

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 : 抗アンジオテンシン変換酵素抗体、膠原病、肺高血圧症

研究成果 :

1. 現在は、抗 ACE2 抗体測定用 ELISA に用いる ACE2 蛋白の、純度を高める作業に集中している。精製するために、多量の蛋白発現を要する。技術的な問題点について、別紙 PowerPoint に記した。患者血清中の IgG 分画による in vitro ACE2 抑制は、下記 2. のように効率よく結果が得られた。

2. 膠原病血管病態における抗 ACE2 抗体の ACE2 阻害作用 : Ang(1-7) 定量による方法

背景 : 膠原病の血管病態 (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、SLE 活動期に抗 ACE2 非阻害抗体陽性をみることに、ACE2 阻害抗体のみが血管病態と相関することを報告してきた。合成基質による従来の ACE2 活性評価に替え、今回、生理的基質 AngII を用いて再評価した結果を報告する。

方法 : SLE 既報 27+新規 2 人 (PAH 4、末端壊死 2、血管病変のない活動期 SLE 19、非活動期対照 4 人) および新規 1 例 (原発性シェーグレン症候群 SjS-PAH) から、血清 IgG を抽出した。in vitro ACE2 による、蛍光標識 FAM-AngII から FAM-Ang (1-7) への変換を HPLC (High performance liquid chromatography) で定量し、抗 ACE2 抗体含 IgG 分画による ACE2 阻害を Ang(1-7)/AngII 比で評価した (3 回測定 t 検定)。

結果 : IgG 分画による ACE2 活性阻害は、PAH 4/5、末端壊死 2/2、活動性 SLE 3/19 にみられ (6/7 vs 3/19; $p = 0.0022$)、対照 0/4 だった。合成基質法に比べ、Ang(1-7) の HPLC 定量では、阻害抗体による ACE2 阻害が、再現性よく得られ、血管病患者の 5/7 でほぼ完全抑制をみた。SjS 1 例はステロイド治療後の PAH 再発であり、血清の抗 ACE2-ELISA 低値だったが、再発時の ACE2 阻害、ステロイド再治療後の阻害消失がみられた。

結論 : Angiotensin(1-7) 定量による in vitro ACE2 活性評価は、血清中の抗 ACE2 阻害抗体を高感度に検出する可能性がある。

課題番号 : 25指105
研究課題名 : Pathogenicity of autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 or GABA receptors, and a prevalence of the autoantibodies in patients with connective tissue diseases
主任研究者名 : Akio Mimori
分担研究者名 : Yukihiro Ishizaka
キーワード : anti-angiotensin converting enzyme 2, connective tissue disease, pulmonary hypertension
研究成果 :

Inhibitory activity of serum autoantibodies to ACE2 in patients with constrictive rheumatic vasculopathies, using angiotensin(1-7) assay

Backgrounds: We have reported inhibitory serum autoantibodies (Ab) to angiotensin2 (ACE2) in patients with rheumatic diseases and pulmonary arterial hypertension (PAH) or digital necrosis, and non-inhibitory antibodies to ACE2 in active SLE patients. This study presents a highly sensitive method for detecting anti-ACE2 inhibitory Ab, which measures physiological substrate AngII and the product Ang(1-7) by High performance liquid chromatography (HPLC). Methods: Serum IgG fraction was obtained from 29 SLE patients (4 PAH, 2 digital necrosis, 19 active SLE without vasculopathy, 4 and control SLE) and one patient with Sjogren syndrome and PAH. After co-incubation of ACE2 and AngII with patient's IgG, Ang(1-7)/AngII-ratios were estimated. Results: ACE2 inhibition by serum IgG was shown in 4/5 of PAH, 2/2 of digital necrosis, and 3/19 of active SLE without vasculopathy (6/7 vs 3/19; $p = 0.0022$), and none of 4 controls. The in vitro ACE2 inhibition by the IgG from a Sjogren-PAH patient was diminished after steroid therapy, which treated the PAH successfully. Conclusion: Ang(1-7)/AngII assay by HPLC may be a sensitive method for detecting inhibitory autoantibodies to ACE2 in rheumatic vasculopathy.

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

患者血清中の、ACE2阻害自己抗体の臨床評価、最近までの成績は、別紙(和文、英文)に記した。現在は、抗ACE2-ELISA系に用いる、抗原ACE2蛋白の純度を高めて汎用性のあるELISAキットを作成することに集中している。技術的な点を以下に記す。

現在の状況と問題点

膠原病患者血清を用いてのELISA抗原用ACE2タンパクを哺乳類細胞系タンパク質発現システム(FS293、Expi293ExpressionSystem)を用いて発現・精製を試みている。

現在までも同様にhACE2タンパクを精製しELISA抗原として使用してきたが、FS293ではACE2タンパクの発現量が少なく大量に入手することが困難であると共に、精製純度が低い事が問題となっている。

