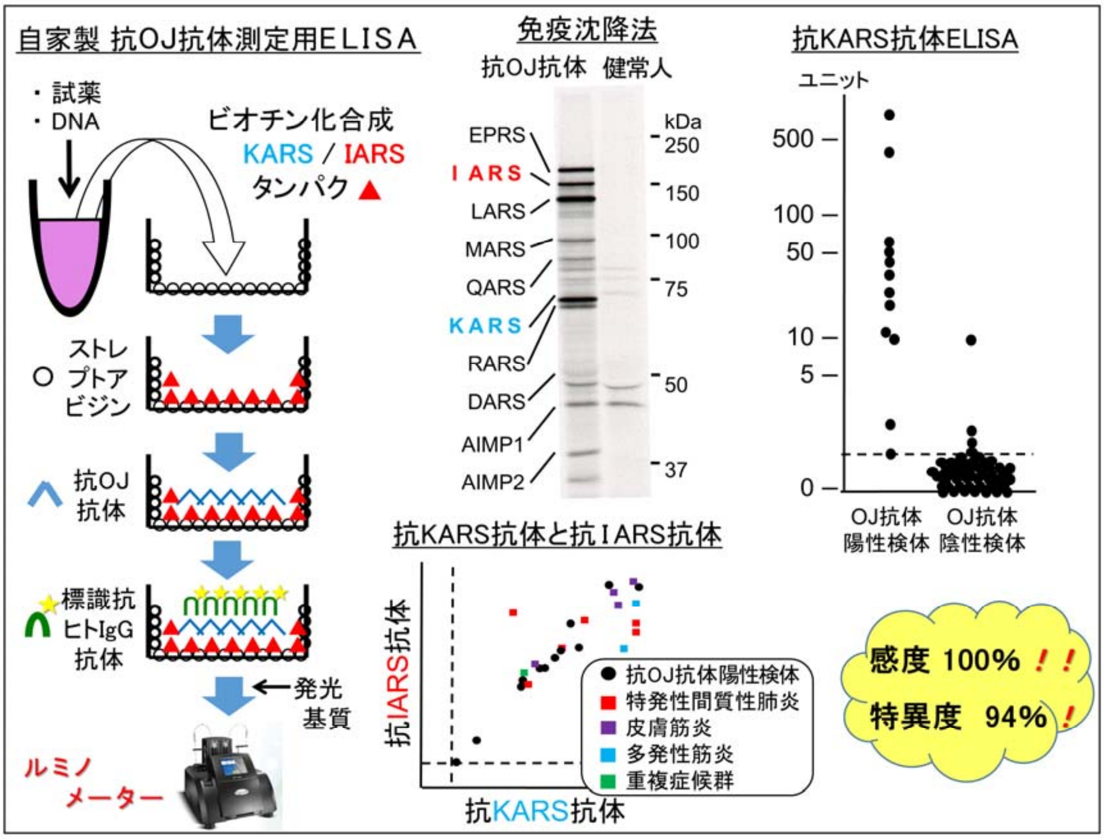


自己免疫性の筋炎や間質性肺炎患者における血清中自己抗体の新規測定法の開発に成功

～患者の持つ抗 OJ 抗体はリジル tRNA 合成酵素とイソロイシル tRNA 合成酵素を認識する～

名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚科学の室 慶直准教授（同大医学部附属病院 診療教授）、秋山真志教授を中心とする研究グループは、産業医科大学 産業保健学部 成人・老年看護学講座の佐藤 実教授らと連携して、分子生物学的手法により合成したリジル tRNA 合成酵素とイソロイシル tRNA 合成酵素を用いた ELISA という免疫学的手法によって、自己免疫疾患患者血清中の抗 OJ 抗体（OJ は最初に発見された患者さんの頭文字と言われています）が簡便に測定できることを明らかにしました。

多発性筋炎／皮膚筋炎のような自己免疫疾患や一部の間質性肺炎においては血液中に、患者さん自身の持つタンパク質に対する抗体（自己抗体）が見つかることが特徴的です。その中でもアミノアシル tRNA 合成酵素（ARS）（※1）という体内でタンパク質を作る際に重要な働きをする酵素に対する自己抗体が血液中に見つかる疾患は抗 ARS 抗体症候群（※2）と呼ばれ、間質性肺炎、関節炎、筋炎、皮膚症状など様々な臓器に病変を生じます。これまでに６種類の抗 ARS 抗体が、診断と予後予測において重要な自己抗体として報告されていますが、そのうちの５種類については保険診療内の採血検査で各抗体の有無を調べることができます。しかし、残りのひとつである抗 OJ 抗体については検査キットの開発が難しく、その測定は諦めざるをえませんでした。海外で市販されている検査キットの中には、抗 OJ 抗体を測定できると謳っている商品もありますが、これまで偽陽性や偽陰性の結果が殆どで、信頼できるレベルに至っていません。この抗体を確実に測定できる方法としては、煩雑で放射性物質を取り扱わなければならず、熟練者が行う必要のある免疫沈降法（※3）が唯一の方法でした。今回、研究グループは、放射性物質を用いず、熟練者でなくても簡便に抗 OJ 抗体を測定できる ELISA 法を、初めて開発しました。

