

子を用いた GAD65 自己反応性 TCR
リガンドの多様性の解析, 植村靖史,
千住 覚, 田畑博己, 藤井慎嗣, 西
村泰治, 第 31 回日本免疫学会総会・
学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11
~13 日

14. 過剰発現させた TCR 部分アゴニス
ト/HLA-DR 複合体の刺激によるリン
酸化 ZAP-70・LAT に依存しない T 細胞増殖, 入江 厚, CHEN
Yu-Zhen, 塚本博丈, 城塚透子,
増田聖子, 西村泰治, 第 31 回日本
免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001
年 12 月 11~13 日

15. ヒト 成熟樹状細胞に発現する 新規
遺伝子の同定, 増田聖子, 千住 覚,
湯本英二, 藤井眞一郎, 橋本真一,
松島綱治, 第 31 回日本免疫学会総
会・学術集会 (大阪), 2001 年 12
月 11~13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

26. HTLV-I 遺伝子導入ラットに認める壊死性血管炎の 発症機序に関する研究

分担研究者	吉木 敬	北海道大学大学院医学研究科分子病理
研究協力者	石津 明洋	北海道大学大学院医学研究科分子病理
	池田 仁	北海道大学大学院医学研究科分子病理
	富居 一範	北海道大学大学院医学研究科分子病理
	早瀬 広子	北海道大学大学院医学研究科分子病理
	辻 宗啓	北海道大学大学院医学研究科分子病理
	阿部 麻美	北海道大学大学院医学研究科分子病理

研究要旨

HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット (env-pX ラット) は壊死性血管炎を含む様々な膠原病を発症する。これら疾患の発症機序を明らかにするために、env-pX ラットと正常同系ラットとの間で脾細胞、骨髄細胞および胸腺の置換実験を行った。その結果、env-pX ラットに認められる壊死性血管炎は正常の血管構成分子を標的とした自己免疫疾患であり、その自己免疫現象の成立には env-pX 遺伝子を発現する胸腺が重要な役割を果たしていると考えられた。env-pX ラットはこれまでにない血管炎発症機序を示す動物モデルである。本ラットを治療実験に用いることにより、壊死性血管炎の新しい治療法の開発が容易になると期待される。

A. 研究目的

我々が作製した HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット (env-pX ラット) は壊死性血管炎を含む様々な膠原病を発症する¹⁻¹⁾。env-pX 導入遺伝子は全身臓器に構成的に発現されている。血中には抗核抗体や抗 DNA 抗体、リウマトイド因子などの自己抗体の産生が認められることから、本ラットの疾患発症には自己免疫機序が関与していると考えられる。また、末梢Tリンパ球にお

ける CD80/86 などの副シグナル分子の発現が疾患発症前から亢進しており、本ラットは過剰な免疫反応をおこしやすい状態にあると考えられている。

env-pX ラットに認める種々の自己免疫疾患の発症における過免疫反応性リンパ球の病因的関与を明らかにするために、疾患発症前の env-pX ラットと正常同系ラットとの間でリンパ球置換実験を行った⁵⁾。

B. 研究方法

致死量の放射線を照射した正常同系ラットに、疾患発症前の env-pX ラットの脾細胞あるいは骨髄細胞を移入した。また、正常同系ラットに致死量の放射線を照射後、胸腺を摘出し、あらかじめ圧迫操作とデオキシグアノシン処理によりリンパ球を可及的に除去しておいた env-pX ラットの新生仔胸腺をこのラットの腎被膜下に移植した。ついで、本ラットの血液細胞を正常骨髄細胞により再建した。

C. 研究結果

env-pX ラットの脾細胞を移入した正常同系ラットに壊死性血管炎の発症が認められた(表1)。骨髄細胞を移入した場合には、血管炎の発症は認められなかった。脾細胞移入実験では、移入する脾細胞はドナーである env-pX ラットの胸腺で分化成熟した T リンパ球を含むのに対し、骨髄細胞移入では、移植された未熟なリンパ球はレシピエントである正常ラットの胸腺で分化成熟すると考えられる。従って、env-pX ラットの壊死性血管炎の発症には胸腺が重要な役割を果たしているものと推定された。

このことを明らかにするために、胸腺置換と骨髄移植を組合せ、胸腺フレームワークにのみ env-pX 遺伝子を発現するラットを作製した(研究方法を参照)。移植後2ヶ月では腎被膜下に胸腺の皮髄構造が観察され、また同部のリンパ球の大半が CD4CD8 陽性を示すことより、移植された組織は胸腺として機能していると考えられた。一方、移植胸腺由来の env-pX 遺伝子を発現するリンパ球の末梢血への混入は、正常リンパ球 1 万個に 1 個以下の割合でごく微量であ

った。6ヶ月の観察の後、病理組織学的に解析した結果、本ラットに壊死性血管炎の発症が認められた(表2)。対照として胸腺フレームワークのみを正常に置き換えた env-pX ラットでは血管炎の発症は抑制された。

D. 考察

env-pX ラットの脾細胞移入により正常ラットに壊死性血管炎が誘導されたことから、本ラットに発症する血管炎は正常血管構成分子を標的とした自己免疫疾患と考えられる。胸腺置換と骨髄移植を組み合わせた実験から、血管を標的とした自己免疫現象の成立に env-pX 遺伝子を発現する胸腺フレームワークが関与していることが示唆された。すなわち、骨髄由来の未熟なリンパ球が胸腺で分化成熟する過程において、env-pX 遺伝子を発現する胸腺非リンパ球系細胞と相互作用することにより positive または negative selection の異常などが生じ、血管を標的とした自己反応性 T リンパ球が末梢に出現する可能性が考えられる。HTLV-I の env-pX 遺伝子がコードする Tax は宿主細胞の様々な遺伝子の発現を制御することが知られている⁶⁾。Tax が胸腺非リンパ球系細胞に何らかの分子異常や機能異常を誘導している可能性がある。