今回は患者血清のスクリーニングに、純度の高いhACE2タンパクを抗原としたELISAを行うことを目的としている。

まずFS293にくらべ高発現とされているExpi293を使用しhACE2を発現精製したが、夾雑たんぱくも多く発現し、それを取り除きhACE2タンパクをメインとすることが困難であった。次にアフィニティー精製するためにTag付のhACE2プラスミドを作成し、上記システムで発現・精製を行った。FlagTagを付けたものは抗体ビーズで精製する事が出来れば、Flag抗体をコーティングした市販プレートを使用したサンドイッチ法でのELISAを組む事が可能であると考えたが、純度よく精製する事が困難で現在更に検討中。またHisTag付ACE2はProfiniaで自動精製が可能であるか確認したが、Sup・ペレットともにカラムへの吸着が認められず、精製は不可能と判断した。

現在はExpi293でhACE2を発現させDEAEで粗精製を行い、次に他のカラムにかけて純度よく精製が行えるか検討中である。

FreeStyle293

培養条件 37°C、8%CO₂、125rpm

Transfection

250mL蓋つきフラスコにFS293細胞50mL(1×10^6 cell/mLに調整)分注し293FectinReagentを用いACE2プラスミドDNAをトランスフェクションした。

まず1.5mLのOpti-MEMに100 μ Lの293fectinを加え、5分間静置した。同時に50 μ g相当のプラスミドDNAを1.5mLのOpti-MeMに加えた。二つを混和して20分間静置しDNA-293fectin複合体を形成させ、50MLの培養液に加えた。

トランスフェクション後48時間でMediumを回収・交換し更に48時間培養した。

培養液をスピンドウンし(120g、R.T.5分間、)supを回収、新しいFS293ExpressionMediumを 1×10^6 Cell/mLになるように加え更に48時間培養した。

Expi293

培養条件 37°C、8%CO₂、125rpm

Transfection

250mL蓋つきフラスコにExpi293細胞50mL(3×10^6 cell/mLに調整)分注ExpiFectamine293Reagentを用いhACE2プラスミドDNAをトランスフェクションした。

まず2.5mLのOpti-MEMに133 μ Lの293transfectaminを加え、5分間静置した。同時に50 μ g相当のプラスミドDNAを2.5mLのOpti-MeMに加えた。二つを混和して20分間静置しDNA-293fectin複合体を形成させ、50MLの培養液に加えた。

トランスフェクション後20時間でEnhancerを添加し培養、トランスフェクション後48時間でMediumを回収・交換し更に48時間培養した。

培養液をスピンドウンし(120g、R.T.5分間、)Supを回収、新しいmediumを 3×10^6 Cell/mLになるように加え、更に48時間培養した。

各培養上清からのACE2タンパク精製

回収した培養上清を25mMTris-HCL(pH8.5)で透析し、セルロファインA-500(陰イオン交換樹脂)で粗精製を行った。溶出はNaClでの塩析で行い溶出液をそのままELISA抗原に用いていた。hACE2の純度を上げるため。DEAE精製後他のカラムを使用し検討を行っている。

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】

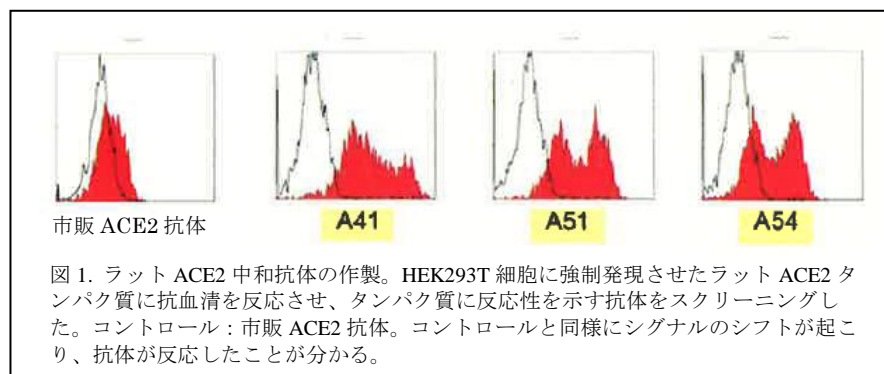
我々は、血管保護因子である Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) に対する自己抗体を同定し報告した (Takahashi et al., Arthritis Res Ther, 2010;12(3):R85)。抗 ACE2 抗体は、膠原病 (SLE、強皮症、MCTD) の収縮性血管病態 (肺動脈性肺高血圧症/PAH、末端壊死) 患者において、非血管病態の患者に比べ有意に高値を示した。さらに収縮性血管病態患者が有する抗 ACE2 抗体の中には、ACE2 に対し中和活性を示す抗体が存在した。そこで本研究では、抗 ACE2 抗体が病因性抗体として作用するか否か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

