

学 位 論 文 題 名

小児シェーグレン症候群における
抗 α -フォドリン自己抗体が認識するエピトープ解析

学位論文内容の要旨

緒言

シェーグレン症候群 (Sjögren syndrome; SS) は涙腺・唾液腺を主とした外分泌腺の障害を特徴とする臓器特異的自己免疫疾患で全身症状を伴う場合がある。臨床病態の特徴から唾液腺・涙腺などに限局して発症する一次性 SS (primary SS; p-SS) と SLE や関節リウマチ等の自己免疫疾患に合併する二次性 SS (secondary SS; s-SS) とに分類されている。SS の診断基準は今なお国際的に統一されておらず、抗 SS-A 抗体や抗 SS-B 抗体なども SS に特異的ではない。さらに、小児の SS 患者では外分泌腺障害による乾燥症状を有する症例は極めて少ないことから、特に小児 SS の診断において疾患特異性の高い診断マーカーが求められている。

120-kDa α -フォドリンは SS モデルマウスから同定された SS 特異的自己抗原であるが、SS 患者血清中にも抗 120-kDa α -フォドリン自己抗体 (以下、抗 α -フォドリン抗体) が高率に存在することが報告された。その後もウェスタンブロッティング法を用いた報告では SS 患者に高い陽性率が確認され、SS 特異的な診断マーカーとして期待された。しかし、その後 ELISA 法で検討された陽性率は、ウェスタンブロッティング法による結果より明らかに低値であった。この測定法による相違から、抗 α -フォドリン抗体は直線状エピトープを認識している可能性がある。そこで、本研究では抗 α -フォドリン抗体が認識するエピトープの解析を行った。さらに、SS 診断前から保存してあった患者血清を用いて、エピトープの経時的変化についても検討した。

対象と方法

1. 対象：唾液線造影・口唇生検を施行して SS と診断した 16 歳未満の p-SS 患者 10 例、s-SS 患者 10 例の血清を用いて検討した。コントロールとして、SS を合併しない SLE 患者 6 例 (7-14 歳) と健常者 10 例 (10-40 歳) の血清を用いた。
2. α -フォドリン/GST 融合蛋白の作製：120-kDa α -フォドリン N 末端部 (JS-1; 586 アミノ酸) をコードする DNA を含むプラスミド (pGEX-JS-1) を鋳型として、 α -フォドリンの重複断片 (Fr-1~11, Sub-1~5) に対応する PCR 産物を作製した。それらを TA クローニングベクター pCR2.1 に組み込んだ後に制限酵素 EcoRI で切り出し、さらに glutathione-S-transferase (GST)-融合蛋白発現ベクター (pGEX4T-2, 4T-3) に組み込んだ。これを大腸菌 (DH5 α) 内で発現させ、グルタチオンビーズを用いて α -フォドリン/GST 融合蛋白を精製した。
3. ウェスタンブロッティングおよびドットブロッティング： α -フォドリン/GST 融合蛋白 (Fr-1~11, Sub-1~5) を、SDS-PAGE にて展開し Hybond ECL メンブレンに転写した。5% スキムミルクにてブロッキング後、一次抗体 (ヒト血清) に引き続き、二次抗体 (ペルオキシダーゼ (HRP))

標識抗ヒト IgG 抗体) と反応させた。TBST にて洗浄後、ECL 検出試薬を用いて目的蛋白を検出した。ドットブロッキングでは、 α -フォドリン/GST 融合蛋白を直接メンブレンにプロットし、以下同様の操作を行った。

