

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2抗体、膠原病、肺高血圧症、抗GABA受容体抗体
研究成果 : 下記

【背景】

Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) は、ACEに拮抗し、血管保護に働く。我々はACE2に反応する自己抗体を同定し報告した (Takahashi Y, Haga S, **Isizaka Y**, **Mimori A**. *Arthritis Res Ther* 2010, 12(3):R85)。血清抗ACE2抗体は、膠原病 (SLE、強皮症、MCTD) の肺動脈性肺高血圧症/PAH、末端壊死患者において高率に陽性であった。また血管病態がない患者でも、SLE活動期には抗ACE2抗体が出現するが、それらはACE2阻害活性のない抗体であること、すなわちACE2阻害抗体のみが血管病態と相関する結果を得た。これらの続きとして、本研究を行なった。

【本研究結果の概要】

本研究では、血清抗ACE2抗体の測定対象を、SLE以外の膠原病にも広げて検討した。収縮性血管病態患者の血清IgG分画による、in vitro ACE2活性の阻害作用を感度よく検出する測定系 (HPLC) を確立し、および多数の血清のELISA測定に用いるヒト発現系によるACE2蛋白の精製法を改良した。またACE阻害と血管病態の関連を裏付ける研究として、ACE2活性の増強分子が、肺高血圧動物モデルで治療効果を示すことを見出し、論文報告した (Haga S, Tsuchiya H, Hirai T, Hamano T, **Mimori A**, **Ishizaka Y**. *A novel ACE2 activator reduces monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF- β cascades with restored caveolin-1 expression. Exp Lung Res.* 2015, 41(1):21-31)。

本研究のもう1つの課題として、我々は膠原病患者血清中の新規自己抗体を検索するため、ランダムペプチド反応系を用い、候補配列を選別するアルゴリズムを試みてきた。実際に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見出し、論文報告した

(Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, **Ishizaka Y**, **Mimori A**. *Identification of novel autoantibodies to GABA(B) receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford).* 2014, 53(7):1219-28)

【ACE2阻害抗体の、強皮症、MCTDにおける出現頻度、病態との相関】

我々が血清抗ACE2抗体の存在を評価した患者は、SLEが最も多かったが、以下のように血管病態PAH (pulmonary arterial hypertension) がみられる他の膠原病でも検討した。

方法 : MCTD (mixed connective tissue disease、混合性結合組織病)、SSc (systemic sclerosis、強皮症) 21人を対象とした。MCTD-PAH 1、SSc-PAH 2、強皮症腎既往 1、MCTD末端壊死 2、SSc末端壊死 2の計8人、および血管病態なし13人 (MCTD 6、SSc 7) から、血清IgG分画を抽出し、1 μ g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)。

結果 : IgG分画によるACE2活性の有意な低下が、PAH 3人、末端壊死 2人にみられ (5/8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。これら8人の抗ACE2-ELISA陽性率は、MCTD-PAH 1/1、SSc-PAH 1/2、MCTD末端壊死 2/2、SSc末端壊死 0/2、強皮症腎 (7年前の既往) 0/1だった。収縮性血管病態のない13人のIgGはACE2活性を阻害しなかった。

すなわち SLE だけでなく、強皮症・MCTD の収縮性血管病態の血清 IgG 分画にも、ACE2 阻害活性がみられた。

【抗 ACE2 抗体による ACE2 阻害作用のアッセイ法の改良。Ang(1-7)定量による方法】

血管病患者血清 IgG による、in vitro ACE2 活性の阻害効果をみるアッセイ法として、合成基質による従来の ACE2 活性測定は、反応の時間依存性が一定せず、感度も十分でないと思われた。また、反応は生理的基質 Angiotensin II (AngII) を用いて反応産物 Ang(1-7) を測るほうが、臨床意義が高いと判断した。基質と産物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した。

