

## 細胞マイクロアレイ法を用いた自己抗体遺伝子の同定および自己免疫疾患の病態解析

●岸 裕幸<sup>1)</sup> ◆村口 篤<sup>1)</sup> ◆杉山英二<sup>1)</sup> ◆清水幸裕<sup>1)</sup> ◆鈴木 正康<sup>2)</sup>

1) 富山大学医学部 2) 富山大学工学部

### 〈研究の目的と進め方〉

重症筋無力症や甲状腺機能亢進症等に代表される自己免疫疾患はアセチルコリン受容体や甲状腺刺激ホルモン受容体などに対する自己抗体が産生されることにより引き起こされると考えられている。このような自己免疫疾患の発症には環境要因のほかに遺伝的要因が考えられる。遺伝的要因として主要組織適合抗原 (MHC) と自己免疫疾患との関連が詳細に研究されている。その他の遺伝的要因のひとつに抗体遺伝子の多型性が考えられるが、抗体遺伝子の多型性と自己免疫疾患の関連については未だ研究が進んでいない。我々は、自己免疫疾患患者の自己抗体の遺伝子レベルでのハイスループットな解析を行うために、自己抗原特異的Bリンパ球のクローンレベルでの同定をチップ上で行うことができるような細胞マイクロアレイ法を樹立し、同定したリンパ球より自己抗体遺伝子を増幅・クローニングする方法を確立する。さらにこの方法を応用して抗体遺伝子の多型性と自己免疫疾患の関連について解析することを目的とした。

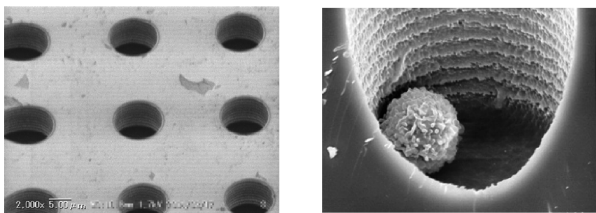


図 マイクロウェルアレイチップ

細胞マイクロアレイ法を行うために我々はリンパ球用マイクロウェルアレイチップを作製した。マイクロウェルアレイチップの作製には富山県工業技術センターの協力を得た。マイクロウェルアレイチップとは下図のようにリンパ球がちょうど1個入る大きさのマイクロウェルがチップ上に約23万ウェル規則正しく配列されているチップである。このチップに生きたBリンパ球を播種し、各ウェルの1個のBリンパ球を入れ、チップ上で抗原あるいは自己抗原で刺激する。Bリンパ球にカルシウム依存性蛍光色素であるFluo-4をあらかじめ導入しておく、抗原に反応したBリンパ球の細胞内カルシウム濃度が一過性に上昇しFluo-4の蛍光が一過性に上昇する。この1個1個のBリンパ球の蛍光の変化を蛍光スキャナーにより読み取ることで、抗原あるいは自己抗原に特異的に反応するBリンパ球を検出する。検出した抗原特異的Bリンパ球をチップより回収しRT-PCR法を用いて抗体遺伝子を回収する。抗体の抗原に対する反応性、自己免疫疾患患者の病態等を抗体遺伝子の配列と比較することにより、抗体遺伝子の多型性と自己免疫疾患の病態、発症との関連について解析を行う。

### 〈研究開始時の研究計画〉

2002年度研究計画

①細胞マイクロアレイを用いて1個あるいは数個のヒトBリンパ球から抗体遺伝子をPCRにより増幅しクローニ

ングする方法を確立する。

②マイクロウェルアレイチップへのリンパ球の分注方法の確立。

③抗原特異的Bリンパ球のマイクロウェルアレイを用いた検出法の確立

2003年度の研究計画

④細胞マイクロアレイ法の実質的運用に向けた最適化。

⑤実際に抗原および細胞マイクロアレイ法を用いて、抗原特異的Bリンパ球を検出する条件を検討し、方法を確立する。

⑥自己抗原特異的Bリンパ球を検出し、自己抗体遺伝子をPCRにより増幅し網羅的クローニングを行う。

2004年度の研究の当初計画

⑦細胞マイクロアレイ法を用い自己抗原特異的Bリンパ球を検出し、自己抗体遺伝子をPCRにより増幅し網羅的クローニングを行う。

⑧同定した自己抗体の遺伝子配列をもとに、自己抗体遺伝子のデータベースを作成する。

⑨細胞マイクロアレイ法を用いた自己免疫疾患解析法を開発する。

### 〈研究期間の成果〉

2002年度の成果

①-1ヒト抗体遺伝子の可変領域 (V) 断片をRT-PCR法により増幅するための、プライマーの設計および反応条件の設定を行い、全てのVサブファミリーを増幅できるプライマーのセットを作製した。また、そのプライマーを用いて、1個のBリンパ球から抗体遺伝子V断片を増幅する条件を決定した。

