

穂山雄一郎 論文内容の要旨

主 論 文

Autoantibody against activating transcription factor-2 in patients with systemic sclerosis
(全身性強皮症患者における抗activating transcription factor-2自己抗体の検討)

穂山雄一郎、小川文秀、岩田洋平、小村一浩、原肇秀、室井栄治、Bae Sang Jae、
竹中基、清水和宏、長谷川稔、藤本学、佐藤伸一

原稿 18 枚、Table 2 個、Figure 4 個

2008. 10. 8 に *Clinical and Experimental Rheumatology* より accept の E メールを受理しています (別紙採用通知を添付)。現在は publish 待ちの状態です。

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 博士課程医療科学 専攻
(主任指導教員：佐藤伸一教授)

緒 言

全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) は皮膚や内臓病変、特に肺や腎臓などにおいて線維化を来たす膠原病である。その病態において自己免疫が関与しているとされ、なかでも B 細胞の異常な活性化に伴うと考えられる様々な自己抗体が見いだされているが、発症機序については未だ不明である。最近の研究により B 細胞の異常増殖を来たすパーキットリンパ腫において、転写因子である activating transcription factor (ATF)-2 に対する自己抗体が産生されていることが報告され、一方、SSc においても dbpB などの転写因子に対する自己抗体の産生が見いだされている。そこで今回の研究では、SSc において抗 ATF-2 に対する自己抗体が産生されているのか。また産生されているのであれば、臨床的な相関があるのか、さらに自己抗体自体に ATF-2 の活性を抑制しうる機能的活性はあるのかについて検討を行った。

対象と方法

対象患者は SSc 69 例 (女性 60 例、男性 9 例) であり、年齢は 45 ± 16 歳であった。SSc の病型としては、limited cutaneous SSc が 29 例 (罹病期間 ; 9 ± 9 年)、diffuse cutaneous SSc が 40 例 (罹病期間 ; 3 ± 3 年) であった。26 例の健常人血清をコントロールとして用いた。

抗 ATF-2 抗体は、ELISA 法と免疫ブロット法で検出した。ELISA 法については、まずプレートに human recombinant ATF-2 を $1 \mu\text{g/ml}$ で 4°C 、24 時間コートし、ブロッキングを行った。各ウェルに 1:100 に希釈した血清を加えて室温で 90 分反応させた後、alkaline phosphatase (ALP) 標識した 2 次抗体を加え、p-nitrophenyl phosphate を基質として発色させ 405nm で吸光度を測定した。

免疫ブロット法については、human recombinant ATF-2 を電気泳動し、Hybond-P PVDF 膜に転写した後、ELISA 法にて IgG 型抗 ATF-2 抗体陽性であった SSc 患者、陰性であった SSc 患者および健常人の血清と一晚反応させた。ALP 標識 2 次抗体を加え、

5-bromo-4-choloro-3-indrolyl phosphate と nitro blue tetrazolium を用いて発色させた。

抗 ATF-2 抗体が実際に ATF-2 活性を抑制しうるかどうかについて明らかにするために、ATF-2 活性の抑制実験を行った。まず IgG 型抗 ATF-2 抗体陽性の SSc 患者、陰性の SSc 患者、健常人の血清より IgG を精製した。ATF-2 の活性は、ATF-2 と結合する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドに対する結合能として測定した。活性型 human recombinant ATF-2 と精製 IgG を 20°C で 30 分反応させた後、前述のオリゴヌクレオチドがコートされたウェルに加え室温で 60 分反応させた。活性型 human recombinant ATF-2 を認識する一次抗体および peroxidase で標識した二次抗体と順次反応させ、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine と H₂O₂ にて発色後、450 nm で吸光度を測定した。

結 果

ELISA 法にて、SSc 患者では IgG 型抗 ATF-2 抗体価は健常人と比較し有意に上昇していることが明らかとなった。対照的に IgM 型抗 ATF-2 抗体価は健常人と有意差を認めなかった。健常人の平均値+2SD の吸光度 (IgG 型抗 ATF-2 抗体=0.244、IgM 型抗 ATF-2 抗体=0.262) をカットオフ値とすると、SSc 全体では 61%(42/69)、健常人では 4%(1/26) が IgG 型抗 ATF-2 抗体陽性であった。このように IgG 型抗 ATF-2 抗体の力価および陽性率は SSc で有意に上昇していることが明らかとなった。

SSc において IgG 型抗 ATF-2 抗体との臨床的相関について解析したところ、IgG 型抗 ATF-2 抗体陽性であった SSc 患者では、陰性であった SSc 患者と比較して罹病期間が長く、血沈の亢進、%VC ならびに %DLco の低下を認めた。

さらに、免疫ブロット法においても、ELISA 法で IgG 型抗 ATF-2 抗体が陽性であった SSc 患者血清は human recombinant ATF-2 と反応しバンドを認めたが、対照的に IgG 型抗 ATF-2 抗体陰性 SSc 患者、健常人血清ではバンドは検出されなかった。従って、SSc 患者血清中の IgG 型抗 ATF-2 抗体の存在が免疫ブロット法によっても確認された。

ATF-2 活性の抑制実験では、IgG 型抗 ATF-2 抗体陽性 SSc 患者より精製した IgG は有意に ATF-2 の活性を抑制したのに対し、IgG 型抗 ATF-2 抗体陰性 SSc 患者より精製した IgG は ATF-2 の活性を抑制しなかった。従って、IgG 型抗 ATF-2 抗体は ATF-2 の活性を抑制しうることが示唆された。

考 察

今回の研究で、IgG 型抗 ATF-2 抗体の力価や陽性率が SSc 患者血清において有意に上昇しており、さらに、この自己抗体が血沈の亢進や肺病変と相関することが示された。このことは、抗 ATF-2 抗体が SSc の新しい自己抗体であることを示している。また、IgG 型抗 ATF-2 抗体陽性 SSc 患者より精製された IgG が ATF-2 の活性を抑制することが確認された。

ATF-2 は IFN- γ の産生において重要な転写因子として働くことが報告されている。IFN- γ は線維化を抑制するサイトカインとして知られており、今回 SSc 患者で認められた IgG 型抗 ATF-2 抗体は ATF-2 活性を阻害することによって IFN- γ の産生を抑制し、線維化を促進している可能性があると考えられた。しかしながら、ATF-2 は核内および細胞質内に存在しており、一般に自己抗体が細胞膜を通過して細胞内に入り、対応する自己抗原と反応するという可能性は少ないことから、IgG 型抗 ATF-2 抗体が細胞内で ATF-2 の活性を実際に抑制することによって SSc の病態形成に関与しているかどうかは不明である。