

# 新規に保険収載された検査法 「抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体測定 of 臨床的有用性」

Application of anti-RNA polymerase III antibody measurement to medical practice

くわ な まさ たか  
桑 名 正 隆  
Masataka KUWANA

## はじめに

強皮症 (scleroderma) または全身性硬化症/全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) は皮膚および肺、消化管などの線維化、末梢循環障害を特徴とする膠原病である。わが国の推定患者数は3万人程度で、決して珍しい病気ではない。好発年齢は30～50歳だが、小児を含めてあらゆる年齢層で見られる。患者血清中には抗核抗体が高率に検出され、これまでさまざまな生理機能を有する核蛋白が対応抗原として同定されてきた (表1)。その中でも、抗トポイソメラーゼ I (Scl-70) 抗体、抗セントロメア抗体の測定が保険収載され、診断の補助として測定されてきた。しかし、これら自己抗体のいずれかが陽性となる強皮症患者は60%程度に過ぎなかった。

今回、強皮症の診断、病型分類に有用な自己抗体である抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体の測定キット (MESACUP anti-RNA ポリメラーゼ III テスト) が医学生物学研究所 (MBL) により開発され、体外診断用医薬品として製造販売承認を取得した。本キット

は本年5月1日付けで保険収載され (保険点数170点)、一般診療での測定が可能になった。本稿では、本測定キット開発の経緯、臨床的有用性、測定の実際、結果の評価法について概説する。

## I. 強皮症における自己抗体測定の意義

強皮症関連自己抗体の多くは強皮症患者に特異的に検出されることから、診断の補助として有用である。特に抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗セントロメア抗体、抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体は強皮症における特異度が非常に高く、わが国で実施した膠原病患者597例を対象とした、前向き研究での特異度も93%以上と良好な結果を示した<sup>1)</sup>。

強皮症はきわめて多彩な臓器病変を伴い、患者ごとに臨床症状は大きく異なる。そのため、強皮症と診断されれば皮膚硬化や障害臓器の進行、生命予後を予測することが大切で、それに基づいて治療計画をたてる。強皮症の病型としては、皮膚硬化範囲による分類が広く用いられている。肘、膝を越える皮膚硬化の有無により、皮膚硬化範囲の広いびまん皮

表1 強皮症関連自己抗体の対応抗原の生理機能と染色パターン

対応抗原	生理機能	間接蛍光抗体法による染色パターン
トポイソメラーゼ I (Scl-70)	二本鎖 DNA の弛緩 (DNA 複製と修復、RNA 転写)	斑紋型 (時に核小体型の混在)
セントロメア	細胞分裂時の染色体の分離	散在斑紋型
U1snRNP	pre-mRNA のスプライシング	斑紋型
RNA ポリメラーゼ III	低分子 RNA 転写	斑紋型 (時に核小体型の混在)
U3snRNP	リボソーム RNA のプロセッシング	核小体型
Th/To	活性型 tRNA への変換 ミトコンドリア RNA のプロセッシング	核小体型
PM-Scl	pre-rRNA の形成	核小体型
Ku	DNA-PK の coenzyme	斑紋型

膚硬化型 (diffuse cutaneous SSc ; dcSSc) と皮膚硬化が四肢末梢に限られる限局皮膚硬化型 (limited cutaneous SSc ; lcSSc) に分類される。この2つの病型の臨床症状や予後は大きく異なる(表2)。一方、強皮症関連自己抗体の検出も病型分類に有用で、保険収載済みの抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体、抗セントロメア抗体、抗 U1snRNP 抗体はそれぞれ特徴的な臨床所見と関連する(表3)。したがって、皮膚硬化範囲による病型を自己抗体と組み合わせることで、さらに詳細な病型分類が可能となる。

