

全身性自己免疫疾患における自己抗体の  
標的分子とそのB細胞応答についての研究

三 崎 義 堅

本論文中に使用されている略号

RA:慢性関節リウマチ

SLE:全身性エリテマトーデス

SJS:シェーグレン症候群

PM:多発性筋炎

SSc:強皮症

RP:レイノー症候群

ELISA:enzymelinkedsorbentassay

## 参考文献

本研究の主な内容は以下の論文に報告した。

### 第一章

Misaki, Y., K. Yamamoto, K. Yanagi, H. Miura, H. Ichijo, T. Kato, T. Mato, S. Welling-Wester, K. Nishioka, and K. Ito. 1993. B cell epitope on the U1 sn RNP-C autoantigen contains a sequence similar to that of the herpes simplex virus protein. *Eur. J. Immunol.* 23:1064-1071.

### 第二章

Misaki, Y., G.J.M. Pruijn, A.W.C.M.van der Kemp, and W.J. van Venrooij. 1994. The 56K autoantigen is identical to human annexin XI. *J. Biol. Chem* 269:4240-4246.

Misaki, Y., W.J.van Venrooij, and G.J.M.Pruijn. 1995. Prevalence and characteristics of anti-56K/annexin XI autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *J. Rheumatol.* 22:97-102.

## 要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)や強皮症(SSc)などの全身性自己免疫疾患の重要な特徴の一つに自己抗体の出現がある。自己抗体は、抗dsDNA抗体や抗Sm抗体などの様に疾患の診断や活動性を評価する上で、また抗nRNP抗体のように混合性結合組織病(MCTD)という一つの疾患概念を形成する上でも重要な役割を果たしている。こうした自己抗体は核内分子を標的としているものが多いが、それに限らず細胞膜、細胞質分子も自己抗体の標的となりうる。生体内で免疫系はこのような自己の成分に対しては、様々な機序を用いて免疫寛容を維持していると考えられている。従って、全身性自己免疫疾患においてこうした自己抗体がなぜ出現してくるかを考えることは免疫寛容の破綻と自己免疫疾患の病因を考える上で重要なことである。また自己抗原に対する抗原特異的免疫応答の解明は、抗原特異的な免疫制御を通じた治療につながる可能性がある。自己抗原となっている分子は細胞内で重要な働きをしているものが多く、後述するように自己抗体が自己抗原分子の機能を抑制する例もあり自己抗原の機能の追求という観点からも含めて、我々自己免疫の解明をめざすグループのみならず分子細胞生物学者達も、cDNAクローニング及びエピトープマッピングといった自己抗原の研究に精力的に取り組み、この分野の大きな進歩につながった。

自己抗体の自己抗原上で認識する領域を決定することは、自己抗体の産生機序を検討する上でも重要なことである。なぜなら全身性自己免疫疾患の患者ではポリクローナルなB細胞活性化がみられるが、自己抗体の中には抗原特異性が明確でなくIgM型抗体のpolyreactivity(多特異性)の表現と考えられるものも少なくない。このような自己抗体の認識するエピトープは自己抗原上全体にわたって弱い親和性反応性をみせるエピトープが分布しているであろう。またB細胞反応には患者個々の遺伝的背景の違いによるエピトープの違いがあるのか、或いは自己抗原上に特別反応性の強い部分がありその領域がその自己抗原分子の機能上重要な箇所であったり、またウィルスなどの外来抗原との分子相同性がある領域なのかなどの疑問にこたえ、患者ひとりひとりの自己抗原に対する自己免疫反応の解析につながるからである。

以上のことに基づき、自己抗原のcDNAクローニング及びB細胞応答を解析した研究をまとめたものがこの論文であり、以下の二つの内容から構成される。

第一章での研究では、SLEやMCTDで出現する抗nRNP抗体が認識するU1snRNP複合体に属するU1snRNP-C蛋白を取り扱った。mRNAのスプライシングに関与するU1snRNP複合体の構成成分の一つでもあるU1-C蛋白の全長cDNAをクローニングし、さらにそのB細胞エピトープを決定した。そしてその主要エピトープには二種の交差反応性があり、一つはヘルペスウイルス蛋白と、もう一つは同じU1snRNP複合体のU1-AとSm-B/B'蛋白との反応であった。この交差反応性はいずれも交差反応性B細胞を介する自己抗体産生機序の存在を考えさせる上で重要な知見であった。そして第二章の研究では、対応抗原が不明であった抗56K抗体が認識する未知の分子のcDNA単離及びエピトープマッピングを行った。この抗56K自己抗体が認識するのはヒトアネキシンXIであって、我々のグループと前後してウシ、ウサギでそれぞれ別々の観点からクローニングされた興味深い分子である。さらにこの抗56K抗体は様々な全身性自己免疫疾患で出現するがその広い疾患スペクトラムにも関わらず高力価高親和性のIgG抗体が出現している点、いままでの自己抗体とかなり異なる特徴を持ち、別の自己抗体産生の道筋の存在が推察された。