結果

1. 小児 SS における抗 α -フォドリン抗体の陽性率: 120-kDa α -フォドリン N 末端部 (JS-1) を抗原としたウェスタンブロッキングの結果、p-SS 患者 10 例全てが抗 α -フォドリン抗体陽性であった。s-SS 患者では 10 例中 9 例が陽性であった。一方、SLE 患者 6 例及び健常者 10 例での陽性者は、それぞれ 1 例のみであった。
2. p-SS における抗 α -フォドリン抗体が認識するエピトープ解析: 重複断片 (Fr-1~11) を抗原としたドットブロッキングでは、p-SS 患者血清の全てが Fr-1 と Fr-2 に反応した。患者 p-SS-7, -9, -10 の血清では他の断片とも反応した。また、Fr-1/Fr-2 を用いた吸収試験も行い、主要なエピトープが Fr-1/ Fr-2 に含まれる α -フォドリン N 末端側 150 アミノ酸の領域に複数存在することを確認した。その領域内で重複する小断片 (Sub-1~5) を用いたドットブロッキングでは、p-SS 患者血清の全てが Sub-2, 4 と反応し、Sub-3 と弱く反応した。以上より p-SS における抗 α -フォドリン抗体が認識する主要エピトープは、 α -フォドリン N 末端側 27 番から 132 番アミノ酸の間に存在すると推定された。
3. エピトープの経時的変化: 患者 p-SS-5 において、診断確定 2 年前の初回受診時 (p-SS-5-1)・無菌性髄膜炎での入院時 (p-SS-5-2)・無菌性髄膜炎治癒後 (p-SS-5-3) の 3 種類の血清を用いてドットブロッキングにて検討した。各血清と反応する α -フォドリンの重複断片は、最初は N 末端側のみであったが、無菌性髄膜炎の進行とともに C 末端側へと次第に拡散していた。
4. s-SS における抗 α -フォドリン抗体のエピトープ解析: 抗 α -フォドリン抗体を認めた s-SS 患者及び SLE 患者血清を用いてドットブロッキングを施行した。これらの血清全てがほとんどの重複断片 (Fr-1~11) と反応した。特に Fr-1/Fr-8 に強く反応し Fr-3 と弱く反応しており、p-SS 患者血清とは異なる反応パターンを示した。

考察

小児 SS 患者における抗 α -フォドリン抗体の陽性率は、p-SS で 100%、s-SS で 90% と非常に高い値を示した。SLE 患者や正常健常者での陽性率は 10~20% 程度であり、抗 α -フォドリン抗体が小児 SS の診断に非常に有用なマーカーとなりうる事が改めて示唆された。

本研究では抗 α -フォドリン抗体が認識するエピトープの解析を行い、p-SS 及び s-SS に共通する主要エピトープが複数存在する領域を同定した。アポトーシスにより α -フォドリンが分断化され 120-kDa 蛋白が生じてくる過程で、この領域が最初に認識されると考えられ、病態形成の非常に早期の変化を反映していると推測される。したがって、抗 α -フォドリン抗体は SS の早期診断に有用と考えられ、特に乾燥症状を有しない早期例が多い小児における診断的価値は非常に高いと考えられる。また、この主要エピトープを含む断片を ELISA 法に導入することで、SS の診断精度がさらに向上することも期待される。

一部の p-SS 患者血清では、この主要エピトープ以外のエピトープが多数確認された。患者 p-SS-7, p-SS-9 は各々末梢神経炎、無菌性髄膜炎を合併しており、患者 p-SS-9, p-SS-10 では明らかな乾燥症状を認めた。患者 p-SS-5 では、無菌性髄膜炎発症後に抗体認識部位が経時的に拡散していく過程が示された。外分泌腺での原発性病変や腺外病変の進行に伴って 120-kDa α -フォドリンの分断化も進み、抗体認識部位が拡大していくものと推測される。神経系合併症を有する SS

患者で抗 α -フォドリン抗体の高い陽性率が報告されているが、神経組織での α -フォドリンの高発現とエピトープの拡散も関係していると考えられる。

腺外症状を有する p-SS と s-SS では多数のエピトープが広範囲に認められたが、その反応パターンに若干の相違点が認められた。この結果から、p-SS と s-SS での抗体産生機序の相違も示唆され、さらにそのパターンの相違から両者を鑑別できる可能性も期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

