

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592667

研究課題名(和文)自己免疫網膜症患者血清が認識する網膜特異抗原の網羅的解析と発症機構に関する研究

研究課題名(英文)Molecular Analysis and Clinical Characterization of Autoimmune Retinopathy

研究代表者

菊池 孝信(KIKUCHI, Takanobu)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：50177797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：75例のAIR患者血清について、ウエスタンブロット法(WB)および免疫組織化学的検討を行った。8例の眼関連網膜症患者(AIRの一つの病態：CAR)において免疫組織化学の結果と光干渉断層計(OCT)による網膜断層像の臨床所見と良く一致することから、AIRの診断におけるOCTの有用性を報告した。また、網膜特異抗原の同定を行い、10種類の抗原タンパクを大腸菌で産生させ、組換え融合タンパク質を用いて、WBを行った。CAR抗原として良く知られている ricoverin よりも高い頻度で検出された3種類の新規抗原を見出し、臨床所見との関連について検討している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the clinical and immunological characterization of autoimmune retinopathy (AIR) and to determine the retinal autoantigens recognized by sera of AIR patients. Serum samples obtained from 75 AIR patients were analyzed by Western blot and immunohistochemistry. We reported that AIR was associated with a variety of autoantibodies and the OCT and IHC findings showed some correlation. The cDNA clones of retinal autoantigens were isolated from human retinal cDNA library by PCR and inserted into expression vector of *E. coli*. The recombinant proteins of retinal antigens were purified by affinity chromatography. The sera of AIR patients were examined reactivity against the recombinant proteins by WB analysis. We found that 3 new retinal autoantigens were recognized with more than 7 sera from AIR patients. The new retinal antigens may be a potential tool for further investigation of the pathology associated with AIR.

研究分野：眼科学

キーワード：自己免疫網膜症 癌関連網膜症 プロテオーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫網膜症 (AIR) の一つである癌関連網膜症 (CAR) は 1976 年に初めて報告され、1982 年には患者血清中に網膜特異抗原を認識する自己抗体の存在が示唆され、自己免疫機構の関与が明らかとなった (文献 )。1997 年には非腫瘍型自己免疫網膜症 (npAIR) の症例が報告され、AIR という用語が広く使われるようになった (文献 )。しかし、その病態についてはその詳細は明らかになっていないのが現状である。ARVO 2008 の免疫グループの会議では網膜電位図 (ERG) とウエスタンブロット (WB) の結果で診断した AIR 患者に対して免疫抑制剤の投与試験の結果が報告され、その効果にかなりのばらつきがあることから診断基準の策定の必要性が議論されたが、現在までのところ診断基準は明確になっていない (文献 )。

### 2. 研究の目的

これまでに npAIR を含む 40 例以上の自己免疫網膜症患者血清を検査してきた。本研究計画では手始めに、これらの症例の内、免疫染色の結果と OCT および ERG の結果が良く一致する 15 例 (内 3 例の npAIR) についてより詳細な検討を行う予定である。

本研究課題では、(1) 患者血清が認識する網膜特異抗原タンパクを単離・同定し、(2) その抗原タンパクの生理機能の解析、および (3) 網膜特異抗原に対する自己抗体が網膜組織・視機能に与える障害の有無・程度について電気生理学および組織形態学的な解析を行い、発症機構および病態を分子レベルで解明することを目的として本研究計画を企画した。

### 3. 研究の方法

(1) 患者血清中に網膜特異タンパクに対する自己抗体の存在を確認するために、マウスの各臓器 (網膜、脳、腎臓、肝臓、脾臓) から抽出したタンパク試料を用い、WB を行った。また、これらの抗原タンパクの網膜組織内の局在を検討するために、マウス眼のパラフィン切片を用いた免疫染色を行った。

(2) 特徴的な網膜内局在を示す患者血清について抗原タンパクの同定を LC-MS/MS 質量分析装置を用いたプロテオミクス解析法で行った。マウス網膜から抽出したタンパク試料を 2 次元電気泳動し、患者血清を用いた WB により抗原タンパクを描出する。同じ位置のタンパクスポットを切り出し、タンパク分解酵素によるゲル内消化を行った後、分解産物のペプチドを抽出し、LC-MS/MS にてペプチドのアミノ酸配列を推定する。得られたアミノ酸配列から抗原タンパクをデータベース検索により同定した。

(3) プロテオーム解析により推定された抗原タンパク質について、ヒト網膜由来の RNA

から調整された市販の Marathon-Ready cDNA を用い、抗原タンパクの全翻訳領域を含む cDNA 断片を PCR 法により増幅し、大腸菌発現ベクターに挿入し、大腸菌で大量産生させた。この組換え融合タンパクには His-Tag 部位が存在するため、金属イオンアフィニティカラムを用いて一段階での精製を行った。90% 以上の純度の組換えタンパクを WB の試料とし、75 例の患者血清について検討した。