この研究成果は、国際科学誌 Journal of Autoimmunity に掲載されました（2021 年 6 月 11 日付）。

ポイント

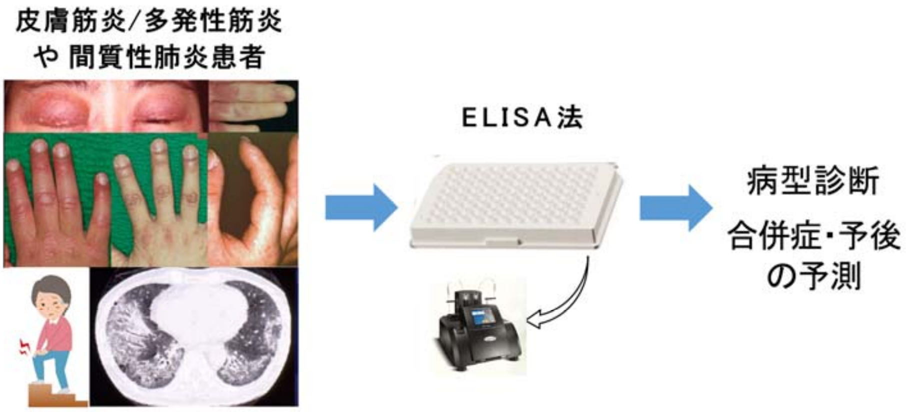
○抗 OJ 抗体が *in vitro* 転写・翻訳系により合成したリジル tRNA 合成酵素（KARS）とイソロイシル tRNA 合成酵素（IARS）と反応することを見出しました。

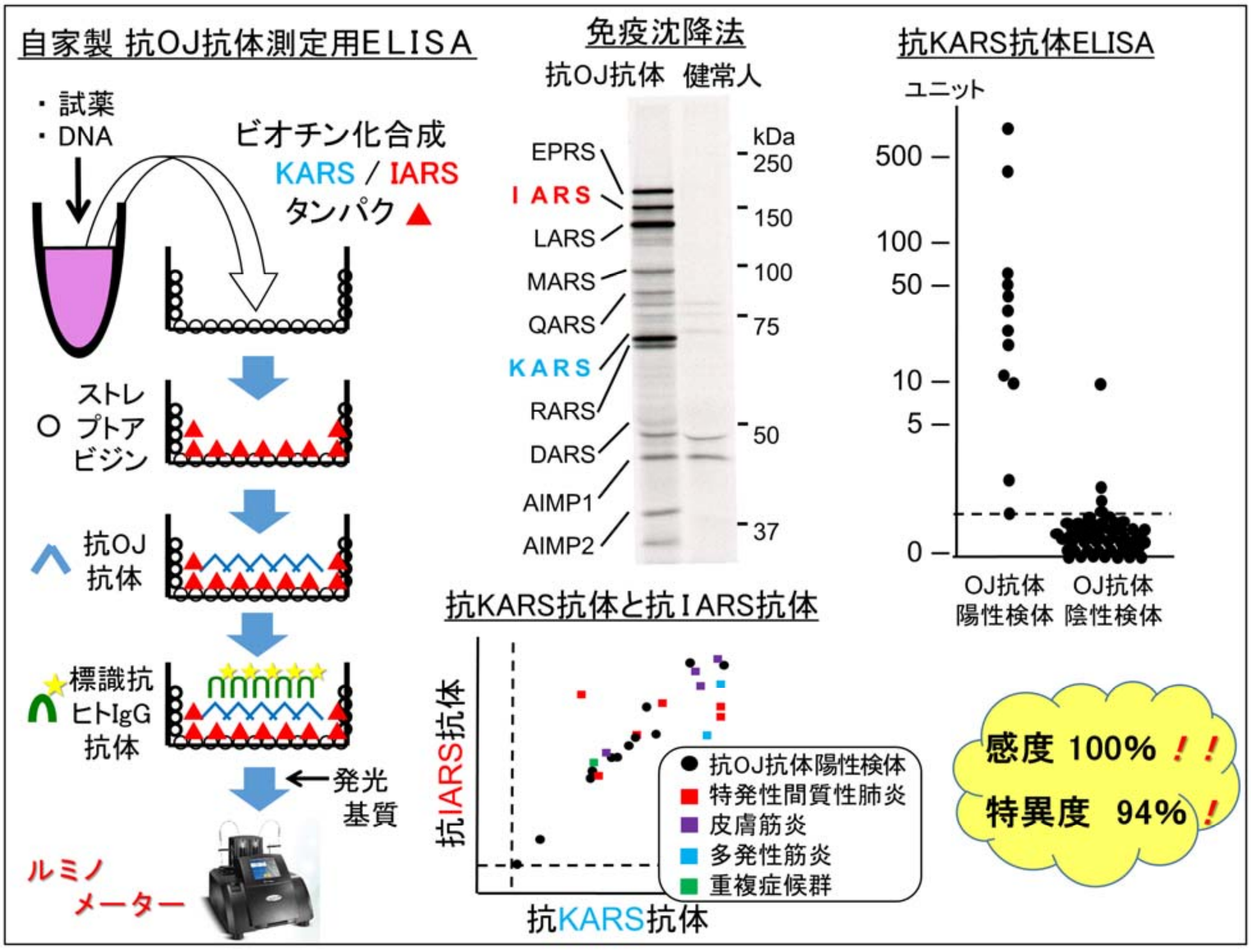
○KARS および IARS の合成タンパクを用いた ELISA による抗 OJ 抗体の測定結果は、これまでの免疫沈降法による測定結果と高い一致率を示しました。