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。

すなわち、Angiotensin(1-7)定量による in vitro ACE2 活性評価は、血管病態患者の血清中の抗 ACE2 阻害抗体を高感度に検出した。

<Power Point 図に、上記結果を示した>

【ほ乳類細胞系で発現抽出したヒト ACE2 蛋白の精製：抗 ACE2-ELISA に用いる抗原の安定供給するための研究作業】

ACE2 タンパクを哺乳類細胞系タンパク質発現システム Expi293-Expression System を用いて発現・精製した。この系は、それまでに用いていた発現系 FS293 よりも収量がよかった。

培養・精製プロトコルを以下に記す。

Expi293 による human ACE 2 発現

培養条件 37°C、8%CO₂、125rpm

Transfection

250mL 蓋つきフラスコに Expi293 細胞 50mL (2.5×10^6 cell/mL に調整) 分注

ExpiFectamine293 Reagent を用い hACE2 プラスミド DNA をトランスフェクションした。

2.5mL の Opti-MEM に 133μL の 293transfectamin を加え、5 分間静置した。同時に 50μg 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（120 g、R.T.5 分間、）培養上清を回収、新しい medium を 2.5×10^6 Cell/mL になるように加え、更に 48 時間培養後培養上清を回収した。

培養上清からの human ACE2 タンパク精製

回収した培養上清は 25mM Tris-HCL (pH8.5) で透析し、Diethylaminoethyl (DEAE) を用いたイオン交換クロマトグラフィー（セルロファイブ 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、h ACE2 含有の高い画分を集め pH 7 付近へ調整した。次に Hydroxyapatite (Ceramic Type II) で精製を行った。溶出はリン酸で行い、SDS7.5%ゲルで泳動し CBB 染色 WesternBlot (Ab:α-ACE2) で確認した。

以上で、電気泳動上、蛋白染色で 1 本バンドとなる精製 ACE2 を得る手順が、確立した。

【抗 GABA 受容体 b 抗体の、SLE 患者における陽性率評価】

ランダムペプチドライブラリー法で、SLE 患者血清中の自己抗体の標的候補として、我々は GABA 受容体 b を同定した。抗 GABA 受容体 b1, b2 抗体の陽性率を、SLE 患者（88 人）だけでなく、本研究機関中に疾患対照の検体数を増やし（強皮症 20 人、筋炎 20 人、血管炎 20 人）、論文報告した。同抗体の陽性率は、対照疾患に比べ SLE で有意に高く ($p < 0.001$)、SLE 活動性スコア (SLEDAI) と正相関し、中枢神経ループスの髄液 14/23 で陽性だった。抗 GABA 受容体 b1, b2 抗体は、SLE 活動性および中枢神経病態と相関すると考えられた。

Subject No. : 25 指 105
Title : Pathogenicity of autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 or GABA receptors, and a prevalence of the autoantibodies in patients with connective tissue diseases
Researchers : Akio Mimori, Yukihito Ishizaka
Key word : anti-angiotensin converting enzyme 2, connective tissue disease, pulmonary hypertension
anti-GABA receptor antibodies, SLE
Abstract : shown below

Backgrounds and a summary of the present study

Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), a homolog of ACE, has been known as a negative regulator of renin-angiotensin system, which converts vasoconstrictor peptide angiotensin II (Ang-II) into vasodilator Ang (1-7). We previously reported novel autoantibodies to ACE2, which predisposed patients with connective tissue disease accompanied by constrictive vasculopathies, i.e., pulmonary arterial hypertension/PAH or digital necrosis previously [Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, Mimori A: Arthritis Res Ther. 2010, 12 (3) :R85-92] . That study included vasculopathy patients with systemic lupus erythematosus (SLE), scleroderma (SSc), or mixed connective tissue disease (MCTD) and control patients with SLE or scleroderma having no vasculopathy. Our further study suggested that patients with active SLE without vasculopathy also had high titers of serum anti-ACE2 antibodies.

