

ANCA 関連血管炎モデルにおける pathogenic 抗体レパトアの同定と疾患抑制機能抗体の開発

大阪大学感染症総合教育研究拠点・生体応答学チーム
伊勢 渉

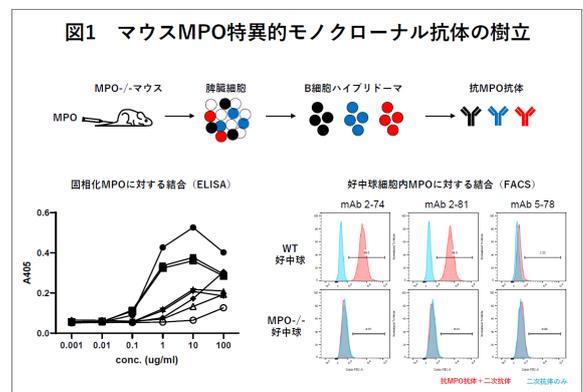
目的

抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody:ANCA) 関連血管炎は、ANCA、すなわち myeloperoxidase (MPO) などに特異的な自己抗体が産生され、これが好中球を過剰に活性化することによって誘導されると考えられている。しかしANCA関連血管炎患者のMPO特異的抗体価は必ずしも病態スコアと相関しない。これはMPO特異的抗体レパトアには、pathogenicなものとnon-pathogenicなものが混在していること、ポリクローナル抗体の測定は病態の診断・予測に不十分であることを示唆している。そこで本研究ではMPO特異的抗体による腎炎誘導メカニズムの解明、疾患抑制法の開発を目的とし、MPO特異的抗体を樹立し、そのpathogenicityを評価する実験系を構築することを試みた。また得られた pathogenic抗体に糖鎖修飾 (シアル酸付加) を導入することで疾患抑制型抗体に変換することが可能かどうかを試みた。最後に、ヒト血管炎患者末梢血を用いてヒトMPO特異的B細胞の解析系の樹立も試みた。

結果

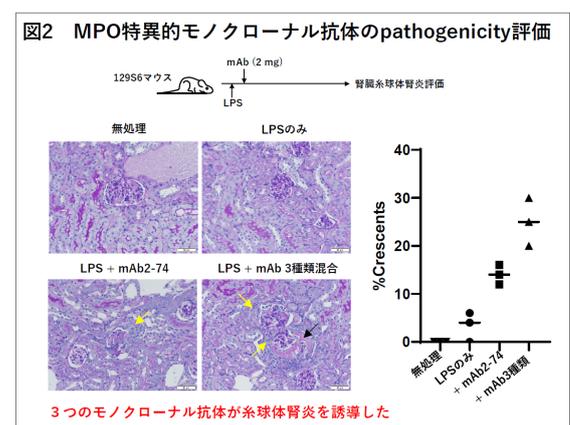
1) マウス抗MPOモノクローナル抗体の樹立

MPO欠損マウスをリコンビナントMPOで繰り返し免疫した後、脾臓細胞からB細胞ハイブリドーマを作成し、MPO結合性抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングを行った。その結果、10個のMPO特異的モノクローナル抗体を得ることができた (図1)。得られたモノクローナル抗体の抗原特異性は、MPO欠損マウス由来好中球を用いて確認した。



2) 抗MPOモノクローナル抗体のin vivo pathogenicityの検定

次に得られたモノクローナル抗体をマウスに投与することで腎臓糸球体腎炎を誘導可能かどうか調べた。129S6マウスにモノクローナル抗体 (2 mg) を投与したところ、3つのモノクローナル抗体が糸球体腎炎を誘導した (図2)。このことからこの実験系を用いることで抗MPO抗体のin vivo pathogenicityを評価可能であることが判明した。また個々の抗体の単独投与よりも、3つのモノクローナル抗体を混合して投与した時の方が糸球体腎炎をより強く誘導したことから、異なるエпитオプを認識する抗体の組み合わせが糸球体腎炎の誘導に重要である可能性が示唆された。



3) 糖鎖修飾による疾患抑制型抗体への変換

私達は以前マウス関節炎モデルにおいて、関節炎誘導性抗体にシアル酸を付加することで関節炎抑制抗体に変換できることを示した (Ohmi, Ise et al. Nat. Commun. 2016)。そこでMPO特異的抗体にシアル酸を付加することによってpathogenicityを低減させたり、疾患抑制型に変換できるかを試みた。B細胞ハイブリドーマにレトロウイルスを用いてST6Gal1およびST6Gal2を導入し、得られた抗体を精製した。予想に反してシアル酸を付加された抗MPO抗体はMPO結合性が大きく低下していた。この理由として、抗原結合部位あるいはその近傍に糖鎖修飾が施された可能性が考えられた。そこで実験計画を変更し、以降の実験では血管炎患者サンプルを用いたヒトB細胞の解析に焦点を当てることにした。

4) ヒトMPO結合性B細胞の検出

ANCA関連血管炎患者ではMPO特異的B細胞数が増えている、あるいはMPOに高親和性で結合するB細胞が増えているのではないかと予測し、血管炎患者あるいは健常者の末梢血B細胞のMPO結合性をFACS解析により評価した。末梢血IgG陽性B細胞を蛍光標識リコンビナントMPOプローブで染色した。その結果、健常者の末梢血ではMPO結合性B細胞は全く検出されなかったのに対し、血管炎患者の中にはその末梢血にMPO結合性B細胞が検出されるものがあった。これより、血管炎の病態と末梢血MPO結合性B細胞の数が相関する可能性が示された。

5) MPO特異的ヒトモノクローナル抗体の樹立

次に血管炎患者に由来するMPO特異的抗体のpathogenicityを検討する目的で、MPO特異的ヒトモノクローナル抗体の樹立を試みた。患者末梢血からMPO結合性B細胞をシングルセルに分離し、抗体重鎖および軽鎖遺伝子を取得した。これをもとにモノクローナル抗体を発現させ、rMPOに対する結合性をビーズアッセイやELISAにより評価した。その結果、血管炎患者に由来する抗MPOモノクローナル抗体を複数個樹立することができた。

考察

本研究では抗MPOモノクローナル抗体のin vivo pathogenicityを評価する実験系と、血管炎患者末梢血中のMPO特異的B細胞の解析系を樹立することができた。さらに血管炎患者のMPO結合性B細胞からMPOに対して非常に強い結合性を示すモノクローナル抗体が樹立されたことから、MPOに対する親和性が抗体のpathogenicityを規定している可能性が考えられた。これまでに疾患活動性の高い患者由来の抗体が特異的に認識するMPOエピトープが存在することが報告されている。本研究で樹立したモノクローナル抗体がそのようなエピトープを認識しているか、そして実際にpathogenicityを有しているかどうかを今後明らかにする必要がある。

謝辞

MPO欠損マウスをご供与くださり、またマウス糸球体腎炎誘導系についてご助言くださった大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫内科学熊ノ郷淳先生、西出真之先生、および血管炎患者末梢血をご供与くださった東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科藤尾圭志先生、永渕泰雄先生に深く感謝致します。