従来の血管炎発症動物モデルでは II 型あるいは III 型アレルギーが主たる病因となっている⁷⁻⁹⁾。胸腺異常を背景とした細胞性免疫が発症機序として考えられる env-pX ラットはこれまでにない血管炎発症モデルである。本ラットを用いることにより、血管炎誘導 T 細胞クローンの樹立や血管炎の標的分子の同定が可能になると考えられる。

また、壊死性血管炎の新しい治療法の開発にも寄与するものと期待される。

E. 結論

env-pX ラットに認める壊死性血管炎は、正常の血管構成分子が標的となる自己免疫

疾患であり、その自己免疫現象の成立には env-pX 遺伝子を発現する胸腺フレームワークが重要な役割を果たしている。

env-pX ラットは血管炎の発症機序の解明や新しい治療法の開発に有用な動物モデルである。

表1. 細胞移入実験のまとめ

Donor rats	env-pX		env-pX		WKAH	
	↓		↓		↓	
Recipients rats	env-pX		WKAH		WKAH	
Cells transferred	SC	BMC	SC	BMC	SC	BMC
Necrotizing arteritis*	3/4	4/5	3/9	0/9	0/6	0/7

SC: spleen cells, BMC: bone marrow cells

*Rats with necrotizing arteritis / number of rats histologically examined.

表2. 胸腺フレームワーク置換実験のまとめ

BMC donor rats	WKAH	env-pX
	↓	↓
Thymus donor rats	env-pX	WKAH
	↓	↓
Recipient rats	WKAH	env-pX
Necrotizing arteritis*	4/11	0/11

BMC: bone marrow cells

*Rats with necrotizing arteritis / number of rats histologically examined.

F. 参考文献

1. Yamazaki H, Ikeda H, Ishizu A, Nakamaru Y, Sugaya T, Kikuchi K, Yamada S, Wakisaka A, Kasai N, Koike T, Hatanaka M, Yoshiki T: A wide spectrum of collagen vascular and autoimmune diseases in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T lymphocyte virus type I. *Int Immunol* 9: 339-346, 1997.
2. Yamazaki H, Kunisada T, Ishizu A, Ikeda H, Miyoshi I, Sudo T, Hayashi S, Yoshiki T: Promotion of early osteogenesis and B lymphopoiesis in the bone marrow of transgenic rats with the env-pX gene of human T-cell lymphotropic virus type I. *Oncogene* 17: 2955-2960, 1998.
3. Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T: Immunological hyper-responsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory diseases. *Pathobiology* 69: 11-18, 2001.
4. Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T: Clonotypic analysis of T cells accumulating at arthritic lesions in HTLV-I env-pX transgenic rats. *Exp Mol Pathol* 72: 56-61, 2002.
1. 富居一範: HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラットにおける臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討. 北海道医誌 76: 319-332, 2001.
6. 鈴木健之, 吉田光昭: HTLV-I Tax と細胞性因子との相互作用. 蛋白質核酸酵素. 41: 1249-1257, 1997.
7. Yoshiki T, Mellors RC, Strand M, August JT: The viral envelope glycoprotein of murine leukemia virus and the pathogenesis of immune complex glomerulo-nephritis of New Zealand mice. *J Exp Med* 140: 1011-27, 1974.
8. Yoshiki T, Hayasaka T, Fukatsu R, Shirai T, Itoh T, Ikeda H, Katagiri M: The structural proteins of murine leukemia virus and the pathogenesis of necrotizing arteritis and glomerulo-nephritis in SL/Ni mice. *J Immunol* 122: 1812-20, 1979.
9. Miyazawa M, Nose M, Kawashima M, Kyogoku M: Pathogenesis of arteritis in SL/Ni mice: Possible lytic effect of anti-gp70 antibodies on vascular smooth cells. *J Exp Med* 166: 890-908, 1987.

G. 健康危険情報

該当なし.

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T: Clonotypic analysis of T cells accumulating at arthritic lesions in HTLV-I env-pX transgenic