This study investigated the prevalence of anti-ACE 2 inhibitory antibodies in patients having other than SLE and the methodology of inhibition assay for in vitro ACE2 by serum IgG fraction from the patients. We also established a therapeutic animal model of pulmonary hypertension using an ACE2 activator molecule, which had been found by Ishizaka et al, and reported the effective results [Haga S, Tsuchiya H, Hirai T, Hamano T, Mimori A, Ishizaka Y. A novel ACE2 activator reduces monocrotaline- induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF- β cascades with restored caveolin-1 expression. Exp Lung Res. 2015, 41(1):21-31] .

As another theme of the present study, we estimated the prevalence of serum antibodies to GABA receptors in patients with SLE, and reported the results [Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA(B) receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford). 2014, 53(7):1219-28]

Inhibitory serum autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with scleroderma (SSc) or mixed connective tissue disease (MCTD) having pulmonary hypertension or digital necrosis

Methods: Serum IgG fraction was purified from 21 patients (pts) with MCTD or SSc including 8 vasculopathy pts (3 PAH, one SSc renal crisis, 4 digital necrosis), and 13 non-vasculopathy pts. ACE2 in vitro activity under co-incubation with 1 mcg IgG fraction 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 5 (3 PAH, 2 digital necrosis) out of the 8 vasculopathy pts, which were 5-25% of the control activity in 4 pts. Anti-ACE2-ELISA titer was positive in 2/3 of PAH pts and 2/4 of digital necrosis pts. One SSc patient having the history of renal crisis seven years ago showed negative serum anti-ACE2-antibodies. None of the IgG fractions from 13 non-vasculopathy pts showed ACE2 inhibition.

Researchers には、分担研究者を記載する。

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

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

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.

Identification of novel autoantibodies to GABAB receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

Backgrounds: SLE is arguably the most clinically and serologically diverse autoimmune disease, with >100 autoantibodies (anti-double-stranded DNA antibodies and anti-Sm antibodies) found in patients and disease spectra ranging from subtle symptoms to life-threatening multiorgan failure. Not a few patients with SLE suffer from neuropsychiatric symptoms. NPSLE is probably mediated by autoantibodies, microvasculopathy and intracranial production of inflammatory mediators, often in combination. Although several studies have shown a positive correlation between NPSLE and autoantibodies (aPLs, anti-ribosomal P antibodies and autoantibodies that bind to neuronal antigens such as N-methyl-D-aspartate glutamate receptor), little is known about how these autoantibodies are involved in disease pathogenesis. The gamma-aminobutyric acid type B receptors (GABARs) are G-protein coupled receptors for GABA, the main inhibitory neurotransmitter in the brain. In this study, using a random peptide display library (RPDL), we identified GABAR subunits as candidate antigens in patients with SLE. Based on reactivity with serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with SLE, we looked at the possible link between anti-GABAR antibodies and disease activity and NPSLE.

Methods. Preparation of recombinant proteins of GABARs: We prepared recombinant proteins of the amino-terminal(N) region of GABARs, where epitopes of candidate autoantibodies were identified by RPDL. Full-length human GABAR1b cDNA was purchased. An amino-terminal (N) region of the extracellular domain (aa 1-475) was amplified by PCR and cloned into pcDNA3.1 vector. The FLAG sequence, consisting of eight aa (DYKDDDDK), was inserted just after the C-terminus. For the GABAR2 1220 N-terminal extracellular domain (aa 1-480), cDNA with the FLAG sequence inserted just after its N-terminal signal sequence was synthesized using Eurofins MWG Operon and cloned into pcDNA3.1 vector. FreeStyle 293 cells were transfected with plasmid DNA encoding GABAR1b-FLAG or FLAG-GABAR2 according to the manufacturer's protocol. On day 2 after transfection, supernatants were collected and purified by column