【方法】

ヘマグルチニンを付加した 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】

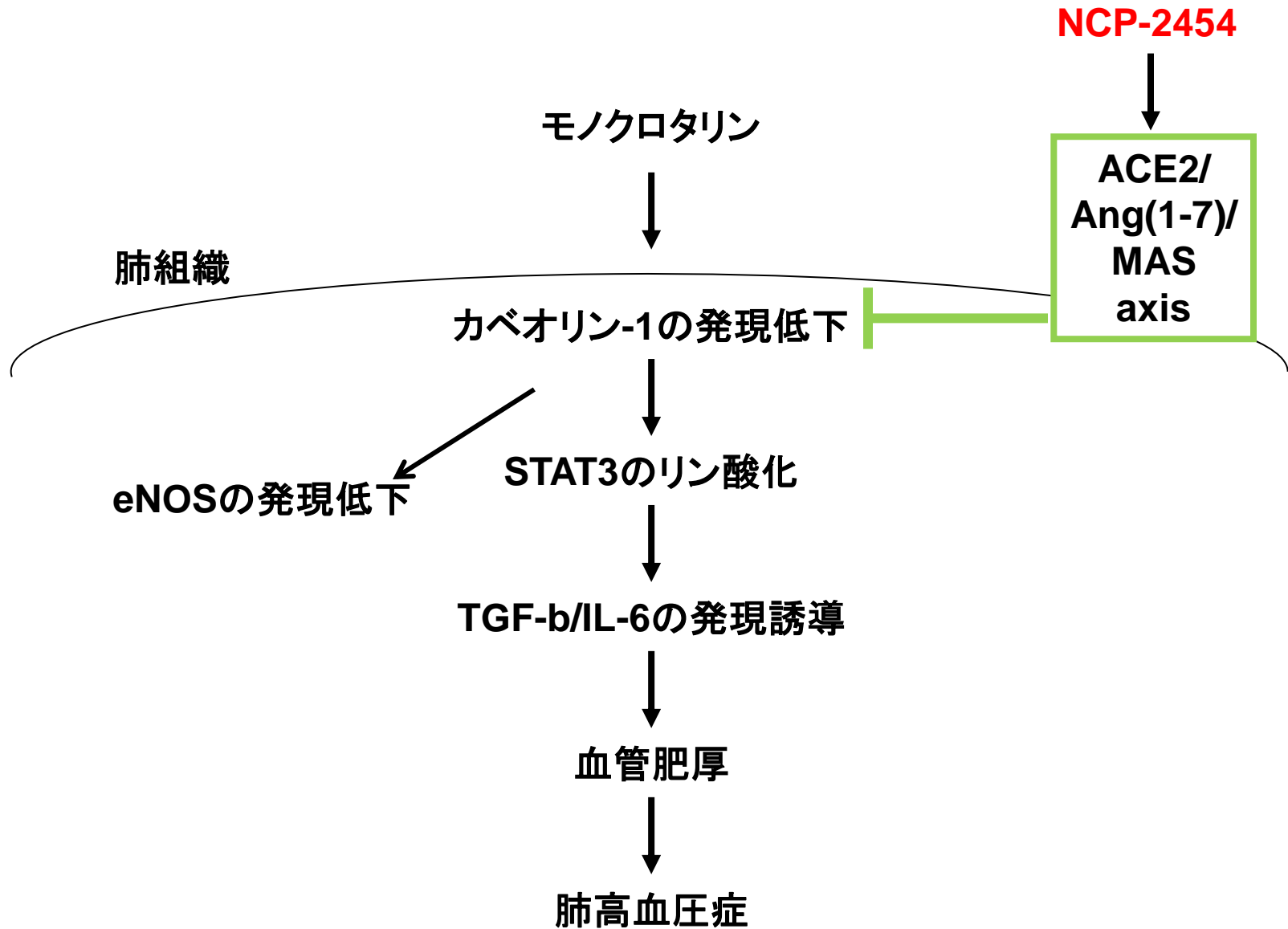
2 回のスクリーニングを経て最終的に 3 クローンを選出した (図 1)。さらに HPLC による ACE2 活性の測定の結果、クローン No. A41 が、リコンビナント ACE2 と混合することで、濃度依存的に ACE2 に対し中和活性を示す傾向が検出された。しかし、他の 2 クローンについては、中和活性は認められなかった。



平成 26 年度、in vivo 実験を行うことを目的に、クローン No. A41 を大量に調製し、同様の中和活性を評価した。その結果、阻害作用に関する再現性を得ることはできなかった。さらに条件を改良して、中和活性について検討中である。

一方、平行して進めていた「肺高血圧症モデルに対する ACE2 活性化化合物作用」に関する研究成果を論文としてまとめた (添付 ppt)。

ACE2活性化化合物の作用点



(Haga et al. *Experiment. Lung Res.*, 41:21-31, 2015)

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 GABA-B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.	Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, Mimori A	Rheumatology (Oxford)	53:1219-28	2014
A novel ACE2 activator reduced monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF- β cascades with restored caveolin-1 expression.	Haga S, Tsuchiya H, Mimori A, Ishizaka Y	Exp Lung Res	41:21-31	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
膠原病血管病態における抗ACE2抗体のACE2阻害作用: Ang(1-7)定量による方法	高橋裕子、芳賀しおり、石坂幸人、三森明夫	日本リウマチ学会総会	名古屋	2015年4月

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

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
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。