

論文の内容の要旨

論文題目 抗リボソーム P 抗体がヒト末梢血単球の
機能におよぼす影響についての検討

指導教官 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 永井 立夫

[研究背景]

全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus, SLE)は、多臓器を侵す自己免疫疾患で多種類の自己抗体の出現が大きな特徴である。

1985年、SLEの自己抗原として、リボソームP蛋白が同定された。リボソームP蛋白とは、真核細胞のリボソームの60Sサブユニットに存在する3種類のリン酸化蛋白の総称で、分子量の大きい順にP0(38kDa)、P1(19kDa)、P2(17kDa)と命名されている。これらのリボソームP蛋白はC末端の22個のアミノ酸からなる共通の抗原決定基を有している。抗リボソームP抗体(anti-ribosomal P protein antibody, anti-P)とは、これら3種のリボソームP蛋白を同時に認識する自己抗体である。抗リボソームP抗体はSLEに特異性が高く、SLE患者の12~16%で陽性であった。

抗リボソームP抗体は、SLEのさまざまな病態のなかで、神経精神症状(neuropsychiatric syndromes of systemic lupus erythematosus, NPSLE)や腎症および肝機能障害と関連することが報告されている。しかしながら、SLEにおける抗リボソームP抗体の病因的役割は不明のままである。

これまで、神経芽細胞腫の培養細胞や肝細胞由来株および血管内皮細胞の細胞膜上に、抗リボソームP抗体の認識するエピトープ(リボソームP抗原)が存在することが示されてきた。免疫担当細胞においては、リボソームP抗原は活性化したあるいはトランスフォームされたT細胞表面上にのみ存在し、B細胞表面上には存在しないことが明らかにされている。

〔研究目的〕

これまで明らかにされていなかった、ヒト末梢血単球表面上のリボソーム P 抗原の発現の有無を解析し、抗リボソーム P 抗体の末梢血単球の機能におよぼす影響を検討するために、本研究を行った。特に、単球の重要な役割である炎症性サイトカインの発現に注目した。

〔材料と方法〕

アメリカリウマチ協会の 1982 年の SLE 分類のための改定基準を満たし、同意を得た SLE 患者 8 例を用いた。これらの SLE 患者血清より IgG を精製し、さらにこの IgG からアフィニティー精製により、抗リボソーム P 抗体を得た。抗リボソーム P 抗体の F(ab')₂ フラグメントは、ペプシン処理後にゲルろ過して得られた患者 IgG の F(ab')₂ フラグメントからアフィニティー精製することにより得られた。

同意を得た健常成人の末梢静脈血から比重遠心法により末梢血単核球を分離し、磁気細胞分離カラムを用いて、ネガティブセレクションにより単球を分離した。

健常人末梢血より分離したばかりの単球および 48 時間平底プレート上で培養した単球と抗リボソーム P 抗体の結合をフローサイトメトリーにて検討した。細胞を抗リボソーム P 抗体あるいは健常人 IgG で染色し、さらに、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 F(ab')₂ ヤギ抗ヒト IgG で染色した。死細胞を除外し抗リボソーム P 抗体と単球表面との結合をみるために、propidium iodide (PI) を添加した。一部の実験では、アポトーシス細胞を除外するために、phycoerythrin (PE) 標識 annexin V を添加した。

分離した単球 (1x10⁶/ml) を、5 μg/ml の抗リボソーム P 抗体、抗リボソーム P 抗体を除いた同じ患者 IgG 分画あるいは健常人 IgG と共に、平底プレート上で 120 時間培養し、培養上清を回収した。一部の実験では、3 μg/ml の抗リボソーム P 抗体、抗リボソーム P 抗体を除いた同じ患者 IgG 分画、健常人 IgG および同じ患者の抗リボソーム P 抗体の F(ab')₂ フラグメントを用いた。培養上清中の TNF α は、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法により測定した。培養上清中の IL-6 は、MH60.BSF2 細胞を用いたバイオアッセイにより測定した。

分離した単球 (1x10⁶/ml) を、5 μg/ml の抗リボソーム P 抗体、抗リボソーム P 抗体を除いた同じ患者 IgG 分画あるいは健常人 IgG と共に、平底プレート上で 48 時間培養し、細胞を回収した。回収した単球より総 RNA を精製し、リアルタイム PCR (polymerase chain reaction) 法により、TNF α および IL-6 の mRNA を定量した。内部標準として、ベータアクチンを用いた。

