

主論文の要約

**Development of an ELISA for detection of
autoantibodies to nuclear matrix protein 2**

〔 抗 nuclear matrix protein2 抗体検出のための
新規 ELISA の開発 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 皮膚病態学分野

(指導：秋山 真志 教授)

石川 明香

【緒言】

筋炎特異的自己抗体は、皮膚筋炎/多発性筋炎の診断や予後予測にしばしば有用である。それぞれの自己抗体は特徴的な臨床像と関連があり、抗 melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA-5)抗体は筋炎に乏しく急速進行性間質性肺炎を合併する皮膚筋炎で主に検出され、抗 transcriptional intermediary factor 1 (TIF1)- γ 抗体は小児皮膚筋炎または悪性腫瘍合併皮膚筋炎において高率に検出される。さらに近年、新たな筋炎特異的自己抗体として抗 nuclear matrix protein 2 (NXP-2)抗体が小児皮膚筋炎において報告されたが、成人におけるその陽性率は明らかになっていない。この研究は、ビオチン化リコンビナント蛋白を用いて抗 NXP-2 抗体陽性皮膚筋炎患者を同定し、その臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

さらにその手法として、従来の放射性同位元素を用いた免疫沈降法では抗 NXP-2 抗体に対する特異性が不確かであるため、安全に多数の検体に対して抗 NXP-2 抗体をスクリーニングするための新規 ELISA の開発も目的とした。

【血清対象および方法】

名古屋大学皮膚科血清バンク所有の膠原病患者 170 名（うち皮膚筋炎 106 名、多発性筋炎 8 名、全身性エリテマトーデス (SLE) 21 名、強皮症 20 名、筋炎重複症候群 15 名）と健常人コントロール 20 名の血清を使用し、我々の開発した ELISA により抗 NXP-2 抗体を検出した。陽性血清はさらに免疫沈降法によって抗体の有無を確認した。

ELISA

従来の大腸菌による発現蛋白を用いた ELISA では、大腸菌にプラスミドを形質導入して目的蛋白を発現させてからプレートに吸着させるまでに 1 週間から数ヶ月の期間が必要であった。そこで、NXP-2 全長 cDNA を含んだプラスミドを用いて、in vitro の転写翻訳系にて、ウサギの網状赤血球由来の無細胞蛋白質合成系でリコンビナント蛋白を作成した。この合成系では、作成されたリコンビナント蛋白のリジンにビオチン側鎖が付加される。ビオチンとアビジンの強い結合を利用して、ストレプトアビジンをコートしたプレートにこのリコンビナント蛋白を吸着させ ELISA を施行した。relative luminescence unit (RLU)は、GloMax-Multi Detection System (Promega)を用いて計測した。

免疫沈降法

ELISA で使用したリコンビナント NXP-2 蛋白を用いて免疫沈降法を施行した。リコンビナント蛋白と血清中抗体を吸着させたセファロースビーズを、7.5% SDS-PAGE gel を用いて電気泳動し、Western Blue Substrate (Promega)を用いたイムノブロットにより発色させた。

蛍光抗体間接法

HEp-2 細胞(Fluoro HEPANA Test; MBL)と患者血清を反応させ、抗 NXP-2 抗体の染色像を調べた。

統計

Fisher's exact test により抗体陽性頻度や臨床像との相関関係を分析した。初発年齢、診断時年齢は unpaired Student's *t* 検定で分析した。SPSS version 17.0 for Windows を用いて統計分析を行った。

【結果】

ビオチン標識リコンビナント NXP-2 蛋白を用いた ELISA の確立

170 名の膠原病患者血清をスクリーニングし、健常人 20 名の平均 ELISA 値+5SD をカットオフ値とした場合には、6 名の皮膚筋炎患者と 1 名の多発性筋炎患者が抗 NXP-2 抗体陽性となった(Fig. 1)。また、健常人平均+3SD をカットオフ値とすると、さらに SLE 患者 1 名が陽性となった。これら 8 名の患者血清の抗 NXP-2 抗体を確認するために、免疫沈降法を施行した。

免疫沈降法

リコンビナント蛋白と患者血清を反応させて免疫沈降法を行ったところ、ELISA 値上位 6 名の皮膚筋炎患者血清のみ 140kDa の蛋白を沈降した。これらの結果より 6 名を最終的に抗 NXP-2 抗体陽性とした (Fig. 2)。

抗 NXP-2 抗体陽性患者の臨床的特徴

106 名の皮膚筋炎患者中、抗 NXP-2 抗体陽性患者は 6 名 (5.7%) であった (Table 1)。6 名中 5 名は成人皮膚筋炎患者であり、1 名は小児皮膚筋炎患者であった。抗 NXP-2 抗体陽性患者と陰性患者の比較では、性別、初発年齢、診断時年齢、皮膚筋炎特異的皮膚所見やレイノー現象に関して有意な差異を認めなかった。すべての抗体陽性患者は筋炎を有していた。また、間質性肺炎を伴う患者はいなかったが、悪性腫瘍を合併する患者が一人存在した (Table 2)。

抗 NXP-2 抗体陽性患者の血清学的特徴を Table 3 に示す。蛍光抗体間接法により HEp-2 細胞を陽性患者血清で染色すると、様々な染色パターンを示し、また抗体価も様々であった (Table 3)。この結果より、抗 NXP-2 抗体の同定のために蛍光抗体間接法は有用ではないと考えられた。

【考察】

我々はこれまで、ビオチン標識リコンビナント蛋白による免疫沈降法で抗 MDA-5 抗体や抗 TIF1- γ 抗体の検出に成功しているが、免疫沈降法では一度に多数の検体を扱うのが困難である。また無細胞蛋白質合成系は、大腸菌発現系に比べリコンビナント蛋白質を大量に合成することができない。そこで本研究において、検出に発光系を用いることにより ELISA の感度を高め、抗原として用いるリコンビナント蛋白の必要量を減らすことができた。

結果として、抗 NXP-2 抗体は皮膚筋炎のみで認められ、他の膠原病では検出されなかった。また小児だけではなく、成人皮膚筋炎患者でも検出された。小児皮膚筋炎における抗 NXP-2 抗体の既報告では、陽性例は皮下の石灰化と相関があると報告さ

れている。我々の対象患者では 94 名の成人皮膚筋炎患者中、石灰化を伴うものは 4 名存在したが、そのうち 1 名だけが抗 NXP-2 抗体陽性であった (Table 3 中の Patient 3)。6 名の抗体陽性全例が軽度の筋炎を合併しており、いずれも間質性肺炎を伴わないという特徴をもっていた。しかし悪性腫瘍を伴う例も存在することから同抗体は必ずしも予後良性のマーカーとは言えず、成人例においては積極的な腫瘍検索の必要があると考えた。

また NXP-2 は、small ubiquitin-like modifier (SUMO) activating enzyme の標的として報告されており、SUMO 関連転写調節因子としての役割を持つと報告されている。他の皮膚筋炎マーカー自己抗体の対応抗原にも同様の機能を有するものが報告されており、SUMO 化経路が皮膚筋炎の病態メカニズムにおいて重要な役割を担っているかもしれない。

【結語】

我々が新しく開発したビオチン標識リコンビナント蛋白を用いた ELISA は、抗 NXP-2 抗体の検出に有用であった。抗 NXP-2 抗体はこれまで小児皮膚筋炎に特徴的な抗体であるとされてきたが、成人皮膚筋炎患者でも陽性となるということが本研究により示された。抗 NXP-2 抗体陽性患者の臨床的特徴や予後をさらに明らかにするためには、より大多数の患者血清を用いた今後の研究が期待される。