○今回開発した ELISA 法によって、自己免疫疾患患者血清中の抗 OJ 抗体について、多数の検体の安全、迅速な定量的測定が可能になりました。

１．背景

膠原病を代表とする全身性の自己免疫疾患は、自己の成分（抗原）に対する抗体（自己抗体）の産生や炎症反応など過剰な免疫反応により生じます。これまでに何十種類にも及ぶ、膠原病に特徴的とされる自己抗体が解っており、その中には病気の診断や病気のタイプ別分類（重症か軽症か、どんな臓器に病気が及ぶか）、予後の推定などに非常に役立つものが多数あります。多発性筋炎／皮膚筋炎といった膠原病や、膠原病の肺病変としても代表的な間質性肺炎の一部においても、特徴的な自己抗体が存在します。その中で、体内でタンパク質が合成される際に重要な酵素群であるアミノアシル tRNA 合成酵素（ARS）に対する自己抗体が血清中に存在する患者さんは抗 ARS 抗体症候群と呼ばれ、間質性肺炎、発熱、関節炎、筋炎、皮膚症状など様々な臓器に病変が生じます。これまでに６種類の代表的な抗 ARS 抗体が知られており、そのうちの 5 種類の抗体については保険収載されている採血検査で測定可能ですが、残りのひとつである抗 OJ 抗体については検査キットの開発が困難で、その測定は断念されてきました。海外で市販されている検査キットの中には、本抗体を測定できると謳っている商品もありますが、これまで偽陽性、偽陰性の結果が殆どで、臨床使用のレベルに至っていません。抗 OJ 抗体を確実に測定する方法としては、放射性物質を用い、煩雑で熟練者のみが実施・判定可能な免疫沈降法が唯一の方法でした。今回、研究グループは簡単、安全で特別な熟練者でなくても本抗体を定量的に測定できる ELISA 法を初めて開発しました。





２．研究成果

抗 OJ 抗体が反応する抗原は少なくとも 8 種類の ARS と 2 種類の他のタンパク質との複合体から成っており、そのうちの isoleucyl-ARS が主要な抗体の標的分子であると考えられてきましたが、残念ながら isoleucyl-ARS の合成タンパク質を用いた検査キットは開発できない、もしくは市販されているキットも信頼性が低いものしか無いのが現状でした。私たちはこれまでに他の複数の自己抗体について独自の ELISA という測定系を樹立させてきましたので、これを抗 OJ 抗体の測定に応用することにしました。市販の *in vitro* 転写翻訳系（鋳型となる DNA から RNA を合成し、さらにタンパク質合成まで試験管内で行う）というタンパク合成系を用いて発現させた isoleucyl-ARS と、さらに複合体の別の成分である lysyl-ARS について患者さんの抗 OJ 抗体が反応するか調べたところ、両者ともに免疫沈降法という方法で同定された複数の抗 OJ 抗体が反応しました。そして、次に免疫沈降法で抗 OJ 抗体が陽性か陰性かについて判明している 76 例の検体を用いて、ELISA 法で抗体の陽性と陰性を判定できるか検討し、それぞれを区別する反応値を決定しました。それによって得られた抗体の結果は、isoleucyl-ARS を利用した場合も lysyl-ARS を利用しても、感度（免疫沈降法で陽性が確かな検体の陽性率）が 100%、特異度（免疫沈降法で陰性が確かな検体の陰性率）が 93.8%と高い性能を示しました。

