

## 主論文の要旨

Establishment of an ELISA to detect anti-glycyl-tRNA synthetase antibody (anti-EJ), a serological marker of dermatomyositis/polymyositis and interstitial lung disease

皮膚筋炎/多発性筋炎と間質性肺炎の血清学的マーカーとしての抗glycyl-tRNA合成酵素抗体（抗EJ抗体）検出を目的としたELISAの確立

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）

羽根 啓朗

## 【緒言】

皮膚筋炎/多発性筋炎（dermatomyositis/polymyositis:DM/PM）における疾患マーカー自己抗体が続々と新たに同定され、それらと DM/PM の患者病型が非常によく相関することから、臨床的意義が重要視されている。アミノアシル tRNA 合成酵素（aminoacyl tRNA synthetase:ARS）に対する自己抗体は抗 Jo-1 抗体をはじめとする 6 種類の抗体についてよく知られている。いずれの抗体の陽性例も間質性肺疾患（interstitial lung disease:ILD）・関節炎・筋炎などを有することが特徴と言われていたが、6 種類の抗体陽性例はそれぞれ異なる臨床的側面を有することも分かってきた。今回は、その中でも比較的 PM や ILD よりも DM に出現することが多いとされている抗 EJ 抗体について、ELISA による測定法を確立し、名古屋大学皮膚科を受診した膠原病患者における同抗体の臨床的意義を調査した。また、抗 EJ 抗体の産生機序を探っていく目的で、胎児肺線維芽細胞における EJ 抗原の発現とサイトカインの関係についても調査した。

## 【対象および方法】

名古屋大学附属病院皮膚科を受診した 453 例の膠原病患者を対象とした。DM は 19 例の皮膚筋炎の中で筋炎症状を伴わないグループ、いわゆる clinically amyopathic DM (CADM) を含めた 85 例、PM は 10 例、ILD が 14 例（後にシェーグレン症候群[Sjögren's syndrome:SS]が判明した 3 例を含む）、全身性エリテマトーデス（SLE）が 119 例、強皮症が 225 例であった（Table 1.）。20 人の健常人血清を ELISA のカットオフ値算出のために使用した。大腸菌発現系によるヒスチジンタグを付加した全長の精製 EJ リコンビナントタンパクと、抗 EJ 抗体陽性標準血清を用いて ELISA を構築し、抗体の有無について調べた。また、in vitro 転写翻訳系を用いたリコンビナントタンパクによる免疫沈降も行い、ELISA の結果と比較検討を行った。

ヒト胎児肺線維芽細胞（WI-38 培養細胞）を用いて、IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  刺激による EJ 抗原の発現変化について、RT-PCR とイムノブロットにより調べた。

検体使用に関しては、名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得て遂行された。

## 【結果】

ELISA において、カットオフ値を健常人の平均値+5SD とした時、5 例が平均値+5SD を越えた（Fig. 1.）。この 5 例は免疫沈降でも陽性が確認されたのに対し（Fig. 2.）、健常人の平均値+3SD～5SD の値を示した 9 例は免疫沈降では陰性であった。5 例の内訳は CADM を含まない DM 2 例（（DM 症例中）2.3%）、PM 1 例（（PM 症例中）10%）、ILD 1 例（後に SS が判明）（（ILD 症例中）7%）、SLE 1 例（（SLE 症例中）0.8%）であり、ELISA 値の上位 3 例が ILD を有していた（Table 2.）。筋力低下は、5 例中 3 例に認められたが、悪性腫瘍の合併は無かった。EJ 抗体陽性であった SLE 症例に関しては、ELISA 値が EJ 抗体陽性症例のうち最も低かったので、3 つの経時血清を用いて、ELISA の希釈試験およびリコンビナントタンパクを用いた免疫沈降により EJ 抗体陽性であることを追加確認した（Fig. 3.）。

以上の実験で、抗 EJ 抗体と間質性肺炎の関連が示唆されたことから、これまでに DM/PM 患者の血清や筋組織での発現上昇が報告されている IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  や、ある種の筋炎関連自己抗原の発現を培養細胞の実験系において上昇させるという報告がある IL-1 $\beta$  について、それらがヒト肺線維芽細胞 (WI-38) における EJ 抗原の発現量を変化させるかについて検討した。

24 時間通常の培養を行った WI-38 細胞を PBS で洗浄後、IFN- $\alpha$  2a、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  をそれぞれ 1000 IU/ml、15 ng/ml、10 ng/ml の濃度で培養液中加入し、培養 24 時間、48 時間、72 時間後の抽出液について調べた。RT-PCR の結果、IFN- $\alpha$  2a の刺激により無刺激状態と比較して 24 時間、72 時間後については EJ 抗原の mRNA の有意な発現上昇を確認したが、それ以外では刺激による mRNA の発現上昇は確認できなかった。次にイムノブロットにより、EJ 抗原タンパクの発現上昇の有無を上記 mRNA の場合と同様な条件で調べたが、無刺激状態と較べて刺激による明らかなタンパク発現の増減は確認できなかった。

### 【考察】

抗 ARS 抗体の臨床的重要性は確立されていると言ってよいが、抗 Jo-1 抗体を除いては、その検出に関して一部の施設でしか行われていない放射性物質標識を用いた RNA およびタンパク免疫沈降にはほとんど頼らざるを得ない現状である。今回の研究で、我々は抗 ARS 抗体の 1 種である抗 EJ 抗体の測定を、簡便な ELISA により可能にした。

この ELISA を用いて検出した抗 EJ 抗体陽性者 5 名の内、3 名が ILD を有していた。また、この ILD を有した 3 名は ELISA が高い力価で陽性であった。ILD は ARS に対する抗体を有する患者群、いわゆる抗 ARS 抗体症候群において、患者の予後に大きく影響する重要な合併症である。そのため、抗 EJ 抗体の ELISA 力価が ILD の病勢や治療反応性と相関するかを、時系列に沿った血液検体を用いて、さらに評価されることが望まれる。

サイトカインによる培養細胞刺激で EJ 抗原の発現量変化の有無を調べる実験は、DM/PM の病態において重要視されるサイトカインが自己抗体産生においても関わっていないかを調べる目的で行ったものである。残念ながら、今回使用したサイトカイン 3 種による実験では、EJ の発現量に明らかな変化は見出されなかった。

### 【結語】

現在、抗 EJ 抗体を含む抗 ARS 抗体の検出は、放射性物質標識を用いた免疫沈降を行う事のできる施設でのみ可能である。しかし、我々はリコンビナント EJ タンパクを用いて、抗 EJ 抗体の検出をより簡便に行う事ができる ELISA を確立した。抗 EJ 抗体は DM/PM に特異的ではなく、他の自己免疫疾患でも見いだされる事を確認した。抗 EJ 抗体が高値の患者では ILD の合併率が高く、抗 EJ 抗体と ILD の高い関連性が示唆された。今回我々の確立した方法は、有用性と臨床的重要性を、より多くの IIM や ILD を含む自己免疫疾患における研究で評価されることが望まれる。