- rats. *Exp Mol Pathol* 72: 56-61, 2002.
2. Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T: Immunological hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: A prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory diseases. *Pathobiology*, 69: 11-18, 2001.
 3. Ishizu A, Ogawa Y, Ishikura H, Yoshiki T: Anti-Thy-1 monoclonal antibody with specific reactivity with vascular endothelial cells in rat glomeruli. *Acta Histochem* 103: 279-286, 2001.
 4. Yano T, Ishikura H, Kato H, Ogawa Y, Kondo S, Kato H, Yoshiki T: Vaccination effect of interleukin-6-producing pancreatic cancer cells in nude mice: a model of tumor prevention and treatment in immunocompromised patients. *Jpn J Cancer Res* 92: 83-87, 2001.
 5. Kato H, Ishikura H, Kawarada Y, Furuya M, Kondo S, Kato H, Yoshiki T: Anti-angiogenic treatment for peritoneal dissemination of pancreas adenocarcinoma: a study using TNP-470. *Jpn J Cancer Res* 92: 67-73, 2001.
 6. Furuya M, Ishikura H, Nemori R, Shibata M, Fujimoto S, Yoshiki T: Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography. *Hum Pathol* 32: 163-168, 2001.
 7. Furuya M, Shimizu M, Nishihara H, Ito T, Sakuragi N, Ishikura H, Yoshiki T: Clear cell variant of malignant melanoma of the uterine cervix: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 80: 409-412, 2001.
- 2.学会発表
1. Yoshiki T: Rat models for HTLV-1 infection. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses, Dublin, Ireland, 2001. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: S-14, 2001.
 2. Ishizu A, Higuchi M, Fugo K, Tsuji M, Abe A, Ikeda H, Yoshiki T: Functional abnormality of CD25+CD4+ T cells in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a model for collagen vascular diseases in humans. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses, Dublin, Ireland, 2001. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: S-46, 2001.
 3. Fugo K, Ishizu A, Higuchi M, Tsuji M, Abe A, Ikeda H, Yoshiki T: Pathogenesis of autoimmune diseases in transgenic rats carrying HTLV-I LTR-env-pX gene. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses, Dublin, Ireland, 2001. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: S-46, 2001.
 4. Fugo K, Ishizu A, Higuchi M, Tsuji M, Abe A, Ikeda H, Yoshiki T:

- Pathogenesis of autoimmune diseases in transgenic rats carrying HTLV-I LTR-env-pX gene. 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden, 2001. Scand J Immunol 54: (Thur)65, 2001.
5. Higuchi M, Ishizu A, Fugo K, Ikeda H, Yoshiki T: Dynamics and function of CD25+CD4+ T cells in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a model for collagen vascular diseases. Scand J Immunol 54: (Thur)67, 2001.
 6. 吉木 敬: 1. 血管炎症候群—分子レベルの解析から臨床まで 1) 壊死性血管炎の発症要因. 第98回日本内科学会講演会シンポジウム. 日本内科学会雑誌 90: 1688-1691, 2001.
 7. 吉木 敬: レトロウイルス感染と免疫疾患. 日本学術会議 免疫・感染症研究連絡委員会 シンポジウム「感染・免疫・アレルギーの接点を求めて—難病の解明と治療へ向けての展望—」東京, 2001.
 8. 吉木 敬: 教育講演「ヒトレトロウイルス感染症のラットモデル」第49回日本ウイルス学会学術集会・総会, 大阪, 2001. 日本ウイルス学会第49回学術集会・総会プログラム p5, 2001.
 9. 富居一範, 池田 仁, 樋口正人, 辻 宗啓, 阿部麻美, 石津明洋, 吉木 敬: HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットにおける臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討. 第26回北海道リウマチ研究会, 札幌, 2001. 第26回北海道リウマチ研究会プログラム・抄録 p9, 2001.
 10. 富居一範, 池田 仁, 樋口正人, 辻 宗啓, 阿部麻美, 石津明洋, 吉木 敬: HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットにおける自己免疫疾患発症に関する検討. 第90回日本病理学会総会, 東京, 2001. 日本病理学会会誌 90: 156, 2001.
 11. 富居一範, 池田 仁, 樋口正人, 辻 宗啓, 阿部麻美, 石津明洋, 吉木 敬: HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットにおける臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討. 第45回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2001. リウマチ 41: 472, 2001.
 12. 早瀬広子, 富居一範, 池田 仁, 辻 宗啓, 阿部麻美, 石津明洋, 吉木 敬: 血管炎発症における胸腺の役割: 種々の自己免疫病を発症するHTLV-1 LTR-env-pXトランスジェニックラットによる解析. 第28回北海道免疫研究会(北海道医師会認定生涯教育講座)札幌, 2001.
 13. 早瀬広子, 池田 仁, 富居一範, 辻 宗啓, 阿部麻美, 石津明洋, 吉木 敬: HTLV-Iトランスジェニックラットにおける壊死性血管炎発症機序の解析. 第34回北海道病理談話会, 札幌, 2001. 第81回北海道医学大会プログラム p20, 2001.
 14. 早瀬広子, 池田 仁, 富居一範, 辻 宗啓, 阿部麻美, 石津明洋, 吉木 敬: HTLV-Iトランスジェニックラットにおける壊死性血管炎発症機序の解析. 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2001. 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 76, 2001.
 15. 石津明洋, 村上達哉, 吉木 敬: ベーチェット病によると考えられた大腿動

脈仮性瘤の病理学的検討. 第6回血管炎研究会, 大阪, 2001.

- I. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願 (平成 13 年 6 月 25 日)
「ヒト免疫不全ウイルスタイプ 1 (HIV-1) ウイルス粒子を産生しうる齧歯類動物細胞」 (出願番号: 2001-191416)
2. 実用新案登録
該当なし.