次に lysyl-ARS を用いた ELISA 法を使って、皮膚筋炎／多発性筋炎の患者さん 279 名と病像や血液検査所見から抗 OJ 抗体の可能性を考えた特発性間質性肺炎の患者さん 22 名の検体を用いて、抗 OJ 抗体の存在を調べたところ、13 名の陽性患者さんが見つかりました。これら検体の抗 OJ 抗体は免疫沈降法を用いた検査でも真に陽性であることが確認されました。6 名が特発性間質性肺炎、

4 例が皮膚筋炎、2 例が多発性筋炎、1 例が筋炎と全身性エリテマトーデスの重複症候群でした。多くの患者さんはこれまで言われてきた抗 ARS 抗体症候群に見られる症状を多く伴っていることが判明しましたが、新たに 4 名の患者さんに内臓悪性腫瘍が合併していたことが明らかとなり、抗 OJ 抗体と悪性腫瘍との関連についてはさらなる研究が必要です。以上の結果から、今回開発した検査法は多くの患者さんの検体検査に有用であることが示唆されました。

３．今後の展開

今回の研究成果から、これまで単一の合成タンパクを用いた簡便な測定系の開発は難しいと考えられていた抗 OJ 抗体について、一般の検査室レベルで合成可能なタンパクによる簡便な方法で測定できることが明らかになりました。今後、この領域の専門企業との連携等により、合成タンパクの安定した大量生産システムを導入し、病院検査室での抗 OJ 抗体測定を可能とする検査キットの開発が期待されます。

４．用語説明

※1 アミノアシル tRNA 合成酵素：ATP の存在下でアミノ酸を活性化し，tRNA の 3′末端のアデノシンにアミノ酸を結合させ，アミノアシル tRNA をつくる酵素です。この反応は，遺伝暗号の翻訳，すなわちタンパク質の合成において非常に重要な役割を持ちます。生体内の 20 種類のアミノ酸に対応して、isoleucyl-ARS、lysyl-ARS 等、それぞれ特異的な酵素が存在します。

※2 抗 ARS 抗体症候群：抗合成酵素症候群（anti-synthetase syndrome）とも呼ばれます。患者血清中にアミノアシル tRNA 合成酵素（ARS）に対する自己抗体を認め、間質性肺炎、筋炎、皮膚症状（“機械工の手”と呼ばれます）、発熱、関節炎などをきたす疾患です。皮膚筋炎や多発性筋炎の診断基準を満たす場合と満たさない場合があります。また、筋肉の病理組織が特徴的なことから、本症候群を独立した疾患概念として扱う考え方もあります。

※3 免疫沈降法：多発性筋炎・皮膚筋炎や強皮症などの膠原病患者さんの自己抗体の同定に使用される測定法の一つ。通常、放射性物質で標識した培養細胞のタンパク質や RNA と患者抗体を反応させ、その反応物質（抗原抗体複合体）をセファロースやアガロースといった担体を用いて、遠心分離して回収し、ゲル電気泳動を用いて分離、解析を行います。いわゆる自己抗体同定のゴールドスタンダード（絶対的な基準）となる方法ですが、放射性物質を扱う、時間がかかる、解析に熟練者の鑑識眼を必要とする等の難点があります。

５．発表雑誌

掲雑誌名：Journal of Autoimmunity

論文タイトル：Immune recognition of lysyl-tRNA synthetase and isoleucyl-tRNA synthetase by anti-OJ antibody-positive sera

著者：Yoshinao Muro[a,*], Yasuhiko Yamano[b], Ken Yoshida[c], Yohsuke Oto[c], Kimiko Nakajima[d], Teruyuki Mitsuma[e], Shiori Kikuchi[f], Akihiro Matsumae[g], Mariko Ogawa-Momohara[a], Takuya Takeichi[a], Yasuhiro Kondoh[b], Masao Katayama[g], Yasuyuki Todoroki[h], Yoshiya Tanaka[h], Minoru

Satoh[i], Masashi Akiyama[a]
所属：[a]Department of Dermatology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan
[b]Department of Respiratory Medicine and Allergy, Tosei General Hospital, Seto 489-8642, Japan
[c]Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan
[d]Department of Dermatology, Kochi Medical School, Kochi University, Kochi 783-8505, Japan
[e]Department of Dermatology, Ichinomiya Municipal Hospital, Ichinomiya 491-8558, Japan
[f]Division of Neurology, First Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical University, Asahikawa 078-8510, Japan
[g]Department of Internal Medicine, Nagoya Medical Center, National Hospital Organization, Nagoya 460-0001, Japan
[h]The First Department of Internal Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807-8555, Japan
[i]Department of Clinical Nursing, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807-8555, Japan
* Corresponding author
DOI：10.1016/j.jaut.2021.102680

English ver.
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Jou_Aut_210611en.pdf