### 4. 研究成果

(1) 患者血清によるマウスの各組織から抽出したタンパク試料を用いた WB およびマウス眼のパラフィン切片による免疫染色等の生化学検査の結果から、網膜特異抗原が種々の分子量を示し、網膜内での局在も多様性を示すことが明らかとなった。そこで、視細胞内接、錐体細胞外接、ミュウラ細胞、外網状層、内網状層、神経節細胞、網膜色素上皮細胞に特徴的に抗原タンパクが局在している 8 症例について、ゴールドマン視野検査、ERG および OCT 等の臨床所見を詳細に検討した結果、網膜障害部位と抗原タンパクの網膜内局在が良く一致していることから、免疫組織化学検査と OCT の検査が AIR 診断に有用であることを報告した。

(2) アトピー性皮膚炎の患者で進行性の視機能低下が見られ、遺伝的な網膜疾患の可能性が低いことから AIR を疑い、血清検査を施行した。WB では 65 kDa および 14.1 kDa の網膜特異的バンドが描出され、全身的な検索においても腫瘍の存在が検出されないことから npAIR と診断され、アトピー性皮膚炎と npAIR の関連について初めての症例報告となった。

(3) 11 種類の網膜特異的抗原タンパクを組換え融合タンパクとして大腸菌から精製した。75 例の患者血清についてこれらの抗原タンパクとの免疫交叉性を WB にて検討した。その内、8 個の抗原タンパクが複数の患者血清により認識され、3 種類の抗原タンパクはこれまでに AIR に関連した抗原として報告されていない新規の抗原であった。大腸菌由来の融合タンパク部分と強い免疫交叉性を示す 10 例の患者血清を除く 65 例についてさらに検討した。AIR 関連の自己抗原として既知のタンパクとしては、 $\alpha$ -enolase (30 例、陽性率 47%)、 $\gamma$ -enolase (5 例、8%)、ricoverin (4 例、6%)、杆体細胞で発現する  $\alpha$ -transducin (2 例、3%)、錐体細胞で発現する  $\alpha$ -transducin (7 例、11%) であった。 $\alpha$ -transducin について 2 種類の遺伝子産物を別々に検討したのは、今回が初めての試みである。また、網膜内層の細胞で主に発現している遺伝子 A (20 例、31%)、遺伝子 B (11 例、17%)、遺伝子 C (8 例、12%) の 3 種類の新しい抗原タンパクを見出した。これらの遺伝子は ricoverin と関連する遺伝子群であり、しかも陽性率が ricoverin より高いことから、自

己免疫網膜症のバイオマーカーとしての有用性が期待される。患者の OCT および ERG の検査結果から推測される網膜障害の程度との関連について詳細な検討を行っている。

(4) 光受容細胞の一つである錐体細胞に特異的に発現している  $\alpha$ -transducin の一つである GNAT-2 に対する抗体を持つ患者血清の症例について詳細な検討を行った。患者は64歳女性、左眼に進行性の視野狭窄を自覚、遺伝子検査等に結果から、遺伝的網膜疾患の可能性は排除されたため、AIR を疑い血清検査を施行した。WB の結果から5本の網膜特異抗原のバンドが描出された(図-1-1)。組

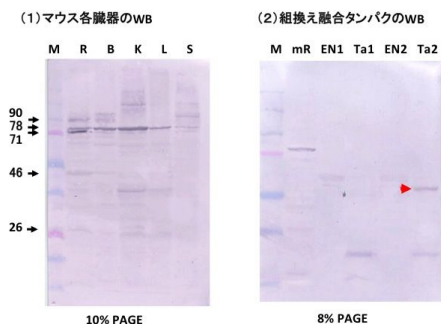


図-1

換えタンパクの WB では GNAT-2 ( 図中 Ta2 と表記 ) のバンドが検出され、GNAT2 に対する抗体の存在が確認された(図-1-2)。

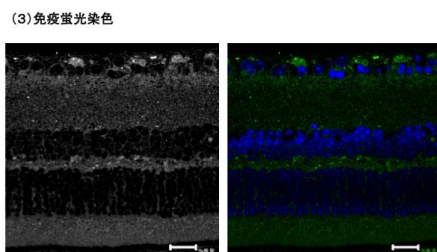


図-2

免疫組織化学では網膜全体が染色された(図-2)。特に、外網状層に強い染色が見られた。臨床検査では、右眼は ERG、OCT とも異常は見られなかったが、左眼では ERG において杆体 / 錐体とも振幅が低下し、OCT の網膜断層