Researchers には、分担研究者を記載する。

chromatography using diethylaminoethyl cellulose. Detection of anti-GABARB1b and anti-GABARB2 antibodies in patients' serum and CSF samples ELISA was performed; 96-well plates were coated with 250 ng of GABARB1b-FLAG or FLAGGABARB2 in cold bicarbonate buffer (pH 9.6) overnight. Wells were washed and blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline Tween 20 [TBS-T; 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl and 0.1% Tween 20]. Sera were diluted 1000-fold with 0.25% skim milk in TBS-T and undiluted CSF was added. After incubation for 1 h at room temperature, the wells were rinsed five times with TBS-T and developed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human IgG antibody. SureBlue TMB was used as an HRP substrate and optical density (OD) at 450nm was measured. All samples were independently assayed twice. OD values were normalized to samples from one patient. The intra-assay coefficients of variation for anti-GABARB1b and anti-GABARB2 antibodies were 9.0% and 9.2%, respectively. The cut-off values for positive and negative assignments were determined as mean values + 3 S.D. compared with controls. We defined serum samples as positive when OD values were >0.39 (anti-GABARB1b) or >0.31 (anti-GABARB2). We defined CSF samples as positive when OD values were >0.47 (anti-GABARB1b) or >0.46 (anti-GABARB2). ELISA was performed with recombinant proteins of GABARB1b and GABARB2 on serum samples from patients with SLE (n = 88), scleroderma (n = 20), myositis (n = 20) or vasculitis (n = 20) as well as healthy subjects (n = 20). Cerebrospinal fluid (CSF) from 23 patients with SLE was also examined. Disease activity of SLE was measured by a conventional index (SLEDAI).

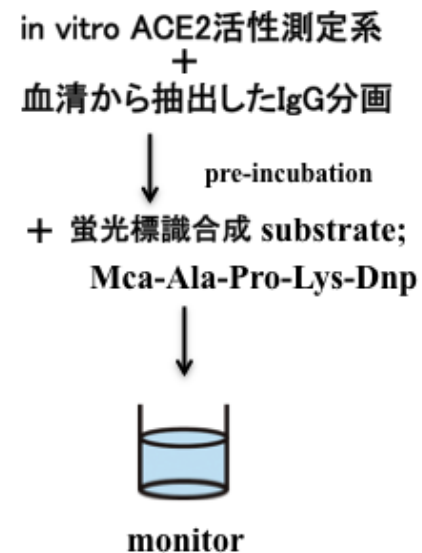
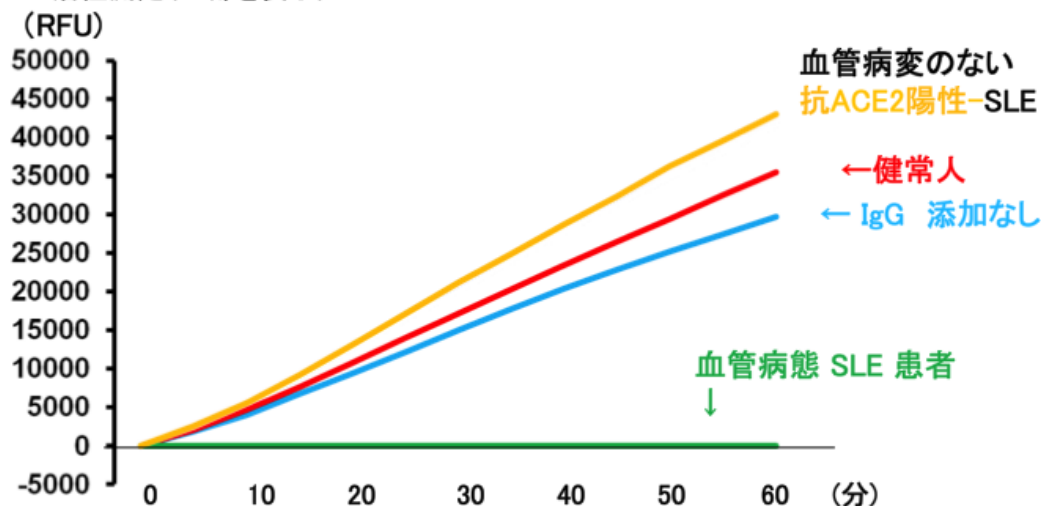
Results. Autoantibodies to GABARBs were exclusive to patients with SLE ($P < 0.001$) and positively associated with SLEDAI (anti-GABARB1b, $P = 0.001$; anti-GABARB2, $P < 0.001$). Of note, autoantibodies were positively linked with NPSLE (anti-GABARB1b, $P = 0.02$; anti-GABARB2, $P = 0.03$). Moreover, anti-GABARBs was detected in 61.5% of CSF samples from patients with active NPSLE, a frequency that was significantly higher than that for patients with non-SLE syndromes.