## II. 抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体の同定と簡便な測定法の開発

RNA ポリメラーゼは RNA の転写を触媒する核内の酵素で、細胞機能の維持に必須である。真核細胞には3種の RNA ポリメラーゼが存在し、RNA ポリメラーゼ I はリボゾーム RNA、II はメッセンジャー RNA、III はトランスファー RNA などの低分子 RNA の転写を触媒する。RNA ポリメラーゼ I に対する自己抗体が強皮症患者血清中に検出されることが知られていた<sup>2)</sup>。一方、著者らは膠原病患者血清中に

RNA ポリメラーゼ I、II、III を一定の組合せで認識する自己抗体が存在することを見出し<sup>3)</sup>、強皮症に見出される自己抗体は共通して RNA ポリメラーゼ III を認識することを明らかにした。

抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体は臨床的にきわめて有用な自己抗体であるが、診療での測定は普及しなかった。その理由は、アイソトープ標識した培養細胞を用いた免疫沈降法が唯一の検出法のため、通常臨床検査室で測定できなかったためである。HEp-2 細胞などのヒト培養細胞を基質とした間接蛍光抗体法における抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体陽性血清の染色パターンは多彩で、核の細かな顆粒状染色(斑紋型)、核小体の染色(核小体型)、さらに両者が混在するパターンを示す<sup>3)</sup>。そのため、染色パターンから抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体の存在を予測することは困難である。

そこで、われわれは抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体を検出する簡便な測定法の開発を進めてきた。そのためには、RNA ポリメラーゼ III を構成するサブユニットの中で自己抗体により高頻度に認識されるサブユニットの同定が必要である。そこで、患者血清中の自己抗体とのアフィニティーを利用して精製した RNA ポリメラーゼ抗原を用いた免疫プロットを

表2 皮膚硬化範囲による強皮症の病型分類

	びまん皮膚硬化型 (dcSSc)	限局皮膚硬化型 (lcSSc)
皮膚硬化の範囲	肘、膝を越える	肘、膝の遠位にとどまる (顔は硬くてもよい)
皮膚硬化の進行	発症早期は急速	緩徐、または進行しない
レイノー現象と皮膚硬化の関連	出現がほぼ同時にレイノー現象を欠如	レイノー現象が数年～十数年に渡り先行
参考となる身体所見	関節屈曲拘縮 腱摩擦音	毛細血管拡張 皮下石灰化
予後を悪化させる障害臓器	間質性肺疾患、心筋障害、腎クリーゼ	肺動脈性肺高血圧症
10年生存率	約75%	約95%

表3 保険収載済みの強皮症関連自己抗体と臨床的関連

自己抗体	日本人での陽性頻度	関連する病型	関連する臓器障害
抗トポイソメラーゼ I 抗体 (抗 Scl-70 抗体)	30%	dcSSc	間質性肺疾患 皮膚潰瘍
抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体	5%	dcSSc	腎クリーゼ
抗セントロメア抗体	30%	lcSSc	臓器病変は軽度で少ない時に肺動脈性肺高血圧症 原発性胆汁性肝硬変・シェーグレン症候群の合併
抗 U1snRNP 抗体	10%	lcSSc	肺動脈性肺高血圧症 他の膠原病の重複症状 (混合性結合組織病)

行い、抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体陽性血清により高頻度に認識されるサブユニットとして RPC155 を同定した<sup>4)</sup>。次に、RPC155 の部分断片をリコンビナント蛋白として大腸菌で発現させて患者血清と反応させたところ、アミノ酸残基 891-1080 番に抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体陽性血清により高率に認識されるエピトープが存在することを見出した<sup>5)</sup>。さらに、このエピトープ部位をリコンビナント蛋白として大腸菌で大量に発現、精製し、それを抗原とした酵素免疫測定法 (ELISA 法) を確立した。本邦の少数例の検討では感度、特異性とも 100% と良好な結果が得られた。さらに、キットの有用性を検証するため、米国の施設と共同して強皮症 522 例、SLE など対照疾患 516 例を対象とした多施設臨床試験を実施した<sup>6)</sup>。その結果、免疫沈降法による結果を基準とした ELISA 法による抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体測定結果の感度は 91%、特異度は 99% と良好な結果が得られた。したがって、RPC155 のリコンビナント断片を抗原とした ELISA 法は免疫沈降法に代わる抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体の測定法であることが確認された。

