive joint destruction. The purpose of this study is to detect the specific autoantibody in RA patients. We examined the serum autoantibodies for over 9,000 human proteins, and we detected several autoantibodies highly expressed in RA patients. Although we tried to validate these results in large samples, we could not confirm the specific antibody.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
キーワード：関節リウマチ，自己抗体，抗 CCP 抗体，プロテインマイクロアレイ

１．研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）は多関節に炎症を生じる自己免疫疾患であり，進行性の関節破壊を生じる難治性の疾患である．近年の治療薬の進歩，特に生物学的製剤の導入により以前に比べ疾患活動性の制御が可能になりつつあるものの未だその病態は解明されていない．近年では大規模なサンプルによる Genome wide association study により網羅的に遺伝子多型を解析することで RA の病態につながる可能性のある多くの遺伝子が報告されており，病態解明に向けて大きく前進してはいるものの，未だに結論は得られていない．

一方で生物学的製剤の登場により，RA の発症早期から十分な薬物療法を行うことで RA の進行をほぼ完全に抑制し，機能的・構造的寛解が得られることが可能となっており，いわゆる“window of opportunity”と称されるように発症早期に RA を的確に診断し，強力な薬物療法を行うことの重要性が強調されている．RA の診断においては従来より 1987 年にアメリカリウマチ学会により制定された RA の分類基準が使用されてきたが，発症早期の診断が困難であることから本年度 ACR/EULAR により RA の分類基準が 1987 年以来に約 20 年ぶりに新しく制定された．本分類基準において重要な要素であり，RA の早期

診断において現在最も有用な血清マーカーは RA に特異的な自己抗体である抗 CCP 抗体である．抗 CCP 抗体の保険適応により多くの患者で早期に積極的な治療を行うことによる寛解導入の可能性が高まった．しかし抗 CCP 抗体陰性の RA 患者もおよそ 15%程度，国内でも 10 万人以上存在すると予想され，リウマトイド因子，抗 CCP 抗体共に陰性の場合には ACR/EULAR の新分類基準を適応しても早期診断が困難ある．これら抗 CCP 抗体陰性の RA 患者をいかに早期診断し早期治療を開始するかが今後の RA 治療において最重要課題である

遺伝子領域では Genome wide association study により網羅的に遺伝子多型を解析することが可能となり膨大なデータを得ることが可能となっている．それと同様に近年プロテオミクス研究の進展により，シグナル伝達経路の追跡をはじめとした網羅的なタンパク質の活性測定，相互作用の解明にプロテインマイクロアレイが注目されている．抗体の特異性の解明と抗体開発，自己免疫バイオマーカーの同定なども可能となっており，自己抗体同定のスクリーニングとして極めて有用である．

２．研究の目的

プロテインマイクロアレイを用いて RA 患者の血清中に存在する自己抗体を網羅的に探索し，早期診断が困難である抗 CCP 抗体陰性の RA 患者における特異的自己抗体を同定する．さらに同定された自己抗体およびその抗原の持つ機能を解析し，RA の病因解明に繋げることを目的とする．

３．研究の方法

新規自己抗体の RA 早期診断における臨床応用に向けて以下の 3 つの段階が必要と考える．第 1 はプロテインマイクロアレイによる網羅的な自己抗体の探索，第 2 はより大規模なサンプルでの候補自己抗体の特異性の検証，第 3 は候補自己抗体の機能，病態形成への関与の検討である．

（1）RA の診断が確定している抗 CCP 抗体陰性 RA 患者，健常者の血液を，研究内容および試料採取に関する詳細な説明を患者本人に対して直接行いインフォームドコンセントのもとに収集する．血液は遠心分離後に血清を凍結保存する．

（2）上記にて得られたサンプルを用いて，１次スクリーニングとして複数の遺伝子ファミリーに由来する約 9000 種のヒトタンパク質を高密度に配置したプロテインマイクロアレイである ProtoArray® Human Protein Microarray v5.0（invitrogen）を用いて，抗 CCP 抗体陰性 RA 患者および健常人の血清中に存在する自己抗体を網羅的に探索する．プロテインマイクロアレイはライフテクノロジーズジャパン社のプロトアレイ受託サービス　免疫応答バイオマーカープロファイリングにての委託解析とすることで労力の削減を図り，研究代表者単独での実験計画を可能とした．