Conclusion. Anti-GABARB antibodies could represent novel candidate markers for disease activity and NPSLE.

膠原病血管病態の患者血清中の抗ACE2 抗体による、in vitro ACE2 への阻害作用：

背景：血清抗ACE2抗体は、膠原病(SLE, SSc, MCTD)患者の一部にみられ、収縮性血管病態(肺高血圧症, 末端壊死)と抗体陽性が相関した(Arthritis Res Ther 2010)。SLEでは、血管病態がない患者でも、活動期に抗ACE2抗体が出現したが、それらはACE2阻害作用のない抗ACE2抗体であった。強皮症/SSc、MCTDでは、血管病態のある患者のみに抗ACE2抗体がみられ、ACE2阻害を示した。

ACE2活性測定(一部を表示)



我々の従来法では、合成基質を用いin vitro ACE2活性を測定し、患者血清中のACE2阻害抗体を調べた。すなわち市販ACE2蛋白+ 血清IgG1 μ g + バッファ70 μ l (Black plate well)を室温静置、蛍光標識合成基質と混和、Safire II (TECAN)を用い、吸光度を波長 320/450nmで60分間測定。

結果は図のように、IgG 蛋白がACE2 活性を(不明な機構により)上昇させ、血管病変患者のIgGは、逆にACE2活性を(自己抗体による作用で)抑制した。しかし合成基質の吸光度測定は、結果のばらつきが多く、生理分子でもないもので、今回の研究で測定法を改良した。

今回の研究で改良した方法

ACE2活性を、実際の基質であるAngiotensin (Ang) II の、Ang(1-7)への変換率によって測定した。

蛍光標識AngII, Ang1-7を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、患者血清 IgG によるACE2阻害を定量した。装置には島津製作所製の高速液体クロマトグラフを用いた。

human ACE2(10ng/ μ l)を、ACE2 activity bufferで10倍希釈し、ACE2 activity buffer と human ACE2 10 μ lとサンプル IgG 5ng/ μ lを混ぜて、30分室温でインキュベート。

FAM-Ang II を10 μ l混ぜて、遮光し、1時間、37°Cでインキュベート。

0.5M EDTAで反応を停止した。

Ultracel 10K Membraneのフィルター付きエッペンチューブにサンプルを入れて、14000 rpm 30分室温で遠心した。

フィルターを通り、遠沈したサンプルをHPLCで測定した。

HPLC(ODS カラム)へのペプチド断片などの持ち込みを避けるため、10 kDa cut filter (Amicon Ultra 10k)でフィルトレーションした。

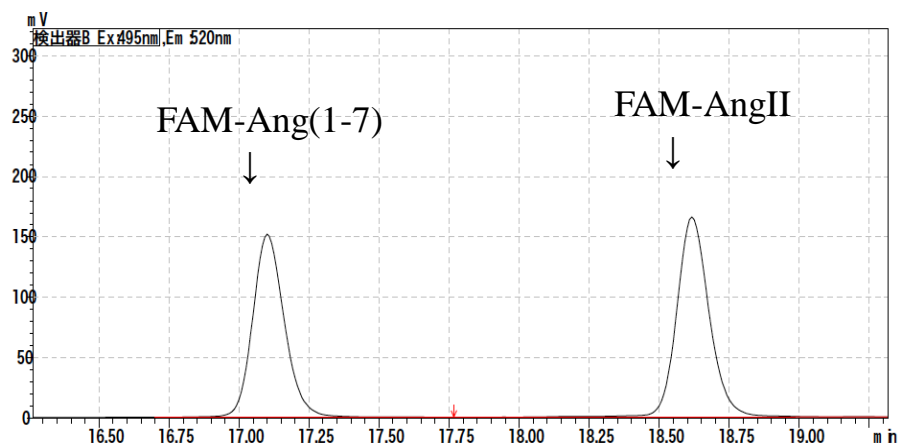
フィルターに残る Ang II, Ang (1-7) を、Grij 35 0.05% 添加、ACE2 activity buffer で2回 wash した

