

主任研究者、H26年度、中間報告

課題番号 : 25指105

研究課題名 : 膠原病における、ACE2阻害病態の分析と治療法開発、
および抗GABA受容体抗体による診断法の開発

主任研究者名 : 三森明夫

キーワード : 抗ACE2抗体

研究成果 : 下記

1. SLE 患者の血清と髄液中に、抗 GABA 受容体 b 抗体が出現することを論文掲載した : Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, **Mimori A**: Identification of novel autoantibodies to GABA-B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 2014 Mar 4. [Epub ahead of print]

2. 肺高血圧症など血管病態に対する抗 ACE2 阻害抗体の、強皮症、MCTD における出現頻度、病態との相関を検討した。

【背景】我々は、SLE・強皮症/SSc・MCTD の血管病態（肺動脈性肺高血圧症 PAH、末端壊死）と相関する抗 angiotensin 変換酵素 2/ACE2 抗体を見出し、また SLE 活動期に抗 ACE2 非阻害抗体陽性をみることで、ACE2 阻害抗体のみが血管病態と相関することを報告した。今回、強皮症/SSc、MCTD で抗 ACE2 阻害抗体と血管病態の相関を検討した。SSc は、活動性を明確に定義しにくく、ステロイド治療する機会も少ない。SSc、MCTD の診療において、血管病態（PAH、末端壊死）は、現在進行形というよりも既往症として出会うことが多い。そこで今回、SSc、MCTD 患者で検討症例を増やし、血管病態あり 12 人（新規 5、既報 7）、なし（40 人）について、抗 ACE2 抗体、抗 ACE2 阻害抗体の出現頻度を評価した。

SSc(36例) MCTD(16例)の患者背景

【方法】患者血清の抗 ACE2-ELISA 測定、および血清 IgG 分画を抽出し、1µg 添加で in vitro ACE2 活性（基質 Mca-APK-Dnp、ENZO）への阻害効果を調べた（健常者 IgG 添加との比較：3 回測定 t 検定）。

		収縮性血管障害		対象群	
患者数(人数) (男:女)		SSc 8 (1:7)	MCTD 4 (0:4)	SSc 28 (5:23)	MCTD 12 (3:9)
例数	PAH	3	2	(-)	
	強皮症腎	2	-		
	末端壊死	4	2		
採血年齢 (平均 ± SD)		50.5 ± 14.3		47.8 ± 15	
罹病期間(年)		6.5 ± 2.4		7.1 ± 1.2	

【結果】IgG 分画による ACE2 活性の有意な低下が、PAH、末端壊死にみられ（6 人/11 人で阻害あり）、うち 4 人で大幅な阻害（対照の 5~25%への低下）を示した。収縮性血管病態のない 19 人の血清 IgG は、すべて ACE2 活性を阻害しなかった（PowerPoint 図）。

【結論】既報 SLE での検討と同様、強皮症・MCTD の収縮性血管病態の血清に、ACE2 阻害自己抗体の存在が示唆される。

Inhibitory serum autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with scleroderma or MCTD having pulmonary hypertension or digital necrosis

[Backgrounds] We have reported serum autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in patients with rheumatic diseases and pulmonary arterial hypertension (PAH) or digital necrosis. In this study, we estimated in vitro ACE2-inhibition by serum IgG from patients with MCTD or systemic sclerosis (SSc).

[Methods] Anti-ACE2 antibody-ELISA: Serum from patients with MCTD or SSc including 12 vasculopathy patients (5 PAH-, 2 SSc renal crisis-, 4 digital necrosis-cases), and 40 non-vasculopathy patients were studied. Inhibition assay for in vitro ACE2 by purified IgG fraction from patients' serum. ACE2 activity under co-incubation with 1 mcg IgG fraction from each patient was assayed using substrate Mca-APK-Dnp. Triplicate assay compared with control data was evaluated statistically by t-tests.

[Results] Significant inhibition of ACE2 activity by IgG was shown in 6 (3 PAH, 3 digital necrosis) out of the 11 vasculopathy pts, and four of the patients showed 5-25% of the control ACE2 activity. Anti-ACE2-ELISA titer was positive in 7 out of 12 vasculopathy patients having PAH or digital necrosis. One SSc patient having the history of renal crisis seven years ago showed negative serum anti-ACE2-antibodies. None of the IgG fractions from non-vasculopathy patients showed ACE2 inhibition.

[Conclusion] Patients with constrictive vasculopathy and SSc or MCTD have inhibitory serum autoantibodies to ACE2.