MBL はこの原理を応用することで抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体測定キット MESACUP anti-RNA ポリメラーゼ III テストを開発、商品化した。強皮症 354 例、強皮症以外の膠原病 245 例を対象として実施された性能評価試験では、強皮症における特異度が 98.8% ときわめて高く、免疫沈降法と比べても結果は高い一致率を示した<sup>1)</sup>。なお、本キットは 2006 年 6 月に米国食品医薬品局 (FDA) の承認を受けてお

り、欧州でも CE 登録品として販売されている。

### Ⅲ. 抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体の診療での活用法

#### 1. 診断

抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体は強皮症に特異的で、他疾患で検出されることはほとんどない。また、抗トポイソメラーゼ I 抗体との併存はきわめてまれである。強皮症 354 例、強皮症以外の膠原病 245 例を対象とした性能評価試験では、抗トポイソメラーゼ I 抗体と抗セントロメア抗体に抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体の測定を加えることにより、特異度を低下させることなく、強皮症における感度を 59.9% から 68.2% に上げることが実証された<sup>1)</sup>。また、抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体はレイノー現象を認めるが皮膚硬化のない例において、強皮症への進展を予測する指標であることが示されており<sup>7)</sup>、強皮症の早期診断にも有用である。

#### 2. 病型分類

抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体陽性の強皮症は病初期に急速に皮膚硬化が進行する dcSSc が高頻度で、他の膠原病の重複症状を持たない。日本人 dcSSc のうち、約 20% で抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体、60% で抗トポイソメラーゼ I 抗体が陽性である。これら 2 つの dcSSc 特異抗体は異なる病型と関連する (表 4)。抗 Scl-70 抗体陽性例は間質性肺疾患、手指潰瘍など

表 4 抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性強皮症の臨床症状の比較

臨床所見	抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体 (29 例)	抗トポイソメラーゼ I 抗体 (96 例)	P
% 女性	76%	82%	NS
dcSSc	86%	77%	NS
スキンスコア最大値 (平均 ± 標準偏差)	21.5 ± 10.7	15.7 ± 10.4	0.02
レイノー現象	100%	95%	NS
手指陥凹性癬痕	45%	62%	NS
指尖潰瘍	21%	41%	0.04
食道蠕動能低下	66%	71%	NS
間質性肺疾患	66%	89%	0.004
肺高血圧症	10%	14%	NS
心伝導障害	14%	12%	NS
心筋障害	4%	3%	NS
腎クリーゼ	10%	4%	0.06

NS = 有意差なし

文献 1) より改変作成

の末梢循環障害を高率に伴う。一方、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体陽性例はスキンスコアが高く、腎クリーゼを併発しやすい。診断時にこれら自己抗体の存在を確認すれば、病状の予測や治療方針の決定に役立つ。

### 3. 腎クリーゼの予測

欧米白人では抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体陽性例の1/3が経過中に腎クリーゼを併発する。日本人での頻度はそれより少なく10%程度である。腎クリーゼは早期に発見し、アンジオテンシン変換酵素阻害薬を開始することで救命できる。そのため、本抗体が検出された例では血圧の自己測定を指導する。われわれの施設で1990年以前に受診した抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体陽性強皮症の累積生存率は診断後5年で45%と非常に低く、死因の大半は腎クリーゼによるものであった<sup>3)</sup>。血圧自己測定の徹底とアンジオテンシン変換酵素阻害薬の早期使用により、最近の成績では5年生存率が90%以上まで改善している。抗トポイソメラーゼⅠ抗体陽性例では発症5年以降に間質性肺疾患などにより予後不良となる例がみられるが、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体陽性例では発症早期を乗り切れば、その後は無治療でも皮膚硬化は改善し、重篤な臓器障害を認めることは少ない。