27. 抗クロマチン自己抗体と血管炎病態の研究

分担研究者 金井芳之 東京大学医科学研究所
ヒト疾患モデル研究センター

コアークレオソーム(CNS)に1分子のヒストンH1が結合した形をクロマトソーム(CS)と呼ぶ。CSは不安定で分離・精製が極めて難しい。今回CSを再構成し、それに対する免疫応答をMPO-ANCA陽性血管炎、抗リン脂質抗体症候群(APS)を含む主に全身性エリテマトーデス(SLE)症例について調べた。ヒト白血病細胞株HL-60核クロマチンから得たCSの純度は>99%であった。CS、NS及びヒストンH1に対する抗体はELISAで測定した。86症例中抗CS抗体陽性は35%であった。そのうち抗H1抗体価の高値を示したものもH1で吸収できないこと、抗NS抗体と一致しないなどから新しい自己抗体と考えられた。ちなみにANCA陽性血管炎18例中4例(22%)が抗CS抗体陽性であった。抗CS抗体はSLEにAPSを併発した2症例がいずれも高く、また血管炎を伴ったSLE1例で高値を示した。その病態学的特徴が今後の課題である。

A. 研究目的

所謂壊死性血管炎(NV)の診断には自己抗体であるMPO-ANCAが有用であると定着している。しかし、例えばMPO-ANCAが陽性であっても臨床病態の多様性つまりサブセットの存在が考えられるであろう。例えばIgG抗体のサブクラスの違いはNVの中でも異なる病態を反映する可能性がある。一方でまた各々の病態を

反映するような新たな自己抗体の存在も考えられる。生体は秒単位で数おおくの血液細胞例えばリンパ球・好中球がapoptoticに破壊され、自己抗原が血中に放出されている。自己抗原の主なものは細胞核クロマチンと考えられる。今回はクロマチンの主成分であるヌクレオソーム(NS)及びNSにヒストンH1が付加されたクロマトソーム(CS)に対する

を含む膠原病患者の免疫応答につい

て調べた。

B. 研究方法

クロマチンの調整にはヒト白血病細胞株 HL-60 を用いた。2 x 10⁸個の細胞から核を分離、micrococcal nuclease(MN)で一定時間消化、不溶画分に 0.25MNaCl を含む Tris 緩衝液(pH 7.4) (A 液) を添加、その結果得られた可溶画分を Superdex 200 をゲル濾過カラムとしてもちいた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけ、大小数個のピークを集め、SDS-PAGE とアガロース電気泳動とでヌクレオソーム(NS)の純度を判定した。所謂モノヌクレオソーム(一般的にはこれを NS と称している)はサンプル投入後 11-12 分時の所に溶出されることが確定した。この画分は限外濾過法

で濃縮後、2-ME とプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加、4度 C で保存した。一方ヒストン H1 は核クロマチンの 0.25NHCl 抽出液を得た後、さらにトリクロロ酢酸沈澱(終濃度 25%)したものを 10mNHCl に透析し可溶化したのち陽イオン交換クロマトグラフィーにて分離して得た。クロマトソーム(CS)は NS とヒストン H1 を重量比で等量を A 液中で混和、前述の Superdex 200HPLC で分離した。最終的には SDS-PAGE で HPLC のピーク中にヒストン H1 が含まれていることで証明した。以上のクロマチン成分に対する自己抗体は Immulon 2HB を固相用プレートとして使用、ELISA を確立した。

C. 研究結果

a. クロマチンの精製

図 1 に Superdex 200HPLC でえられた単一ピークのモノヌクレオソーム(NS)を示した。このピークの SDS-PAGE およびアガロースゲル電気泳動パターンを各々図 2 と図 3 に示した。これらの図から明かのように DNA は 150bp の周辺に集簇し、コアヒストンにはその他の成分を含まず、さらに H1 を欠失していることから極

めて高純度の NS であることが証明された。図 4 には H1 と NS の結合した CS の HPLC パターンとその SDS-PAGE パターンを示した。HPLC ピークに H1 が含まれていること、未結合の H1 が単独にみられることから、HPLC のメインピークは CS をふくむことが証明された。補足であるが、ここでは H1 の精製行程の結果は省略したが、この図の H1 のパターンからも、H1 が高純度であることがわかる。

b. 各種症例の免疫応答

杏林第一内科 41 症例の ELISA で調べた免疫応答の結果を図 5 に示した。上のカラムは抗 CS と抗 NS 抗体との関係、下のカラムは抗 CS 抗体と抗 H1 抗体との関係を示した。CS は各々のコンポーネントで構成されているものの、三者抗体の相関性は強いものではなかった。クロマチンの各コンポーネントが抗 CS 抗体に及ぼす効果・交叉反応性を明かにするために東京医科歯科大（窪田博士より供与）のいずれの抗体も高い 2 症例を用いて血清希釈と各々の抗体価との関係を調べた結果を図 6 に示した。上段のカラムは患者 # 21 の CS および NS に対する応答を、下段のカラムは患者 # 21 と 22 の H1 に対する応答を示している。CS に対する応答が H1 や NS と異なることがわかる。このことから抗 CS 抗体が H1 の影響を受けていないことが示された。

D. 考察

著者の知る限り CS に対する免疫応答に関する記載・報告はない。それは Kornberg による H1 を欠失した NS が余りに知名度が高いこと、と抗 NS 抗体の SLE に於ける重要性が強調され過ぎていることによると思われる。

クロマチンのパッキングに H1 が重要な役割を演じていることを考慮して、CS の作製を試みそれに対する免疫応答を血管炎を含む各種膠原病疾患について調べた。その結果高力価の抗 CS 抗体保有 SLE で抗 CS 抗体が抗 H1 や抗 NS 抗体と独立して存在することが分かった。本抗体は MPO-ANCA 陽性患者 18 例中 4 例陽性を示した。22% と割合は少ないが、血管炎の病態分類には有用になるかもしれない。なお、SLE で APS を発症した例で再現性をもって高値を示した例をみると、抗 CS 抗体は血栓症など血管病態と関連することが示唆された。