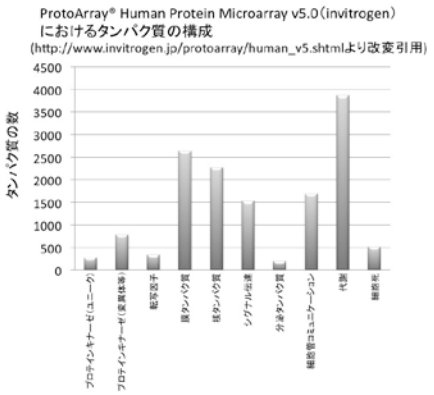

図１：ProtoArray® Human Protein Microarray v5.0（invitrogen）におけるタンパク質の構成

（3）プロテインマイクロアレイによって得られた結果を抗 CCP 抗体陽性 RA 患者，抗 CCP 抗体陰性 RA 患者，健常者の３群間にてサンプル数を増やして比較検討し，抗 CCP 抗体陰性 RA 患者に特異的に発現していると考えられる自己抗体の候補を抽出する．

（4）これと並行して人工関節置換術を施行する RA 患者より，手術前に詳細な病状説明および試料採取に関する説明を患者本人に対して直接行いインフォームドコンセントのもとに生体組織サンプルを収集する．収集するサンプルは血液，関節液，滑膜組織，軟骨組織とする．試料には試料番号を振った上で連結可能匿名化を行い，試料等からは氏名，住所，生年月日，カルテ番号などの提供者の特定が可能な情報を廃棄する．

（5）抗 CCP 抗体陰性 RA 患者に特異的に発現していると考えられる候補自己抗体の生体内での機能を解析するため，上記にて収集した組織サンプルを用いて免疫組織染色，PCR 等にて発現を確認する．

４．研究成果

2011年度は1次スクリーニングとしてプロテインマイクロアレイにより抗CCP抗体陰性RA患者，および健常者例の血清中に存在する自己抗体を網羅的に探索し，抗 CCP 抗体陰性 RA 患者に特異的に存在すると考えられる自己抗体の候補を抽出することを目的として研究を開始した.
まず RA の診断が確定している抗 CCP 抗体陰性 RA 患者，健常者の血液を収集し，プロテインマイクロアレイを用いて血清中に存在する自己抗体の網羅的探索を行った．抗 CCP 抗体陰性 RA 患者と健常者間での比較検討が最も重要と考え，抗 CCP 抗体陰性 RA 患者 7 例，および健常者 7 例の計 14 例にて解析を行った.これにより抗CCP抗体陰性RA患者に高発現している自己抗体が14種類抽出され，これらは過去の報告にはないものであり，抗CCP抗体陰性RA患者の診断に有用である可能性が示された.
2012 年度はさらに本結果を確証するために，2 次スクリーニングとして抗 CCP 抗体陽性 RA 患者 36 例，抗 CCP 抗体陰性 RA 患者 43 例，健常者 51 例の計 130 検体の血液を，研究内容および試料採取に関する詳細な説明を患者本人に対して直接行いインフォームドコンセントのもとに収集した.これらに対して LUMINEX システムを用いてビーズに候補自己抗体が認識する特異的抗原を固定し，蛍光標識 2 次抗体を用いることでサンプル中の抗体を同時に 14 種類定量し，3 群間での比較解析および RA 患者と健常者間での比較検討も行った．しかしながら今回の 2 次スクリーニングでは3群間に有意差は認められず,抗CCP抗体陰性 RA 患者に特異的と言える自己抗体の確定には至らなかった.
1 次スクリーニングにおけるサンプル数の限界が結果に影響しているものと考えている.さらにサンプル数を増やしての検討が必要と考えられた.

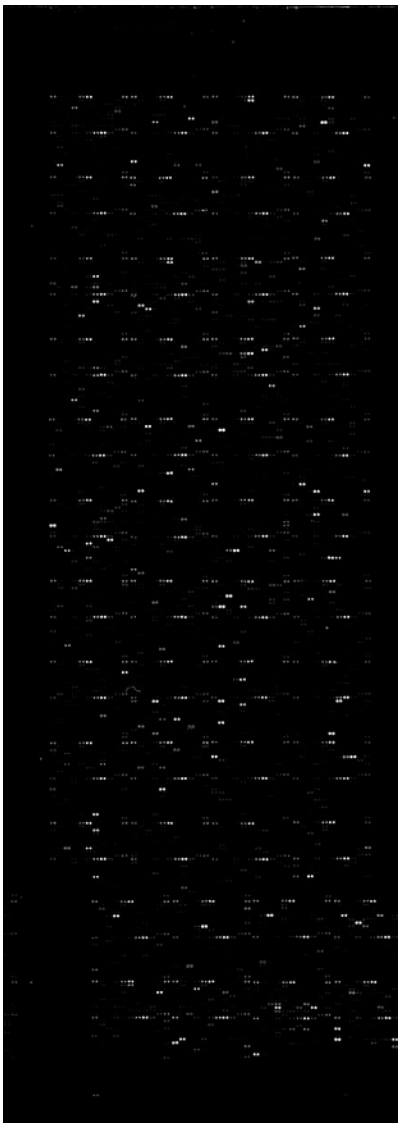

図２：プロトアレイの結果 1 例

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
岩本　卓士（IWAMOTO TAKUJI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10348675