「膠原病における、ACE2 阻害病態の分析と治療法開発、および抗 GABA 受容体抗体による診断法の開発」 代表 三森明夫

H26 年度研究報告

特許取得 なし

英文論文 以下

1. Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, **Mimori A**: Identification of novel autoantibodies to GABA-B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2014 Mar 4. [Epub ahead of print]
2. Ueda Y, Tomoe H, Takahashi H, Takahashi Y, Yamashita H, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Interstitial cystitis associated with primary Sjögren's syndrome successfully treated with a combination of tacrolimus and corticosteroid: A case report and literature review. *Mod Rheumatol* 2014 Apr 11. [Epub ahead of print]
3. Yamashita H, Ito A, Tsuchiya H, **Mimori A**: Chronic active Epstein-Barr virus infection mimicking autoimmune hepatitis exacerbation in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014 Mar 7. [Epub ahead of print]
4. Muto G, Yamashita H, Takahashi Y, Miyata Y, Morooka M, Minamimoto R, Kubota K, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Large vessel vasculitis in elderly patients: early diagnosis and steroid-response evaluation with FDG-PET/CT and contrast-enhanced CT. *Rheumatol Int.* 2014 Mar 19. [Epub ahead of print]
5. Takahashi H, Yamashita H, Morooka M, Kubota K, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: The utility of FDG-PET/CT and other imaging techniques in the evaluation of IgG4-related disease. *Joint Bone Spine* 2014 Feb 22. pii: S1297-319X(14)00031-1. doi: 10.1016/j.jbspin
6. Yamashita H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: A patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis complicated by antineutrophil-cytoplasmic- antibody-associated vasculitis showing honeycomb lung without volume loss. *Int Med* 2014;53(7):801-4
7. Yamashita H, Takahashi H, Kubota K, Ueda T, Ozaki T, Yorifuji H, Bannai E, Minamimoto, R, Morooka M, Miyata Y, Okazaki M, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Utility of fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for early diagnosis and evaluation of disease activity of relapsing polychondritis: a case series and literature review. *Rheumatology (Oxford)* 2014 Mar 27. [Epub ahead of print]
8. Bannai E, Yamashita H, Kaneko S, Ueda Y, Ozaki T, Tsuchiya H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Successful tocilizumab therapy in seven patients with refractory adult-onset Still's disease. *Mod Rheumatol* 2014 Apr 3. [Epub ahead of print]
9. Tsuchiya H, Tsuno H, Kaneko S, Yamashita H, Takahashi Y, Kano T, **Mimori A**: Complete atrioventricular block and aseptic meningitis in a patient with adult-onset Still's disease and concurrent hemophagocytic syndrome. *Mod Rheumatol.* 2014 Feb 18. [Epub ahead of print]