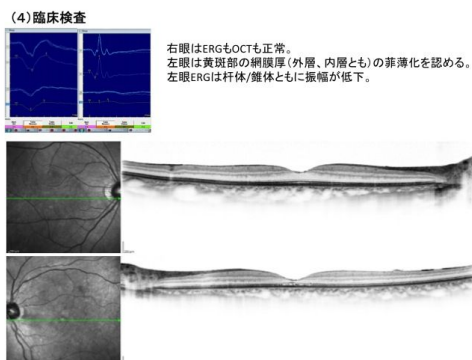


図-3

像では左眼の黄斑部の菲薄化が顕著に見られた(図-3)。

錐体細胞で特異的な発現が知られている GNAT-2 に対する抗体が網膜障害の一因と推測された。

本研究により、新たに見出した AIR に関連した網膜特異抗原や既存の抗原を用いてバイオマーカーとしての有用性をさらに探索し、AIR の新しい診断法の開発に繋げていく予定である。

#### <引用文献>

Sawyer RA, Selhorst JB, Zimmerman LE, et al. Blindness caused by photoreceptor degeneration as a remote effect of cancer. *Am J Ophthalmol* 1976; 81: 606-613.

Kornguth, S.E., Klein, R., Appen, R., Choate, J. Occurrence of anti-retinal ganglion cell antibodies in patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1982; 50: 1289-1293.

Mizener JB, Kimura AE, Adamus G, et al. Autoimmune retinopathy in the absence of cancer. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 607- 618.

Peek R, Verbraak F, Coevoet HM, Kijlstra A. Müller cell-specific autoantibodies in a patient with progressive loss of vision. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 39, 1976-1979 (1998).

Forooghian F, MacDonald IM, Heckenlively JR, Heon E, Gordon LK, Hooks JJ, Detrick B, Nussenblatt RB. The need for standardization of antiretinal antibody detection and measurement. *Am J Ophthalmol*, 2008; 146: 489-495.

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

( 雑誌論文 )( 計 2 件 )

Makiyama Y, Kikuchi T, Otani A, Oishi A, Guo C, Nakagawa S, Ogino K, Kojima H, Kurimoto M, Yoshimura N. Clinical and immunological characterization of paraneoplastic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Aug 13; 54(8): 5424-5431. 査読有 doi: 10.1167

Nomura T, Kayama T, Okamura E, Ogino K, Uji A, Yoshimura N, Kikuchi T, Fujisawa A, Tanioka M, Miyachi Y, Kabashima K. Severe atopic dermatitis accompanied by autoimmune retinopathy.

Eur J Dermatol. 2013 Apr 1;23(2):263-264.  
査読有 doi: 10.1684

[学会発表](計 6件)

Identification of choroidal neovascularization in eyes with cuticular drusen by spectral-domain optical coherence tomography. Sato A, Fukui E, Senda N, Koshino A, Ohta K 14th Euretina Congress in London, 11-14 September 2014

自己免疫性網膜症の血清検査法の現状と課題 菊池孝信、第5回北海道眼炎症セミナー、2014年8月22日、札幌

自己免疫性網膜症を併発した成人発症型アトピー性皮膚炎の1例 野村尚史(京都大学)、嘉山智子、岡村恵美、藤澤章弘、谷岡未樹、椋島健治、宮地良樹、荻野顕、宇治彰人、吉村長久、菊池孝信 日本皮膚科学会雑誌 123巻8号 Page1559 (2013)、第112回日本皮膚科学会総会、2013年6月15日、横浜

Idiopathic macular hole closure toward the optic disc after internal limiting membrane peeling. Ohta K, Sato A, Fukui E European Association for Vision and Eye Research Congress in Nice, 18-21 September 2012

Vogt-小柳-原田病寛解期における血清中の抗網膜抗体についての検討 今井弘毅、太田浩一、菊池孝信 日本眼科学会雑誌 116巻 臨増 Page379 (2012)、第116回日本眼科学会総会、2012年4月6日、東京

全盲へ至った自己免疫性網膜症が疑われた一例 吉田章子(西神戸医療センター)、三河章子、牧山由希子、荻野顕、大谷篤史、吉村長久、高橋政代、菊池孝信 日本眼科学会雑誌 116巻 臨増 Page325 (2012)、第116回日本眼科学会総会、2012年4月5日、東京

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

菊池 孝信 (KIKUCHI, Takanobu)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：5 0 1 7 7 7 9 7

### (2)研究分担者

太田 浩一 (OHTA, Koichi)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：7 0 2 6 2 7 3 0

宮原 照良 (MIYAHARA, Teruyosi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：8 0 3 6 2 1 3 5

### (3)研究協力者

吉村 長久 (YOSHIMURA, Nagahisa)  
京都大学・医学部・教授  
研究者番号：7 0 2 1 1 6 6 2

牧山 由希子 (MAKIYAMA, Yukiko)  
京都大学・医学部・大学院生

亀谷 清和 (KAMETANI, Kiyokazu)  
信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・技術専門員

鈴木 佳代 (SUZUKI, Kayo)  
信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・技術員

石川 えり (ISIKAWA, Eri)  
信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・技術員