

黄明国論文内容の要旨

主 論 文

Detection of apoptosis-specific autoantibodies directed against granzyme B-induced cleavage fragments of the SS-B (La) autoantigen in sera from patients with primary Sjögren's syndrome

原発性シェーグレン症候群患者血清中に存在するグランザイム B によって断片化された SS-B(La)蛋白に対する自己抗体の検討

黄明国 井田弘明 蒲池誠 岩永希 和泉泰衛 田中史子 荒武弘一朗 有馬和彦
玉井慎美 飛田あゆみ 中村英樹 折口智樹 川上純 小川法良 菅井進 PJ Utz
江口勝美

Clinical and Experimental Immunology 142(1):148-154, 2005

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：江口勝美教授)

緒 言

シェーグレン症候群(Sjögren's syndrome ; SS)患者唾液腺組織には、細胞傷害性細胞の浸潤と唾液腺細胞のアポトーシスがみられる。さらに、アポトーシスと自己抗体産生との関連が最近クローズアップされている。今回、私たちは、細胞傷害性細胞がもつグランザイム B(granzyme B ; GB)の自己抗体産生への役割を検討するため、唾液腺細胞株を使用して新しい自己抗体を検索した。

対象と方法

1) 唾液腺細胞株 HSG 細胞のライセートに GB、あるいはカスパーゼ 3(caspase 3; C3)を添加後、ゲル電気泳動し、原発性 SS 患者血清を使用してウェスタンブロット法で自己抗体をスクリーニングした。使用した患者血清は、原発性 SS 患者 57 例、悪性リンパ腫(malignant lymphoma; ML)合併原発性 SS 患者 17 例、全身性エリテマトーデス患者 28 例、健常者 20 例。患者血清を 100 倍希釈して使用した。

2) レコンビナント SS-A(Ro)蛋白、レコンビナント SS-B(La)蛋白を GB、あるいは C3 で処理後、1)と同様にウェスタンブロット法で自己抗体を確認した。

3) 抗 SS-B(La)モノクローナル抗体を使用して 1)と同様にウェスタンブロットを行った。

4) GB を豊富にもつ YT 細胞と HSG 細胞とを混合培養し、YT 細胞を除去した後、HSG 細胞のライセートを作成、ウェスタンブロット法で自己抗体を検索した。

5) 患者血清中の抗 SS-A(Ro)抗体、抗 SS-B(La)抗体の抗体価を ELISA 法で測定した。

6) 新しく同定された自己抗体をもつ患者の血清をレコンビナント SS-B(La)蛋白で吸収後、GB 処理、あるいは無処理 HSG 細胞のライセートを作成、ウェスタンブロッ

ト法を行い、新しく同定された蛋白に対する抗体が残存するか、検討した(吸収実験)。

結 果

1) 原発性 SS 患者 57 例中 8 例(14.0%)、ML 合併原発性 SS 患者 17 例中 5 例(29.4%)、全身性エリテマトーデス患者 28 例中に 2 例(7.1%)に、GB を添加したライセートにおいて、27kD の蛋白に対する抗体が同定された。

2) この蛋白は、C3 を添加したライセートでは同定されなかった。レコンビナント SS-B(La)蛋白を GB 処理すると 27kD の蛋白が検出された。

3) 抗 SS-B(La)モノクローナル抗体によるウェスタンブロット法で、GB 処理 HSG ライセート、GB 処理レコンビナント SS-B(La)蛋白ともに 27kD の蛋白に対する抗体が同定された。

4) YT 細胞と HSG 細胞との混合培養で得られたライセートにおいても 27kD の断片化 SS-B(La)蛋白が存在していた。

5) ELISA 法での原発性 SS 患者血清中の抗 SS-A(Ro)抗体、抗 SS-B(La)抗体の陽性者は、それぞれ 57 例中 37 例(64.9%)、57 例中 13 例(22.8%)、また、ML 合併原発性 SS 患者では、それぞれ 17 例中 10 例(58.8%)、17 例中 5 例(29.4%)であった。

6) レコンビナント SS-B(La)を用いた吸収実験では、原発性 SS 患者 8 例中 2 例、ML 合併原発性 SS 患者 5 例中 2 例の患者の血清中に、新しいエピトープに対する抗体(27kD の蛋白に対する抗体)の存在が証明された。

考 察

私たちは、今回の研究で、原発性 SS 患者血清中に GB によって断片化された SS-B(La)蛋白に対する抗体が存在していることを明らかにした。また、レコンビナント SS-B(La)蛋白を用いた吸収実験では、一部の患者の血清に新しいエピトープに対する抗体(27kD の蛋白に対する抗体)が存在することを確認した。この結果から、SS 患者唾液腺組織では、何らかの原因で細胞傷害性細胞(NK 細胞、CTL 細胞)の浸潤が起こり、その結果、GB による唾液腺細胞のアポトーシスと唾液腺細胞内での SS-B(La)蛋白の断片化、その断片化 SS-B(La)蛋白の新しいエピトープに対する自己抗体産生が生じていることが示唆された。

GB は、主に NK 細胞、CTL 細胞などに含まれているセリン蛋白分解酵素であり、細胞内の多くの自己抗原が GB によって特異的に切断されることがわかっている。今回の研究結果は、原発性 SS における GB の自己抗体産生への役割を裏付けるデータと考えられる。多くのアポトーシス現象において、最後のエフェクター分子であり、多くの細胞に恒常的に発現がみられる C3 は、多くの基質をもつが、この C3 によって断片化された基質への反応は、胸腺で教育され免疫学的寛容になっていることが多いと想像される。それに対して、GB は、細胞傷害性細胞といった限られた細胞にのみ発現がみられ、たとえ同じ基質をもっていたとしても、C3 と異なる部分で切断されることが多いため、GB によって断片化された基質は、免疫学的寛容にならず、これらの断片化された基質が、免疫担当細胞へ提示された場合、容易に自己抗体が産生されると想像される。

抗 SS-B(La)抗体は SS 患者特異的な抗体であるが、その特異性についてはまだ不明な点が多い。今回の研究では、唾液腺細胞株と他の細胞株との比較では、断片化された SS-B(La)蛋白の特異性の差異を認めることはできなかった。なぜ、SS 患者に特異的にこの抗体が産生されるのか、病因との関連も含め、今後の検討課題である。