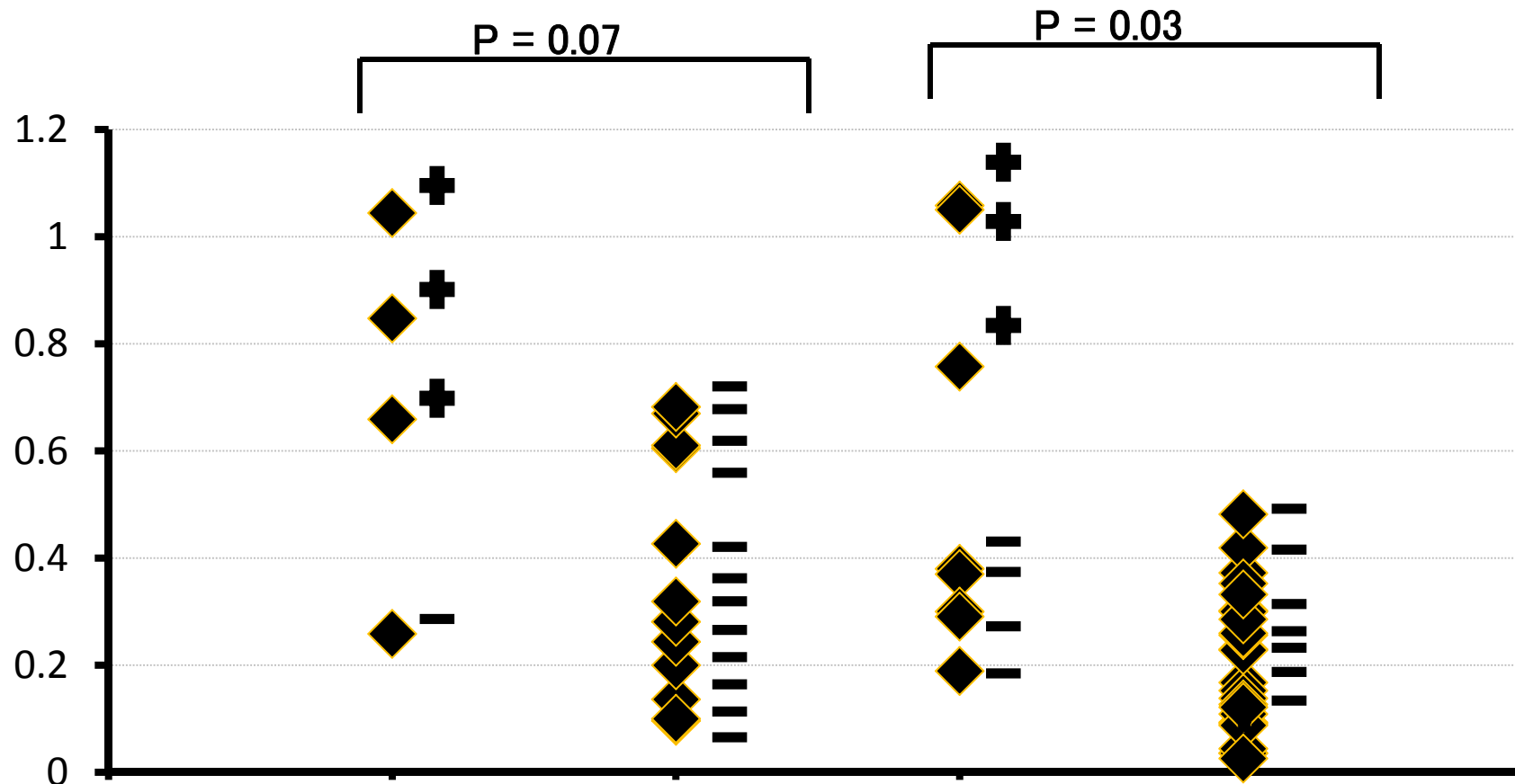
print]

10. Tsuchiya H, Tsuno H, Inoue M, Takahashi Y, Yamashita H, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Mycophenolate mofetil therapy for rapidly progressive interstitial lung disease in a patient with clinically amyopathic dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2014 Feb 7. [Epub ahead of print]
11. Yoshida Y, Takahashi Y, Yamashita H, Kano T, **Mimori A**: The incidence of methotrexate-related lymphoproliferative disorders in RA patients. *Mod Rheumatol* 2014 Feb 5. [Epub ahead of print]
12. Washio M, Fujii T, Kuwana M, Kawaguchi Y, Mimori A, Horiuchi T, Tada Y, Takahashi H, Mimori T; Japan MCTD study group. Lifestyle and other related factors for the development of mixed connective tissue disease among Japanese females in comparison with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*. 2014 Feb 5. [Epub ahead of print]
13. Ueda Y, Yamashita H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Refractory hemophagocytic syndrome in systemic lupus erythematosus successfully treated with intermittent intravenous cyclophosphamide: three case reports and literature review. *Clin Rheumatol*. 2014, 33(2):281-6.
14. Ito K, Minamimoto R, Yamashita H, Morooka M, Okasaki M, Mimori A, Kubota K: 18F-FDG PET/CT findings preceded elevation of serum proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener granulomatosis. *Clin Nucl Med*. 2014 Jan;39(1):e67-8.
15. Yamashita H, Ueda Y, Ozaki T, Tsuchiya H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Characteristics of 10 patients with paraneoplastic rheumatologic musculoskeletal manifestations. *Mod Rheumatol*. 2014 May;24(3):492-8

Free- Style系で発現hACE2タンパクを抗原としたELISA:

患者血清のELISA値、および

血清IgG分画によるin vitro ACE2活性への効果: +阻害あり、-阻害なし

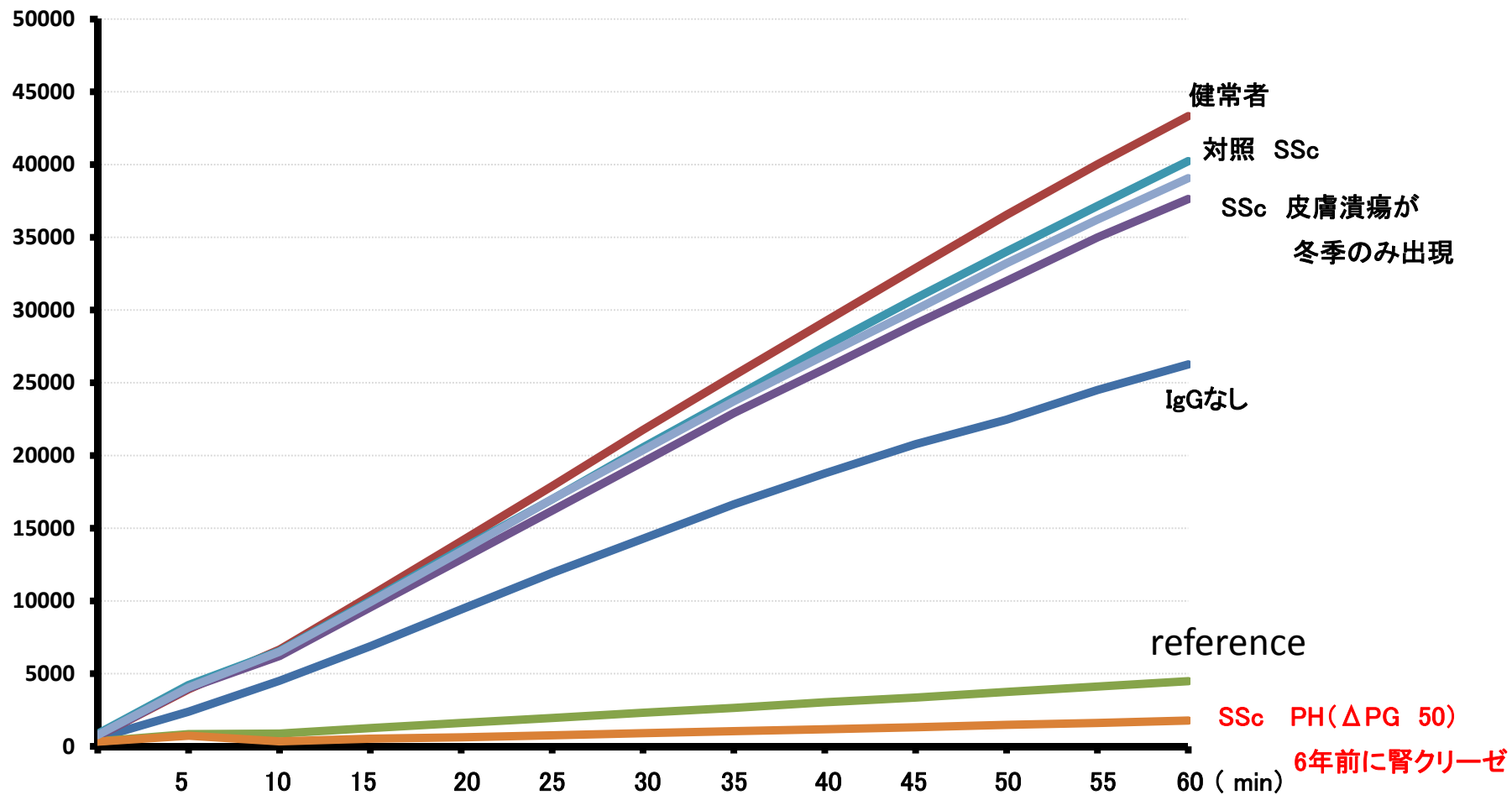


	MCTD		強皮症	
	あり	なし	あり	なし
皮膚潰瘍	4人	12人	8人	28人
肺高血圧症	(0.70 ± 0.3)	(0.36 ± 0.2)	(0.65 ± 0.35)	(0.2 ± 0.13)
阻害活性低下	3/4人	0/12人	3/7人	0/7人

血管病態患者血清IgG分画による、in vitro ACE2活性の抑制:

蛍光基質により酵素反応を時系列測定 (データの一部を呈示)

吸光度 (RFU)



