

【要約】

Novel serum autoantibodies in double seronegative NMOSD identified
by a novel serological target screening method
(新規血清ターゲットスクリーニング法により、抗 AQP4 抗体、抗 MOG 抗体陰性
視神経脊髄炎患者血清中で同定された新規自己抗体)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学専攻
(主任：桑原 聡教授)
青木 玲二

【背景】

視神経脊髄炎(Neuromyelitis optica spectrum disorders)は、中枢性の自己抗体の関与する自己免疫性疾患である。これまでに多くの症例で、抗 AQP4(Aquaporin 4)抗体、抗 MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein)抗体の関与を指摘されてきたが、現状でも未だ 10%ほどの患者が抗体陰性である。今回両抗体陰性の NMOSD(dSN-NMOSD)で千葉大学に通院している患者の中から 2 例を対象にして、血清から自己抗体の抗原候補を抽出できるかを試みることにした。これまでに当科でおこなってきた抗原候補の抽出方法である SEREX(serological identification of antigens by recombinant expression cloning)法が大腸菌に brain cDNA library を導入して抗原を抽出していく方法であったのに対して、今回の方法では、真核細胞である HEK293(human embryonic kidney cell 293)に brain cDNA library を導入し、血清反応後にフローサイトメトリーを利用して陽性となる DNA を細胞単位で抽出する方法を考えた。

【方法】

10^6 個の HEK293 細胞に対して $5\mu\text{g}$ の p AP3 neo に挿入された Brain cDNA library (No.21 Nojima cDNA library collection, 理研 BRC)を、Neon を用いて導入し、G418 硫酸塩の $400\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む培養液 (DMEM+10% fetal bovine serum+ $50\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin) で選択を行った。その後、 10^{6-7} 個の細胞を回収して、 $10\mu\text{l}$ の dSN-NMOSD 血清と $40\mu\text{l}$ の PBS1(PBS+FBS)溶液を加えて 30 分 4°C でインキュベートした。細胞

を3回洗浄したのち、Allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト IgG1 抗体 $5\mu\text{l}$ と $95\mu\text{L}$ の PBS1 を加えて、再度 30 分 4°C でインキュベートした。3回洗浄し、その後 2%FBS の $400\mu\text{l}$ で回収した。FACS AREA (Becton Dickinson, USA) にて 1-3%になるように陽性集団の細胞を回収した。96well plate で分割培養を行い、その後 GenElute Mammalian genomic DNA miniprep kit (Sigma Aldrich, USA)により DNA を回収した。pAP3 neo にある T3 primer と T7 primer を用いて PCR で library 部分の DNA を増幅し、シーケン解析を FASMAC にて行った。結果を BLAST の DATABASE で検索して解析した。

【結果】

2人の患者血清で計6回施行したところ、FACS AREA ではそれぞれ 10^5 個の HEK293 細胞が回収できた。そのあと 96well の分割培養を行って 288 well の中から、96 clone を回収した。細胞を溶解して PCR で DNA の増幅を行ったところ 400-1500 塩基対ほどのサイズの DNA が抽出された。それぞれをシーケンサーで解析して塩基配列を確認し、BLAST の DATABANK で検索した。その結果、1人目の患者から GPR56(G-protein coupled receptor 56)、TSNARE1 (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors 1)、mRNA137、2人目の患者から COPA (coat complex subunit alpha)、Stannin の情報を得ることができた。

【考察】

それらのタンパク質は既報告で脳組織に存在したり、免疫に関連したりすることが報告されており、これまでに NMOSD との関連性の報告はないものの疾患への関与が疑われた。既報告では、抗H I V抗体の抗原候補となる cDNA を HEK293 に導入して発現させたのち、血清および二次抗体で染色してフローサイトメトリー選択した際、目的の抗原の cDNA 量が1回の施行で1.5-3倍高まっていることが分かっていた。大腸菌を用いて未知数の cDNA ライブラリーを選別していく方法である SEREX 法と同様に HEK293 でも同様に行うことで、未知数の cDNA ライブラリーが選別可能である可能性が考えられた。HEK293 を用いた場合、真核細胞特有の翻訳語修飾が認められ、大腸菌では検出できなかった新規の抗原を発見する可能性があると考えられた。

今後は、今回の研究が少数例のものであったので、確認の研究として多数症例検体で抗体と抗原の反応があるかどうかを確かめること、また、それらと疾患活動性の間に関連があるかどうかを確かめることが必要である。また、髄液を用いたり、他のアイソタイプの IgG を用いたりしても、抗原検索ができたかもしれない。

【結語】

本論文から、真核細胞である HEK293 とフローサイトメトリーを用いた患者血清による brain cDNA の免疫学的スクリーニングが、抗体陰性 NMOSD の新規自己抗原の検索に有用である可能性が示された。