〔結果〕

図 1 は、フローサイトメトリーによる末梢血単球表面と抗リボソーム P 抗体 (図で Anti-P と記載) あるいは健常人 IgG (図で Control IgG と記載) との結合パターンの代表的な 1 例を示した。これは、PI 陰性のゲートを用いている。図の横軸に FITC の蛍光強度、縦軸に細胞数を示した。抗リボソーム P 抗体に対して陽性に染色された細胞の割合 (%) および平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity; MFI) の差を図に示した。精製したばかり (Day 0) の末梢血単球表面には、抗リボソーム P 抗体は健常人 IgG とほ

ほぼ同等の結合を示した。しかし、プレートへの接着刺激後 2 日目 (Day 2) の単球表面には、抗リボソーム P 抗体は健常人 IgG より有意に強い結合を示した。annexin V 陰性のゲートを用いた場合にも、同様な結果が得られた (データは示さず)。

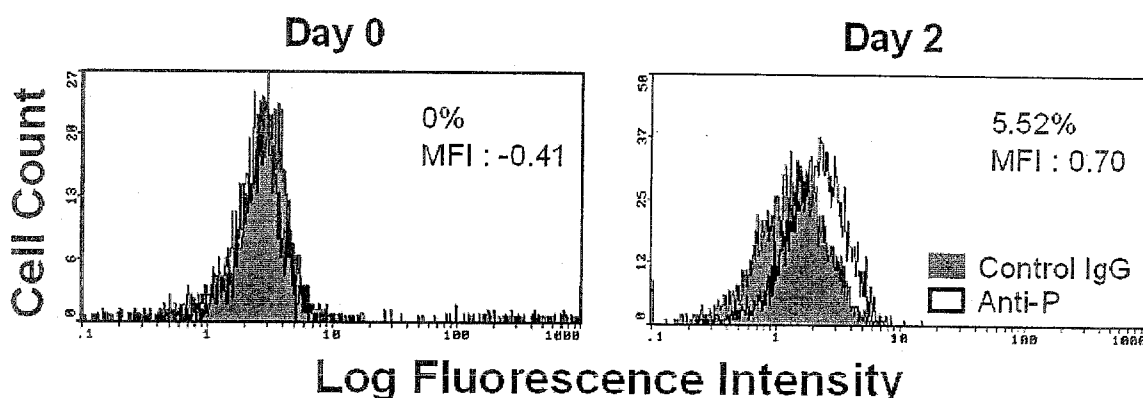


図 1 末梢血単球表面上のリボソーム P 抗原の発現

図 2 の上段には、7 名の健常人から分離した単球をある特定の患者の抗リボソーム P 抗体 (図で Anti-P と記載)、同じ患者の抗リボソーム P 抗体を除いた IgG 分画 (図で IgG devoid of anti-P と記載) あるいはある特定の健常人 IgG (図で Control と記載) とともに培養した上清中の TNF α および IL-6 の濃度を示した。同一の健常人単球に由来するデータを線で結んでいる。抗リボソーム P 抗体を除いた IgG 分画あるいは健常人 IgG に比し、抗リボソーム P 抗体とともに培養した上清中の TNF α および IL-6 の濃度は、統計学的に有意に上昇していた。さらに、抗リボソーム P 抗体の F(ab')₂ フラグメントとともに培養した上清中の TNF α および IL-6 の濃度は、同一の患者の IgG 型の抗リボソーム P 抗体とともに培養した上清中のそれらと同程度であった (データは示さず)。

図 2 の下段には、ある 1 名の健常人から分離した単球の培養上清中の TNF α および IL-6 の濃度を示した。この実験では、8 名の患者の抗リボソーム P 抗体 (図で Anti-P と記載) および対応する患者の抗リボソーム P 抗体を除いた IgG 分画 (図で IgG devoid of anti-P と記載) を用いた。同一の患者に由来するデータを線で結んでいる。対応する患者の抗リボソーム P 抗体を除いた IgG 分画に比し、抗リボソーム P 抗体とともに培養した上清中の TNF α および IL-6 の濃度は、統計学的に有意に上昇していた。

さらに、6 名の健常人から分離した単球における TNF α および IL-6 の mRNA を定量した。特定の患者の抗リボソーム P 抗体を除いた IgG 分画あるいは特定の健常人 IgG に比し、同じ患者の抗リボソーム P 抗体とともに培養した単球の TNF α および IL-6 の mRNA の発現量は統計学的に有意に上昇していた。同様に、ある 1 名の健常人から分離した単球を 7 名の抗リボソーム P 抗体および対応する患者の抗リボソーム P 抗体を除いた IgG 分画とともに培養し、それらの TNF α および IL-6 の mRNA を定量した。対応する患者の抗リボソーム P 抗体を除いた IgG 分画に比し、抗リボソーム P 抗体とともに培養した単球の TNF α および IL-6 の mRNA の発現量は、統計学的に有意に上昇していた (データは示さず)。