(収率の予備的検討: wash 4回後に回収した Ang II, Ang(1-7) の収率を基準にとった収率が、0回で15%、1回で88%、2回で95%、3回で100%だったので、2回 wash で十分とみなした)

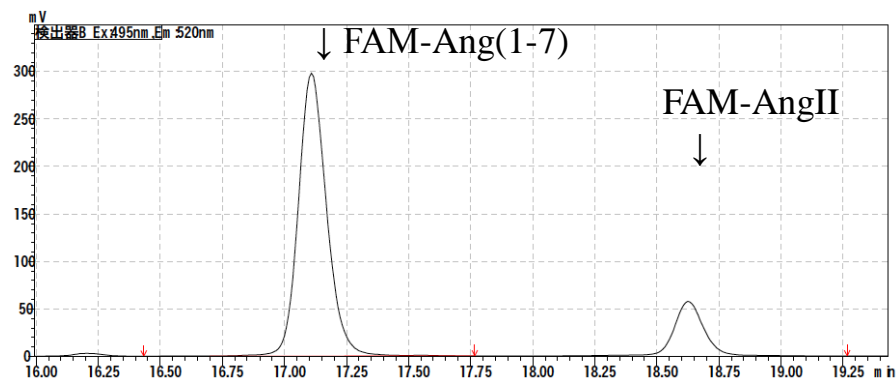
In vitro ACE2による、生理的基質Ang IIから生理的反応産物Ang (1-7)への変換を、高速液体クロマトグラフィーで定量した結果。患者および対照者の血清IgGを加えたときの変化

FAM; 蛍光標識

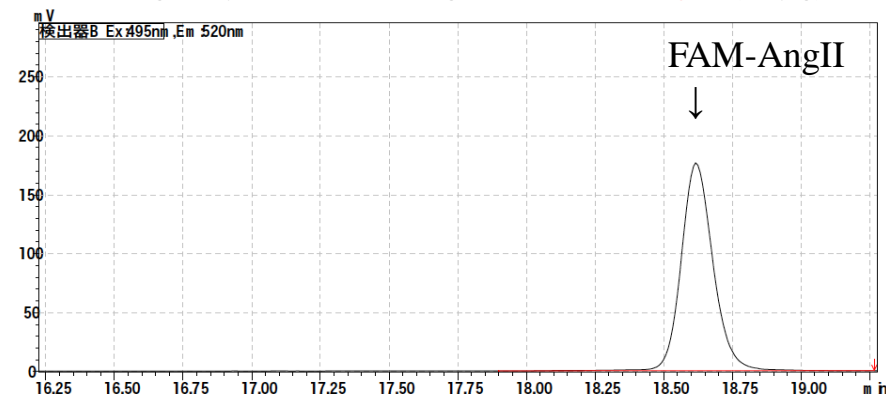
reference:FAM-AngII 1 μ L + ACE2 3ng



FAM-AngII 1 μ L + ACE2 3ng + **healthy IgG** (15 μ g)