①-2マイクロウェルアレイチップのマイクロウェルに入った1個のヒトBリンパ球をマイクロウェルから回収し、設定したプライマーおよび反応条件を用いることにより、抗体遺伝子のV断片を増幅することができた。

②マイクロウェルアレイチップの全てのマイクロウェルにほぼ1個ずつリンパ球を分注するための条件設定を行った。その結果、マイクロウェルの形状や分注するときの細胞密度を調整することにより、ほぼ90%以上のマイクロウェルに1個ずつ細胞を分注できる条件を見いだした。

③マイクロウェルアレイチップを用いて、抗原特異的Bリンパ球を検出するために、Ca特異的蛍光色素Fluo-4を用いて標識したBリンパ球をマイクロウェルアレイチップに分注し、抗IgM抗体をチップに添加することによりBリンパ球を活性化し、マイクロウェル中の活性化リンパ球の細胞内Ca濃度を測定できるシステムを検討した。いくつかの方法を検討した結果、マイクロアレイスキャナーを応用して、マイクロウェルアレイチップ中のBリンパ球の活性化を解析することが可能になった。

2003年度の成果

④-1マイクロウェルアレイへの細胞の分注方法を検討し、自然落下による方法や吸引による方法を検討した。アレ

イへ添加する細胞密度を高めることで95%以上のウェルへ1個ずつ細胞が分注されることを確認した。また、吸引法により細胞密度の低いサンプルを用いて80%以上のウェルへ細胞が導入されることを確認した。

④-2マイクロウェルの形状が細胞のウェルへの充填率にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、マイクロウェルの直径はBリンパ球の直径より少し大きいくらいで、深さはリンパ球の直径の約1.5倍くらいが細胞が入りやすく、また、細胞の回収も行いやすいことがわかった。

④-3細胞をマイクロウェルから回収するに際し細胞のアドレスを明らかにする工夫を行った。これはマイクロウェルアレイチップ上に蛍光標識したマーカーを置くことにより解決した。これにより、蛍光スキャナーで活性化リンパ球を検出する際にマーカーの蛍光も検出することにより活性化リンパ球がどのマイクロウェルに入っているかを同定できるようになった。

④-4活性化リンパ球の検出に関しては、これまで細胞内カルシウム濃度の変動を蛍光色素を用いスキャナーで検出し、1個1個の細胞の蛍光強度の画面上での表示を目で比較することにより行ってきた。本年度は、刺激前後の蛍光強度を計算し、それを表示できるソフトウェアを開発し、数値により活性化リンパ球を同定することが可能になった。

⑤実際にヒトの細胞を用いたシステムの応用を検討するために、モデルシステムとし、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBs抗原)を用いた実験を行い、チップ上でヒトBリンパ球をHBs抗原で刺激し、スキャナーで細胞内カルシウム濃度が上昇した細胞を検出し、同定した細胞より抗体遺伝子回収し、発現ベクターに組み込み蛋白を発現させ、抗原特異性を解析した。その結果、HBs抗原特異的抗体が検出され、我々が開発しているシステムが動作することが実証できた。

2004年度の成果

細胞マイクロアレイ法の改良

●抗原に反応するB細胞を細胞内Ca濃度の変化で解析するために刺激後3分以内にシグナルを読み取る必要があった。スキャナーの改良により読み取り速度が従来の2倍になり、より広範囲のシグナルを読み取れるようになった。

●カルシウム依存性蛍光色素であるFluo-4はカルシウム結合により蛍光が増強し、Fura-redはカルシウム結合により蛍光が減少する。この2種類のカルシウム依存性蛍光色素を用い細胞の反応を検出するために、二波長同時読取のスキャナーを開発した。さらに、Fluo-4とFura-redの蛍光比を細胞の刺激前後で計算するソフトウェアを開発した。この新しい測定法を用いることにより、S/N比が上昇し、バックグラウンドが減少した。

●解析ソフトウェアの改良により抗原に反応し、細胞内カルシウム濃度が上昇した細胞を検出する時間が短縮された。現在、チップ1枚の解析を約20分以内に完了し、細胞の採取を行うことが可能になった。

●抗原に反応したB細胞の細胞内カルシウムは1分以内にピークに達し、その後漸減する。従来、刺激前後2点での細胞内カルシウム濃度の比較で細胞の活性化を検出していたが、もう1点細胞内カルシウム濃度を測定することにより、ノイズを10分の1に減らすことができた。

細胞マイクロアレイ法の応用

●B型肝炎ウイルス抗原(HBs抗原)により感作された健康人ボランティアの末梢血Bリンパ球を用い、抗原特

異的Bリンパ球の検出条件の検討を行った。検出したBリンパ球より抗体遺伝子を回収し、抗体タンパクを作製した。作製した抗体がHBs抗原に結合することを確認した。さらにこの抗体のHBウィルスのヒト肝細胞への感染を中和することを示す結果を得た。