〔考察〕

健常成人由来の末梢循環血液中の単球表面には、リボソーム P 抗原の発現は認められなかったが、プレート接着により単球を活性化すると、その表面にリボソーム P 抗原の発現が認められた。このリボソーム P 抗原の発現は、アポトーシスに伴った細胞内リボソーム P 蛋白の局在変化によるものではないことが示された。抗リボソーム P 抗体は単球表面と結合することにより、単球の TNF α および IL-6 の発現を誘導することが明らかとなった。この機序には、Fc γ 受容体の架橋を要さないことが示唆された。抗リボソーム P 抗体は、活性化した単球から炎症性サイトカインを誘導することにより、SLE のさまざまな病態に関与している可能性がある。

〔まとめ〕

本研究は、日常の臨床において診断の補助や疾患活動性の指標として使用される自己抗体が、実際に細胞の機能を変え得るということを示した点で意義深い。本研究は、自己抗体の病因的意義を解明するための手がかりとなるであろう。

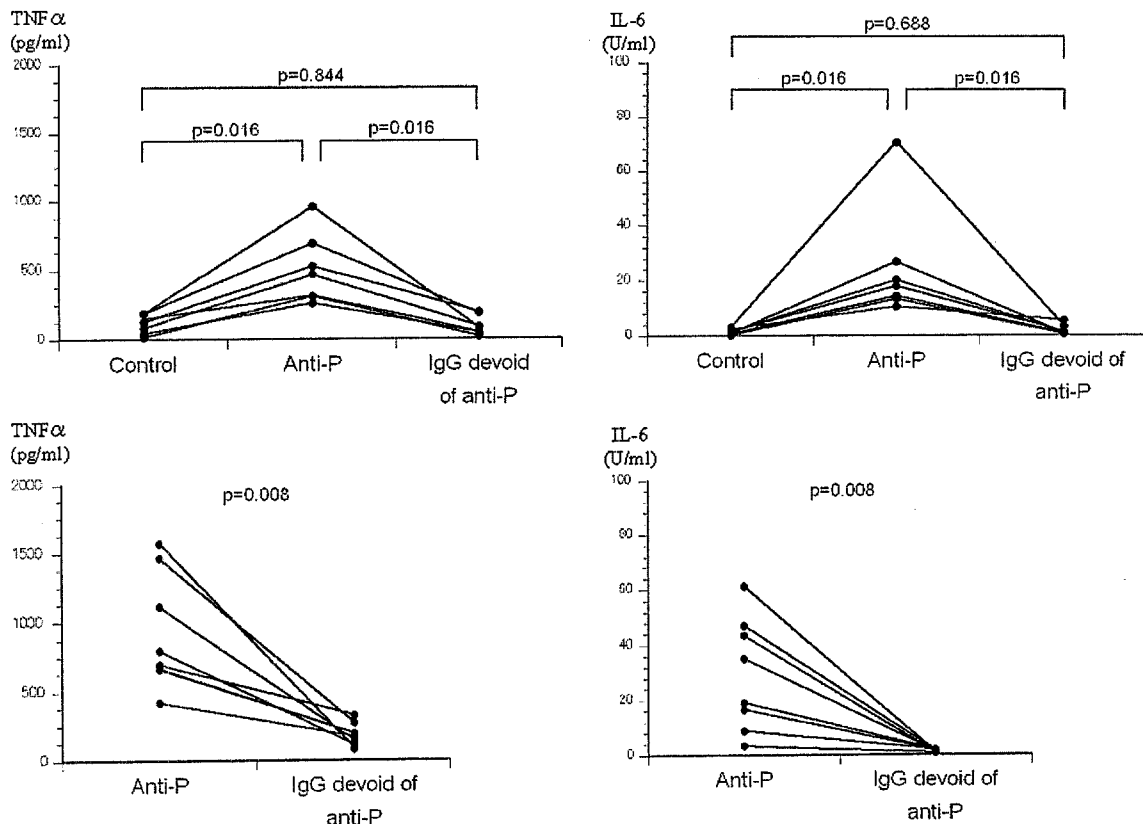


図 2 ある特定の患者から精製した抗リボソーム P 抗体が、複数 (n=7) の健常人末梢血単球からの TNF α および IL-6 の放出におよぼす影響(上段)および複数 (n=8) の患者から精製した抗リボソーム P 抗体が、ある特定の健常人末梢血単球からの TNF α および IL-6 の放出におよぼす影響(下段)