### 4. 活動性の評価

定量的な結果が得られることがELISA法を用いる利点のひとつである。保存血清による検討では、抗体価の上昇が皮膚硬化の進行や腎クリーゼ発症の予測になる可能性が示されている(図1)<sup>6)</sup>。

### Ⅳ. 抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の検査法

MESACUP anti-RNA ポリメラーゼⅢテストの操作は、MBLがすでに発売している他のMESACUPシリーズと同様である。RNA ポリメラーゼⅢの部分断片をコードするリコンビナント蛋白を固相化したマイクロカップに検体を添加する抗原・抗体反応(一次反応)に引き続き、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体を反応させ(二次反応)、抗原・抗体・酵素標識抗体の複合物を形成させる。さらに、テトラメチルベンチジンと過酸化水素の溶解液を基質溶液として添加し、ペルオキシダーゼにより発色させ、反応停止後に吸光度(A<sub>450</sub>)を測定する。キットには標準血清1(Index値=0)、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体標準血清2(Index値=100)が添付されており、表5の計算式を用いてIndex値を算出し、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体測定値とする。

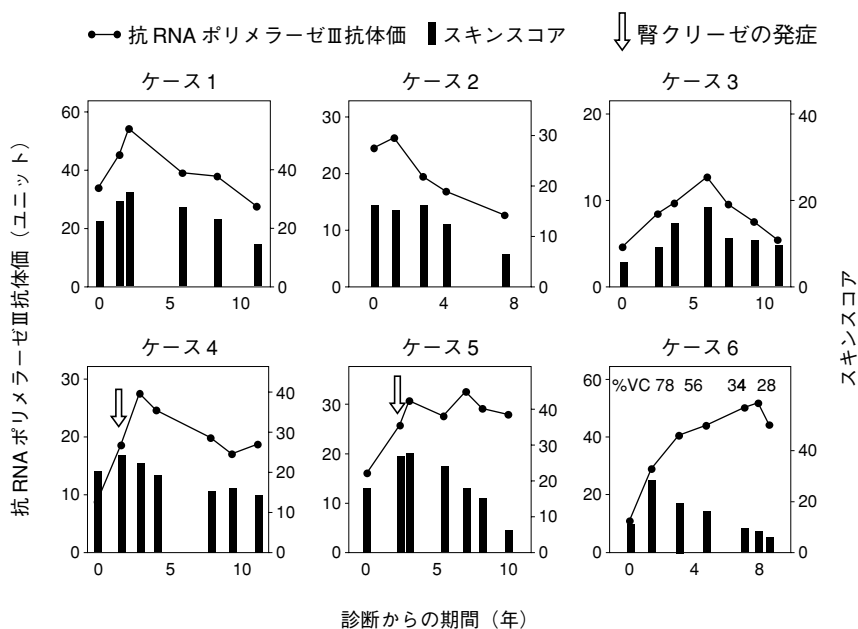


図1 強皮症患者における抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体価と臨床経過  
文献6)より改変作成



表5 MESACUP anti-RNA ポリメラーゼⅢテストの測定結果の判定法

$$\text{Index 値} = \frac{\text{検体 (A}_{450}) - \text{標準血清 1 (A}_{450})}{\text{抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体標準血清 2 (A}_{450}) - \text{標準血清 1 (A}_{450})} \times 100$$