●ニワトリ卵リゾチームに反応する抗体遺伝子を持つトランスジェニックマウスのBリンパ球を用い、細胞のシグナルを検出するポイントを3点にした新しいプロトコルを用い、どのくらい低い頻度の抗原特異的B細胞が検出できるかを検討した。細胞マイクロアレイのシステムを用いた場合、0.1%の頻度の抗原特異的B細胞を約50%の確率で検出することが可能であった。一方、フローサイトメトリーを用いた場合、0.1%の頻度のB細胞はバックグラウンドに隠れてしまい検出できなかった。さらに、システムを改良することで、検出の精度を上げていきたいと考えている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

リンパ球を1個1個個別にマイクロウェルに挿入し、規則的にチップ上に並べ、その抗原等に対する反応を単一細胞レベルで解析することは、世界的にまだ行われておらず、日本において注目され始めている。また、リンパ球アレイを用いて抗原特異的リンパ球を検出し、抗原特異的抗体を作製した例はまだ世界に例がなく、我々のシステムによる成果が唯一のものである。一般にモノクローナル抗体作製のために行われているハイブリドーマ法やEBウイルスを用いた方法では、スクリーニングにかけることができるリンパ球はももとのリンパ球の千分の一から1万分の一くらいの頻度であるが、リンパ球アレイシステムはリンパ球を直接的に観察するシステムであるため理論的には調製したリンパ球を100%観察することができる。そのため、頻度の低い抗原特異的Bリンパ球も見逃すことなくとらえることが可能になる。したがって、抗体を作製している企業から注目され、共同研究等も進みつつある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

①マイクロウェルアレイチップへの自動分注装置を用いた分注法も検討しているが、思うように進んでいない。これは、(1)マイクロウェルが極微小であるために、自動分注装置によるマイクロウェルの位置の同定が困難であること、(2)扱う液体の容積が極微量(数ピコリットル)であるために細胞懸濁液がすぐに乾燥してしまうことによる。(3)現在、ヒトが行う分注操作を機械が自動的に行う分注装置を作製している。ほぼヒトと同じような操作が可能になりつつあり、現在条件設定等を行いつつある。しかし、分注率、分注時間ともヒト以上の能力を持つところまではいたっておらずさらに検討する余地がある。

②活性化Bリンパ球の同定をマイクロアレイスキャナーを用いて行っているが、解像度が低いため、シグナルが荒く解析の正確さが低くなっている。

③少量の血液からのサンプルを用いた場合に細胞の利用率が約10%と高くない。これは細胞を能動的にウェルに入れるシステムができていないからである。自己免疫疾患患者から血液の供給を受ける場合、限られた血液量よりえられたリンパ球を無駄なく使う工夫が必要である。

④細胞内カルシウム変化を指標にした場合に、刺激に関わらずばらつきが出てくる。測定するときの一部細胞の移動が起こることが原因の一つである。また、最近、細胞内カルシウム濃度そのものが刺激によらず変化すること

も明らかになってきた。このような蛍光の変化が単一細胞の反応を網羅的に解析する際のノイズになっており、解決する必要がある。

⑤自己免疫疾患患者のサンプルを用いた解析ができなかった。少量の血液からのサンプルを用いた解析ができなかったためである。

#### 〈今後の課題〉

①患者より供与されるリンパ球を無駄なく解析できるよう、細胞チップ解析におけるリンパ球の利用率を80%程度まで向上させるよう、分注方法、チップの仕様等の検討を行う必要がある。

②リンパ球の抗原に対する反応を単一細胞レベルで網羅的に解析する場合、低頻度のノイズであっても解析の障害になってくる。このため、ノイズの低減、シグナルの増強、ノイズの低い解析方法の確立等を行っていく必要がある。

③現在、細胞の回収を顕微鏡下でマイクロマニピュレータを用いてヒトが行っているため、すぐに疲れてしまい細胞の回収が進まない。細胞回収操作を機械化する必要がある。

④現在、1個のBリンパ球からの抗体遺伝子の回収をRT-PCR法で行っているが、抗体遺伝子の回収はH鎖あるいはL鎖単独でそれぞれ50～70%程度であり、H鎖/L鎖の両方が同時に回収される確立は約20～30%程度である。今後回収したBリンパ球から確実にH鎖/L鎖の両方を回収し、確実に抗体にしていく努力が必要である。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

①Yamamura S, Kishi H, Tokimitsu Y, Kondo S, Honda R, Rao SR, Omori M, Tamiya E, Muraguchi A. Single-cell microarray for analyzing cellular response. Anal Chem. 77:8050-6, 2005.

②村口篤、岸裕幸、民谷栄一、鈴木正康 抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ、抗原特異的リンパ球の検出法及び製造方法 特許第3723882号

③村口篤、岸裕幸、民谷栄一、鈴木正康 抗原特異的リンパ球抗原受容体遺伝子のクローニング方法 特許第3738308号