E. 結論

抗 β_2 -GPI 抗体陽性あるいは APS 発症 SLE で見いだされた抗 CS 抗体は抗 H1 や抗 NS 抗体とは独立して存在することが分かった。血管炎 18 例で 4 例が抗 CS 抗体であったが、ランダムな症例であったため、系統的に検索することによって、新しい病態分類の可能性も展開されるであろう

[参考文献]

金井芳之：抗 DNA 抗体と抗ヌクレオソーム抗体、組織細胞工学、27：10-14、2001

金井芳之：ヌクレオソーム、クロマトソームと SLE, 臨床免疫、印刷中

F. 健康危険情報
(特になし)

G. 研究発表

1. 論文発表

金井芳之：抗 DNA 抗体と抗ヌクレオソーム抗体、組織細胞工学、27：10—14、2001

金井芳之：ヌクレオソームと自己免疫、第25回ヘパリン研究会記録集、2001

金井芳之：ヌクレオソーム、クロマトソームと SLE, 臨床免疫、印刷中

Y. Kanai, Q. Lu and T. Kubota.: Histone H3 dimer as a preferential target of anti-dsDNA/nucleosome autoantibodies. *Lupus*, 10: S6, 2001

Y. Kanai and T. Kubota: Anti-chromatin autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Rev.* in press

2. 学会発表

金井芳之、窪田哲朗、シンポジウム—新しい自己抗体と臨床的意義
第45回日本リウマチ学会（東京、京王プラザホテル）2001

Y. Kanai and T. Kubota: Chromatosome composed of histone H1 and nucleosome is an independent immune target from nucleosome in systemic lupus erythematosus. 第31回日本免疫学会（大阪、大阪国際会議場）2001

Y. Kanai and T. Kubota: Chromatosome, a complex composed of nucleosome and histone H1 is a new target of so called anti-chromatin autoantibodies in systemic lupus erythematosus. The 7th Interational Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity. Awaji Island, Japan, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(なし)

2. 実用新案登録

(なし)