小児シェーグレン症候群における

抗 α -フォドリン自己抗体が認識するエピトープ解析

シェーグレン症候群 (Sjögren syndrome; SS) は涙腺・唾液腺等の外分泌腺障害を特徴とする臓器特異的自己免疫疾患で全身症状を伴う場合がある。臨床病態の特徴から唾液腺・涙腺などに限局する一次性 SS (primary SS; p-SS) と他の自己免疫疾患に合併する二次性 SS (secondary SS; s-SS) とに分類されている。しかし、乾燥症状の少ない小児患者では診断が難しく、疾患特異性の高い診断マーカーが求められている。SS モデルマウスで SS 特異的自己抗原として同定された 120-kDa α -フォドリンに対する自己抗体 (以下、抗 α -フォドリン抗体) が、SS 患者血清中に高率に存在することが報告され、SS 特異的な診断マーカーとして期待された。しかし、その後の ELISA 法での検討では、ウェスタンブロッティング (WB) 法による結果より明らかに低値であった。そこで、本研究では抗 α -フォドリン抗体が認識するエピトープの解析を行った。

まず、120-kDa α -フォドリン N 末端部 (JS-1; 586 アミノ酸) に対応する重複断片 (Fr-1~11, Sub-1~5) を、 α -フォドリン/GST 融合蛋白として作製し、以下の WB およびドットブロッティング (DB) の抗原として用いた。

120-kDa α -フォドリン N 末端部 (JS-1) を抗原とした WB では、p-SS 患者 10 例全てが抗 α -フォドリン抗体陽性であり、s-SS 患者では 10 例中 9 例が陽性であった。一方、SLE 患者 6 例及び健常者 10 例での陽性者は、それぞれ 1 例のみであった。これにより、小児 SS における抗 α -フォドリン抗体の高い陽性率が確認され、小児 SS の非常に有用な診断マーカーとなりうることが示された。

重複断片 (Fr-1~11) を抗原とした DB では、p-SS 患者血清の全てが Fr-1 と Fr-2 に反応した。主要エピトープ領域を Fr-1/Fr-2 を用いた吸収試験で再確認した後、その領域内で重複する小断片 (Sub-1~5) を用いた DB を施行した。そして、p-SS における抗 α -フォドリン抗体

が認識する主要エピトープを、 α -フォドリンN末端側27番から132番アミノ酸の領域に同定した。また、3例のp-SS患者では、この主要エピトープ以外のエピトープも確認した。これらの患者では、末梢神経炎・無菌性髄膜炎の合併や明らかな乾燥症状を認めた。一方、抗 α -フォドリン抗体を認めたs-SS及びSLE患者血清を用いたDBでは、全ての血清がほとんどの重複断片(Fr-1~11)と反応した。特にFr-1/Fr-8に強く反応しFr-3とも弱く反応しており、p-SS患者血清とは異なる反応パターンを示した。

SS診断確定前から血清が保存されていたp-SS患者についてエピトープの経時的変化を検討した結果、最初はN末端側のみであったエピトープが、無菌性髄膜炎の進行とともにC末端側へと拡散していく現象を確認した。

本研究で同定したp-SS及びs-SSに共通する主要エピトープは、一番最初に認識される部位と考えられ、抗 α -フォドリン抗体は特に小児SSの早期診断に有用と考えられる。また、この主要エピトープを含む断片をELISA法に導入することで、SSの診断精度がさらに向上することも期待される。

公開発表に際し、副査の小池隆夫教授から、小児SSの実践的な診断方法、成人SSで予想されるEpitope spreading、Neonatal Lupusでの抗 α -フォドリン抗体、 α -fodrinのcrystal structure、ユビキタスに存在する α -fodrinが唾液腺特異的な抗原になる理由についての質問があった。次いで副査の畠山鎮次教授から、神経系の合併症例でepitopeが広がっている理由、一次性SSの主要エピトープの構造的特徴、120kDa- α -fodrin以外の小さい抗原の有無についての質問があった。最後に、主査の有賀正教授より抗 α -フォドリン抗体の出現時期(他の自己抗体との比較)、抗 α -フォドリン抗体とSSの病態との関係についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は誠意ある妥当な解答をしていた。

本研究は、小児SSの診断における抗 α -フォドリン抗体の有用性を示すとともに、その主要エピトープを同定し、さらに一次性および二次性SSにおけるエピトープの相違を明らかにした。今後、主要エピトープ断片を用いたELISA法や一次性および二次性SSの鑑別法の確立などへの応用と研究発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。