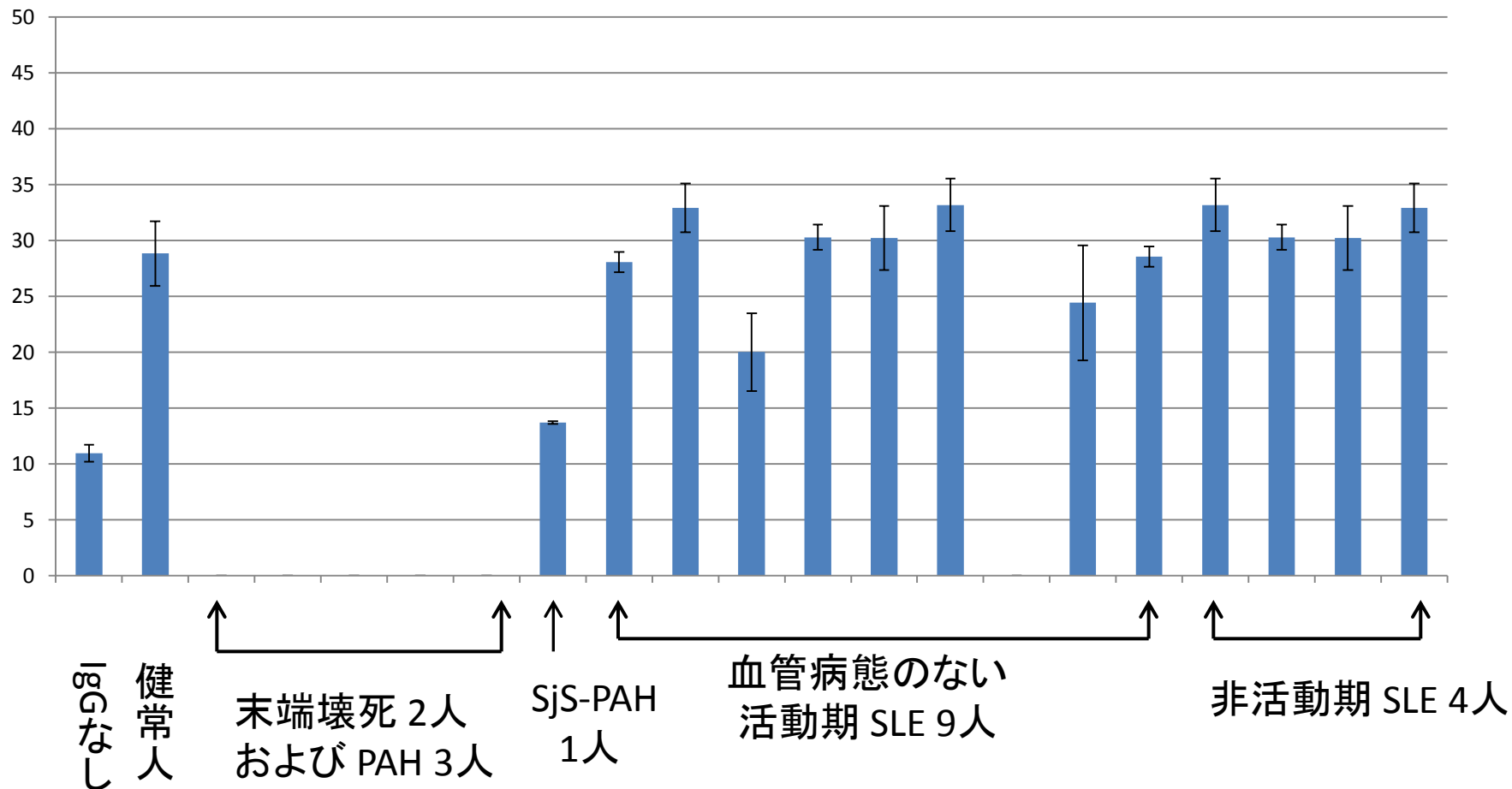


FAM-AngII 1 μ L + ACE2 3ng + **SLE-PAH IgG** (15 μ g)



合成器質を用いた方法と首尾一貫して、血管病態患者の血清IgGが、in vitro ACE2による、Ang IIからAng (1-7)への変換を阻害する結果が確認された。合成基質を用いた定量よりも、再現性よく高感度の結果を得た。本モニター法は、臨床応用が可能である。

結果：HPLCによる反応産物定量から求めた、in vitro ACE2活性の阻害効果
患者血清IgG を添加した in vitro ACE2 反応系における
ANG II からANG(1-7) への変換率(%)