Mononucleosome is eluted as a single peak at 11-12 min

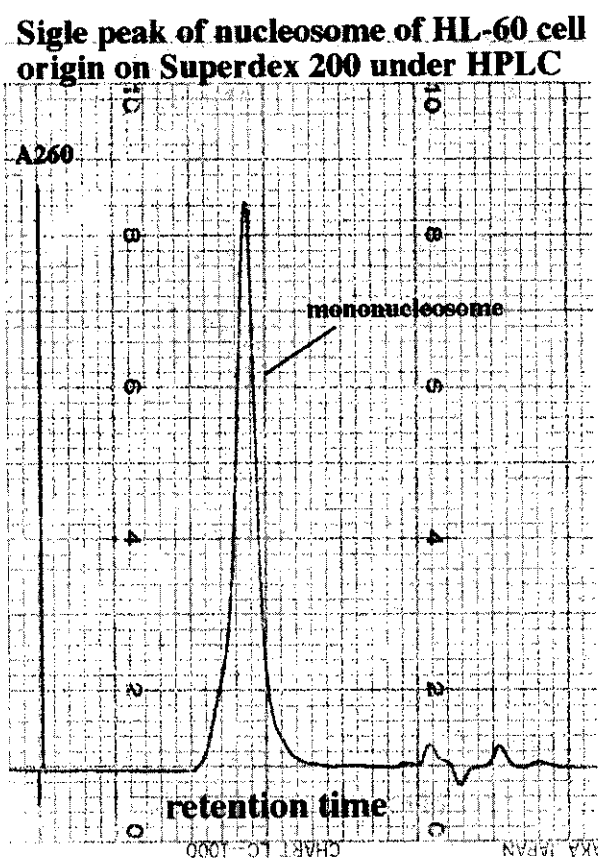


図1 HPLCによるモノヌクレオソームの分離

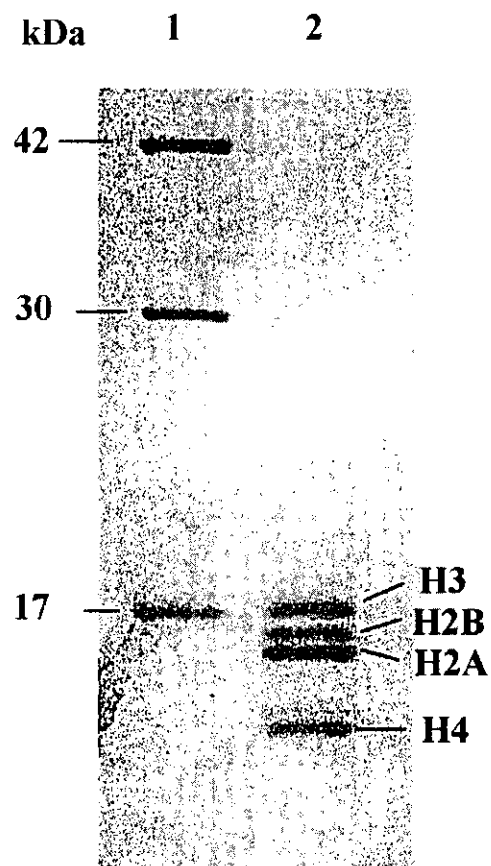


図2 モノヌクレオソームの SDS-PAGE パターン

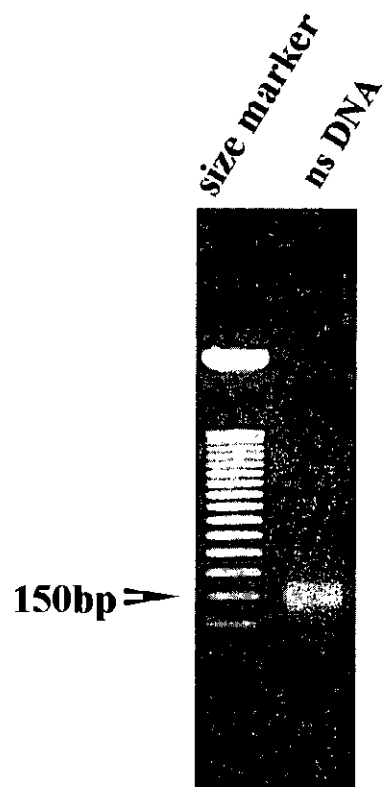


図3 モノヌクレオソームの2%アガロースゲル電気泳動パターン

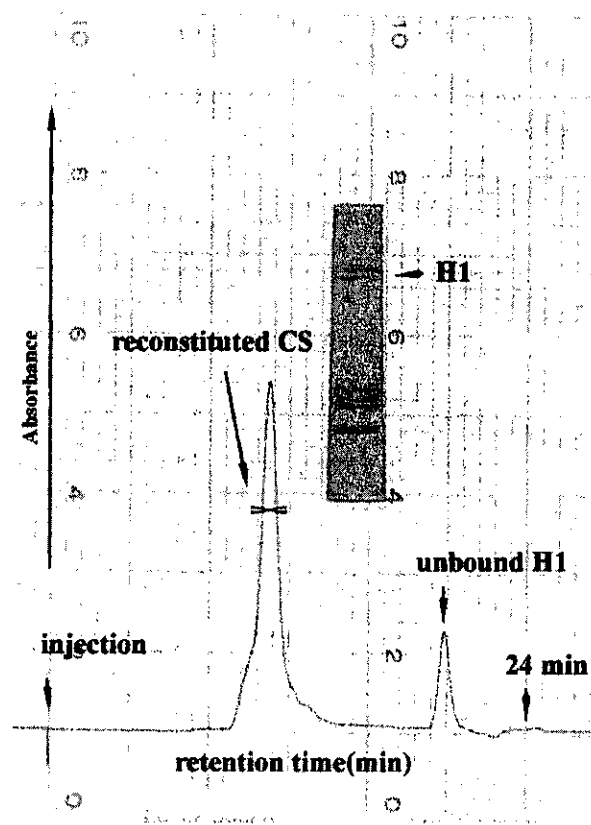
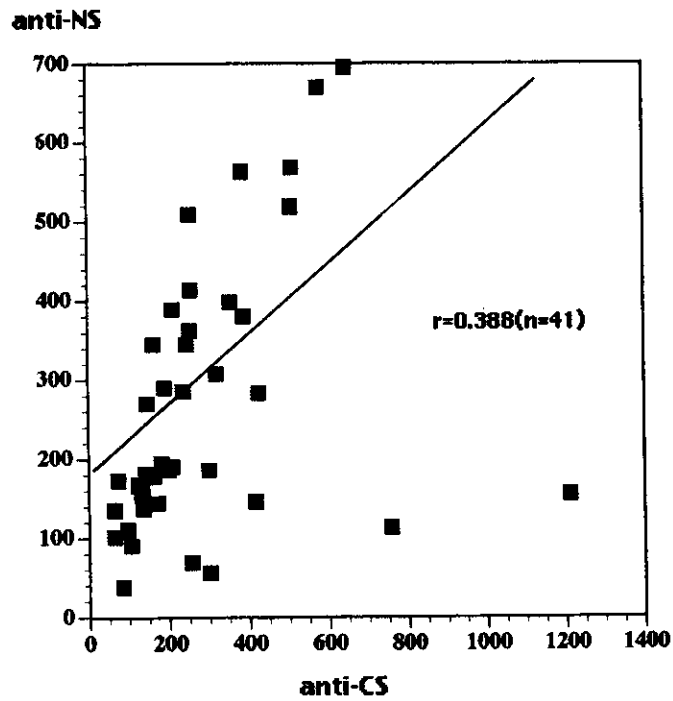


図4 クロマトソームノ HPLC パターンとその SDS-PAGE

Correlation between anti-CS and anti-NS antibodies in patients with ANCA-positive vasculitis/collagen diseases



Correlation between anti-CS and anti-histone H1 in patients with ANCA-positive vasculitis/collagen diseases