分担研究者報告

課題番号 : 25指105

研究課題名 : 膠原病における、ACE2阻害病態の分析と治療法開発、
および抗GABA受容体抗体による診断法の開発

主任研究者名 : 三森明夫

分担研究者名 : 石坂幸人

キーワード : 抗ACE2抗体

研究成果 : 下記

【背景と目的】

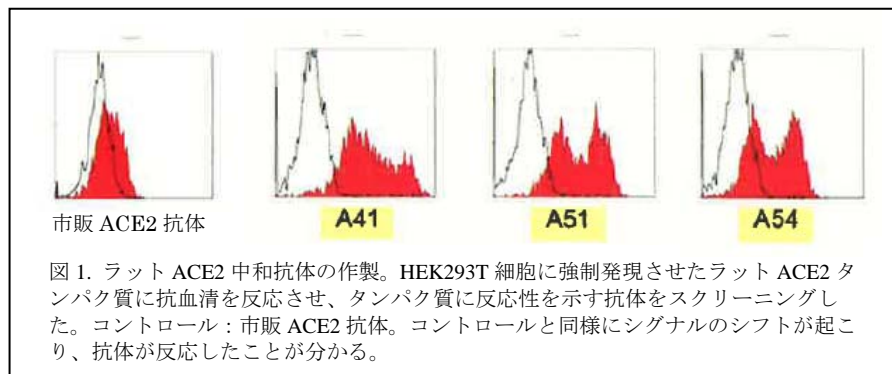
我々は、血管保護因子である Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) に対する自己抗体を同定し報告した (Takahashi et al., Arthritis Res Ther, 2010;12(3):R85)。抗ACE2抗体は、膠原病 (SLE、強皮症、MCTD) の収縮性血管病態 (肺動脈性肺高血圧症/PAH、末端壊死) 患者において、非血管病態の患者に比べ有意に高値を示した。さらに収縮性血管病態患者が有する抗ACE2抗体の中には、ACE2 に対し中和活性を示す抗体が存在した。そこで本研究では、抗ACE2抗体が病因性抗体として作用するか否かを動物モデルで評価するため、抗ACE2抗体を作製した。

【方法】

ヘマグルチニン付加した rat ACE2 タンパク質を発現する cDNA を 3 匹の Wister rat に直接皮下投与し免疫した。血中抗体価の上昇の有無を検定するため、DNA 免疫後 6 週間目に血清を採取し、ACE2 タンパク質を一過的に強制発現させた HEK293T 細胞に作用させた後、フローサイトメトリー解析を行った。次に得られたクローンのうち特に ACE2 への反応性が高かったクローンについて限界希釈によるクローニングを行った。さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、ACE2 タンパク質に対する中和活性の有無を評価した。

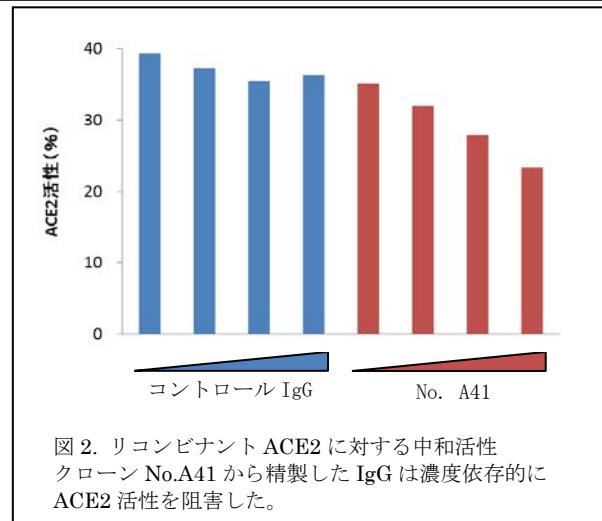
【結果】

2 回のスクリーニングを経て最終的に 3 クローンが、コントロールとして用いた市販の ACE2 抗体よりも、ACE2 に対して高い親和性を示した (図 1)。さらに HPLC による ACE2 活性の測定の結果、クローン No. A41 が、リコンビ



ナント ACE2 と混合することで、濃度依存的に ACE2 に対し中和活性を示した。即ち、最も高濃度の IgG と ACE2 を反応させた時 (モル比、ACE2:IgG = 1:100)、コントロール IgG 添加時では、ACE2 活性が 36.3% だったのに対し、クローン No. A41 由来 IgG を添加すると、23.3% にまで低下した (図 2)。しかしながら、他の 2 クローンについては、中和活性は認められなかった。

今後は、クローン No. A41 を大量精製し、ラットへの投与を行い、血管病態が惹起されるか検証する。



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25指105

研究課題名：膠原病における、ACE2阻害病態の分析と治療法開発、および抗GABA受容体抗体による診断法の開発

主任研究者名：三森明夫

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Identification of novel autoantibodies to GABAB receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.	Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Akio Mimori A	Rheumatolog	53:1219-28	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。