分担研究者が担当した 「組換えACE2蛋白質の精製」プロトコール

培養上(透析、脱塩)



陰イオン交換カラム (CELLUFINE A-500(m))
(JNC CORPORATION Cat No.675980327)



ハイドロキシアパタイトカラム CHT Ceramic Hydroxyapatite,
ye II 40 μ m (BIO RAD 158-4200)



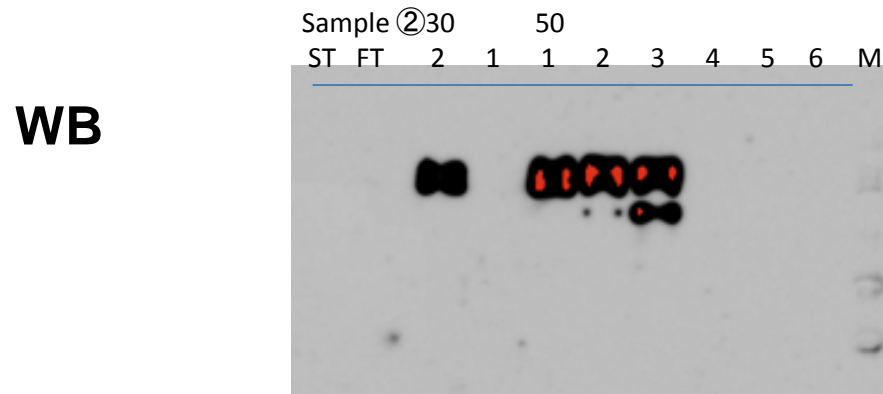
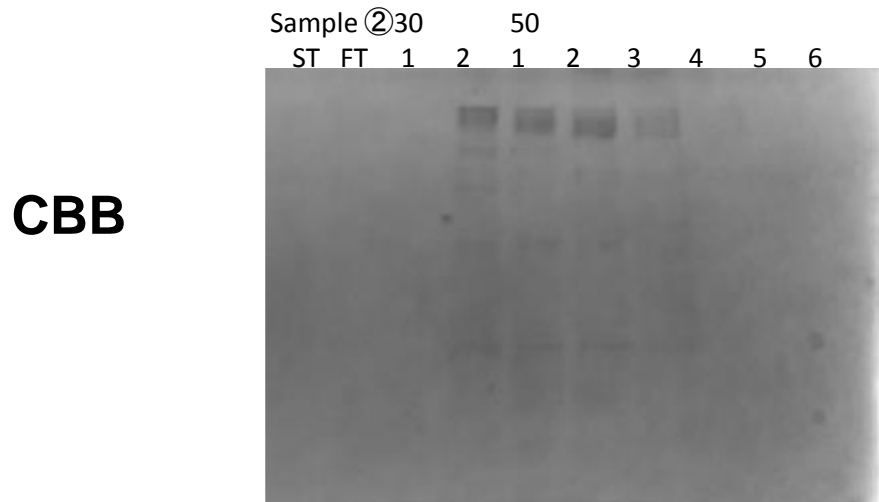
Phenyl Sepharose カラム (GE Healthcare 17-1082-01)



ハイドロキシアパタイトカラム

分担研究者(石坂幸人)

4ステップのカラムクロマトグラフィーによるACE2の精製



Sample ② : Phenyl sepharose 0.05M Ammonium Sulfate Flow Through 3.23mL (11/18)
+ 0.1mM NaPi, 150mM NaCl (pH6.8) 25.8mL (9X dilution)
→ 5mM Ammonium Sulfate, 5mM NaPi, 150mM NaCl, 0.04mM Tris (pH6.8) Sample 29ml

Wash : 5mM NaPi, 150mM NaCl (pH6.8) 5ml

Elute : 30mM NaPi, 150mM NaCl (pH6.8) 0.5mL X 2
50mM NaPi, 150mM NaCl (pH6.8) 0.5mL X 6

分担研究者(石坂幸人)