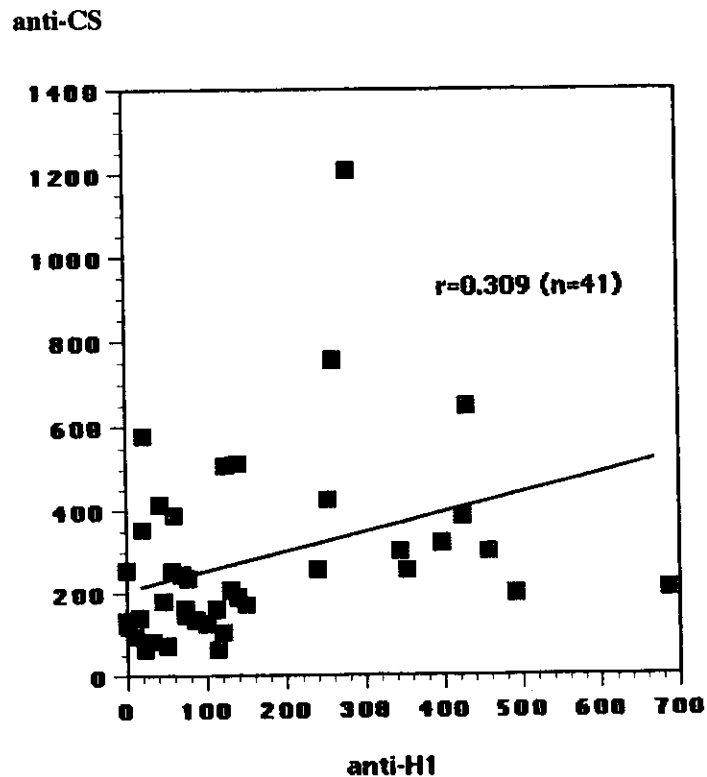
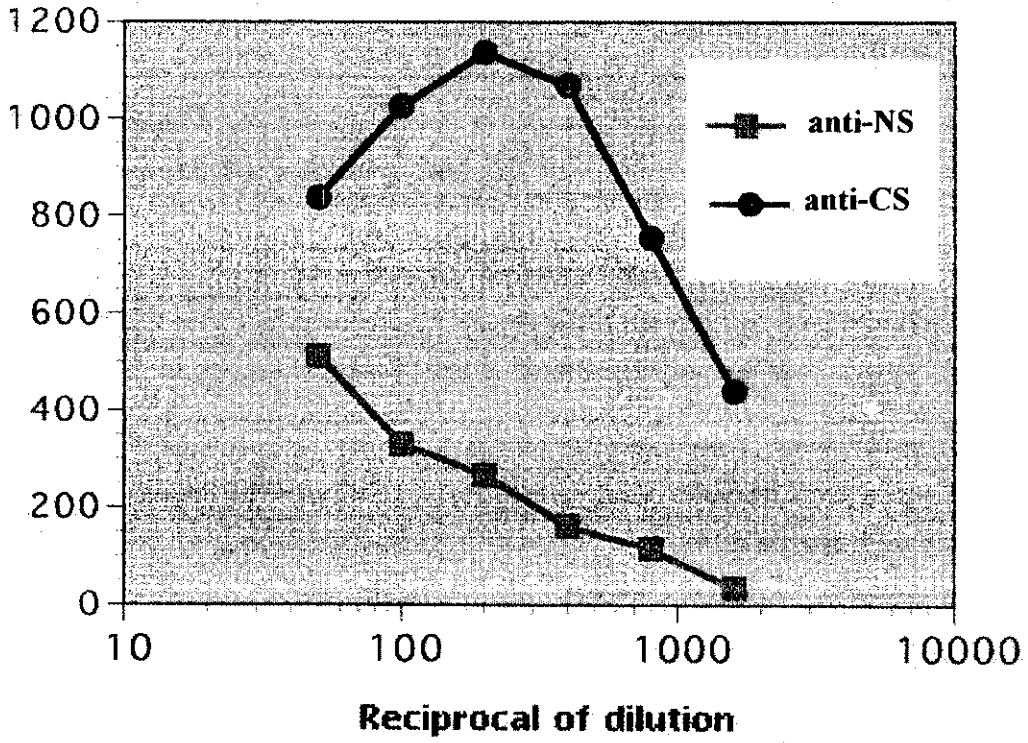


図5 各クロマチン組成に対する免疫応答とその相互の関連性

Antibody unit

A



Antibody unit

B

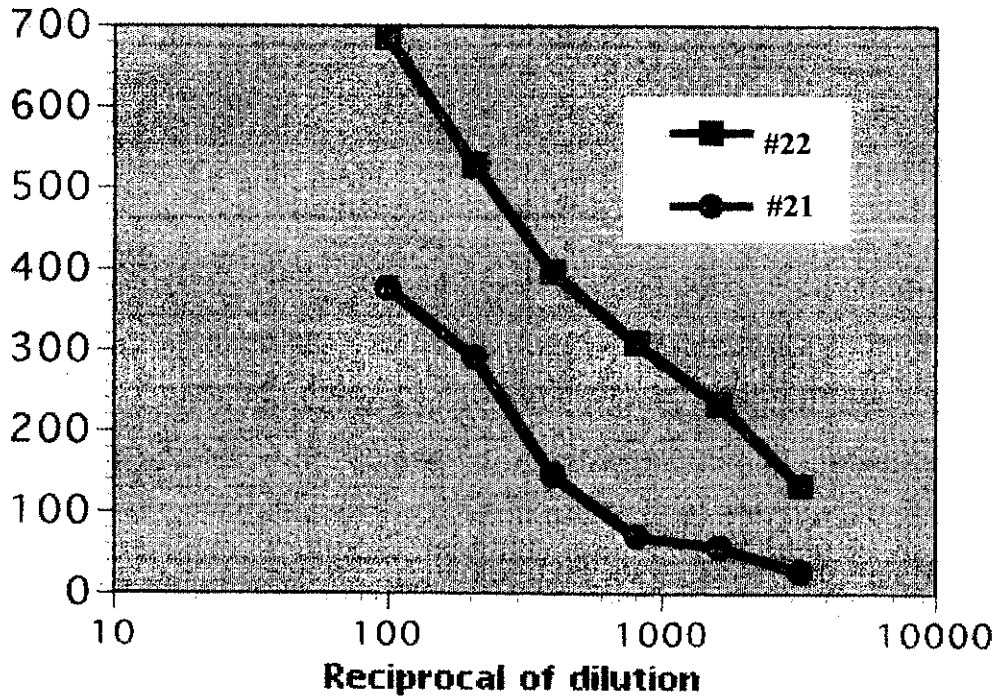


図6 各種クロマチン抗原に対する反応パターン

28. 高安動脈炎における抗内皮細胞抗体(抗 74kDa 抗体)の 対応抗原の同定

分担研究者	吉田俊治	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
研究協力者	田口博章	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
	吉田秀雄	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
	玉熊桂子	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
	片山雅夫	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
	深谷修作	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科