Index 値	判定結果
50 以上	陽性
28 以上 50 未満	グレーゾーン (±)
28 未満	陰性

### V. 抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体測定 結果の解釈

強皮症 354 例、強皮症以外の膠原病 245 例を対象として実施された性能評価試験の結果を図 2 に示す<sup>1)</sup>。カットオフを 28 Index とすると、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の陽性頻度は強皮症で 10.7%、対照とした他の膠原病 1.2%、健常人 0%であった。dcSSc での陽性頻度は 18.3%と lcSSc の 3.3%に比べて高かった。ELISA 法で陽性と判定された 41 例で免疫沈降法を行うと、そのうち 35 例 (85.4%) の陽性が確認され、特異度は満足のものではなかった。偽陽性を呈した 6 例の内訳は強皮症 3 例、強皮症以外の膠原病 3 例で、そのうち 4 血清は 50 Index 未満と低力価であった。一方、カットオフ以下の 15 ~

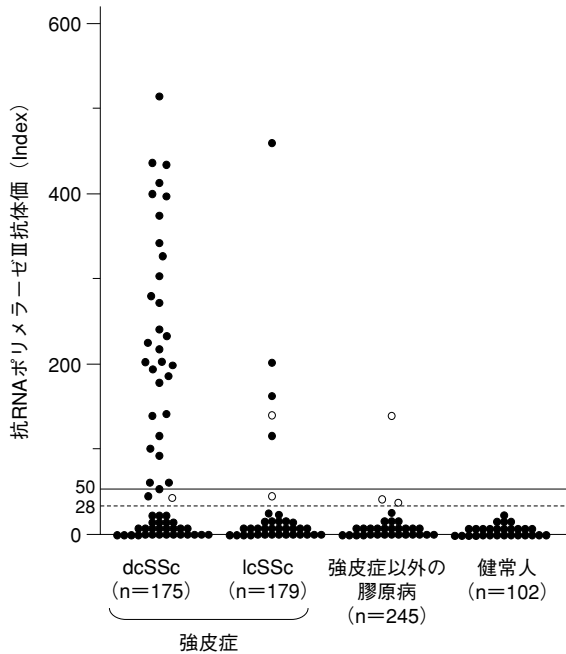


図2 強皮症および他の膠原病、健常人における抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の測定結果  
白丸は免疫沈降法で陰性であった ELISA 法偽陽性血清  
文献1) より改変作成

28 Index の結果を示した 9 血清は全例が免疫沈降法で陰性であったことから、ELISA 法の感度は 100%と良好であった。したがって、カットオフを 28 Index より高く設定することで特異度を上げられる可能性が考えられた。そこで、カットオフを 50 Index に設定すると偽陽性は 6 例から 2 例に減るが、免疫沈降法で陽性の 1 血清が偽陰性となり、特異度は 95%まで向上したが感度がわずかに低下した。そこで、50 Index 以上を陽性とし、28 ~ 50 Index はグレーゾーンとする基準を設定した (表 5)。グレーゾンの結果を示す血清のほとんどは抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体陰性だが、時に陽性例が混入する可能性があることを念頭におく必要がある。

### おわりに

保険診療で抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体測定が可能になったことは膠原病診療において大きな福音である。本キットの普及と強皮症患者の治療成績向上に期待したい。

### 文 献

- 1) Satoh T, Ishikawa O, Ihn H, *et al.*: Clinical usefulness of anti-RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rheumatology* **48** : 1570-1574, 2009.
- 2) Reimer G, Rose KM, Scheer U, *et al.*: Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J Clin Invest* **79** : 65-72, 1987.
- 3) Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, *et al.*: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* **91** : 1399-1404, 1993.
- 4) Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, *et al.*: Autoantibodies to RNA polymerases recognize multiple subunits and demonstrate cross-reactivity with RNA polymerase complexes. *Arthritis Rheum* **42** : 275-284, 1999.
- 5) Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y : Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recog-

- nized by systemic sclerosis sera : application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* **46** : 2742-2747, 2002.
- 6 ) Kuwana M, Okano Y, Pandey JP, *et al.*: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody : analytical accuracy and clinical associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **52** : 2425-2432, 2005.
- 7 ) Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, *et al.*: Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis : a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **58** : 3902-3912, 2008.