研究要旨

血管炎症候群で抗好中球細胞質抗体に次いで高率に認められる自己抗体である抗内皮細胞抗体(AECA)の中で、高安動脈炎患者血清に高率に高い特異性で検出された抗 74kDa 抗体の対応抗原同定のため 2 次元電気泳動法および Western blot 法により、候補となる spot を 2 つ切り出した。これらのアミノ酸分析を行い、熱ショック蛋白および ATPase に関連する分子と相同性の高い蛋白が同定された。

A. 研究目的

抗内皮細胞抗体(AECA)は、血管炎症候群で抗好中球細胞質抗体に次いで高率に認められる自己抗体である。前年度までの検討¹⁻²⁾で、Western blot 法により、抗 74kDa 抗体が高安動脈炎患者血清に高率に高い特異性で検出された。今年度は、本抗体の対応抗原の同定を目的とした。

元目の電気泳動を行った。一部はこのままクマシーブルー染色を行い、一部はニトロセルロース膜および PVDF 膜に転写して、Western blot を行った。PVDF 膜に転写し、染色により検出された spot を切り出し、定法にしたがい、アミノ酸分析を行った。その homology search には EMBL Fasta search を用いた。

B. 研究方法

対応抗原の分析のため行った 2 次元電気泳動法は、アマシャム・ファルマシア社のシステムを用いた。具体的には、まず pH3-10 の 1 次元目等電点ゲルに JM van der Zee の方法³⁾で精製した肺動脈内皮細胞由来の細胞膜分画を添加し、マニュアル通りの条件で電気泳動した。そのゲルを SDS-PAGE 用ゲルである Excel Gel 上において、2 次

C. 研究結果

2 次元電気泳動を行ったゲルをクマシーブルー染色すると、いくつかのスポットが見られた。またニトロセルロース膜および PVDF 膜に転写後、抗 74kDa 抗体陽性の高安動脈炎患者血清を用いた Western blot 法により、70kDa 付近に pI5 前後のスポットが見られた。このうち 3 人の抗 74kDa 抗体陽性の高安動脈炎患者血清を用いて共

通にみられた 2 つの spot を切り出し、アミノ酸分析を行った。いずれも N 末から 22 個のアミノ酸残基まで sequence できた(表 1)。この homology search を行ったところ、ひとつは 60kD 熱ショック蛋白、もうひとつは ATP synthase β chain と 100% 相同であった。

表1 アミノ酸分析結果

SP1 : AAQTSPSPKAGAATGR(I)VAVIG ATP synthase β chainと100%相同
SP2 : AKDVKFGADARALMLQGVDLLA 60kDa heat shock proteinと100%相同

D. 考察

前年度の血管内皮細胞膜を抗原とした Western blot 法による検討で、高安動脈炎に特異性の高い抗 74kDa 抗体の対応抗原の候補が、2次元電気泳動法と Western blot 法を用いて 2 つの spot として認められ、そのアミノ酸分析ができた。そして 100% 相同の蛋白が見いだされた。今後、これらの蛋白を含めて、このアミノ酸配列をもつペプチドを調べ、高安動脈炎に特異性の高い抗内皮細胞抗体の対応抗原を確認していきたい。これにより、高安動脈炎の診断や病態の追求にも役立つものと思われる。

E. 結論

高安動脈炎患者血清に高率に高い特異性で検出された抗内皮細胞抗体(抗 74kDa 抗体)の対応抗原同定のためアミノ酸分析を行い、熱ショック蛋白および ATPase に関連する分子と相同性の高い蛋白が同定された。

F. 文献

1. 吉田俊治、片山雅夫、深谷修作、大島久

二、鳥飼勝隆：血管炎症候群における抗内皮細胞抗体（抗 74kDa 蛋白抗体）に関する検討。厚生省厚生科学特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究班平成 11 年度研究報告書、2000；107-109.

2. 吉田俊治、田口博章、鳥飼勝隆：高安動脈炎における抗内皮細胞抗体（抗 74kDa 抗体）の対応抗原の分析。厚生科学研究研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性血管炎に関する調査研究平成 12 年度総括研究報告書、2001；134-136.

3. Van der Zee JM, Siegert CEH, de Vreede TA, Daha MR, Breedveld FC: Characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 1991; 84:238-244.

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・橋本明、佐藤元、西林保朗。椎野泰明、忽那龍雄、吉田俊治、他：RA 患者の QOL AIMS2 改訂日本語版調査書を用いた多施設共同調査成績 肢体不自由に関する諸因子の解析。リウマチ 2001;9-24.
- ・吉田俊治、中木敏夫、落合亮一：症例検討 経口薬と麻酔(術前コンサルテーションの問題点) プレドニン(副腎皮質ホルモン)。LiSA 2001;8:452-455.
- ・吉田俊治：オーバーラップ症候群、MCTD。治療(増刊号) 2001;83:1194-1198.
- ・永井朋人、深谷修作、吉田秀雄、片山雅夫、大島久二、吉田俊治、他：腸管病変を主体としたアレルギー性肉芽腫性血管炎の 1 例。中部リウマチ 2001;32:144.