これらの研究の成果をふまえた文献的検討を加え、まず最初に自己抗体の産生機序を現在考える仮説での考察から始め、本研究の背景説明とする。

## 研究の背景

### 第一節 緒言

要旨で述べたように自己抗体の出現は、SLEやSScなどの全身性自己免疫疾患の重要な特徴の一つである。様々な機序を用いて免疫寛容が維持されていると考えられるこれらの自己分子に対して免疫応答が起こっている現象を追求するという事は、自己免疫疾患の病態を考える上で、また抗原特異的な免疫制御を通じた新しい治療を探る点で、重要な点でありと考えられる。この項では自己抗体がどのような自己成分を標的にしているのか、そしてそれらがなぜ出現しうるのかという問題について概説する。

### 第二節 自己抗体の標的分子

こうした自己抗体は核内分子を標的としているものが多いが、それに限らず細胞膜、細胞質分子も自己抗体の標的となりうる (1)。全身性自己免疫疾患における主な自己抗原を表1にまとめた。自己免疫疾患患者体内ではポリクローナルにB細胞が活性化されていることが多く、IgM型の自己抗体まで含めると多数の自己抗体が報告されている。しかしこれらの抗体はIgM抗体のpolyreactivityで説明できることも多く、はたして特定の自己抗原にむけられた抗体産生かどうか明確でないので、この表では抗原特異性が確立されているものだけに留めた。

自己抗原の特徴の一つとして核酸・蛋白複合体が多く細胞内で重要な機能を果たしているものが多いことがあげられる (2)。ある一つの疾患に出現する自己抗体のスペクトラムにはある特定のパターンがある。これにはある疾患では特定の細胞内領域と関係している分子に対する抗体が出現するという説があり (3)、例えば強皮症で出現する自己抗体は核小体と関連する抗原に対するものが多い。この説ですべての自己抗体パターンは説明できないが、少なくとも複合体を形成している抗原同士は同じ疾患、時には同じ患者血清で反応が観察される。この現象は自己抗体産生にB細胞の抗原提示能力が密接に関わっているからだと考えられる。

B細胞は活性化されると多量にクラスII抗原を発現しその表面免疫グロブリンレセプターを通じて抗原を取り込むので、抗原特異的なantigen presenting cellとしてはdendric cellなどのようなprofessional APCに比べて $10^3$ - $10^4$ 倍強い抗原提示能を持つとされる (4)。従って

表1 主な自己抗原とその機能、対応抗体の出現する主な疾患

細胞内所在あるいは 所属する分子群	抗原分子	機能	出現する主な 疾患
核抗原			
ヌクレオソーム			
	dsDNA	二重鎖DNA	SLE
	ヒストン (H1, H2A, H2B H3, H4)	二重鎖DNAのクロ マチンへの収納	SLE 薬剤誘発性 ループス
スプライソゾーム			
	U1snRNP (U1-70K, A, C)	mRNAのスプライ シング	SLE, MCTD
	Sm (U1, U2, U4, U5 U6上の Smコア蛋白: B, B', D1/D2/D3, E, F, G)	"	SLE
	U2snRNP (A', B')	"	SLE
	U4/U6snRNP	"	SSc, SjS
	U5snRNP	"	SLE
	U1RNA	"	MCTD, SLE
	hnRNP (A1, A2) A2はRA33	pre-mRNAのパッ ケーシングあるいは輸送	SLE, RA
核小体			
	U3snRNP (フィブラリン)	rRNAのプロセシング	SSc
	ThRNP (To)	RNaseP, MRPR, NPと同一 rRNAの転写	SSc
	RNA-polymerase I PM/ScI (75K, 100K)	rRNAの転写	SSc
	ヌクレオリン	リボソーム形成? rRNA転写制御	PM, SSc, PM/ScI
	NOR-90/hUBF	リボソーム輸送 RNA polymerase I 転写因子	SLE
			SSc

表1つづき 主な自己抗原とその機能、対応抗体の出現する主な疾患

細胞質抗原

RoRNP	Ro60 (SS-A)	不明	SjS, SLE
	Ro52 (SS-A)	不明	"
	La (SS-B)	RNAポリメラーゼ IIIの転写終結	"
	hY 5 RNP	不明	"
	hY 5 RNA	不明	"
リボソーム	リボソーム蛋白 (P0, P1, P2)	蛋白合成	SLE
アミノアシル合成酵素	ヒスチジルtRNA 合成酵素 (Jo-1)	アミノ酸をtRNA に結合させる	PM
	アラニンtRNA合 成酵素 (PL-12)	"	"
	スレオニンtRNA 合成酵素 (PL-7)	"	"
	イソロイシン tRNA合成酵素	"	"
	グリシンtRNA合 成酵素	"	"
	アラニンtRNA 合成酵素	"	"
ストレス蛋白	HSP70	蛋白のフォールディング に関与	SLE
	HSP90	ステロイドホルモン 受容体、キナーゼ、 アクチンなどに結合	SLE
その他の細胞質抗原	カルレティキユ リン	ERにおけるCa貯蔵蛋白 グルコシルコリドレセプター DNA結合領域と関係？ CTLの顆粒	SLE
	アネキシン XI	Ca依存性リン脂質結合蛋白 カルサイクリンと結合	SLE, RA SjS, SSc, PM

表1つづき 主な自己抗原とその機能、対応抗体の出現する主な疾患

その他の核抗原

DNAトポイソメラーゼ I	DNA複製時のねじれ防止のためDNA鎖を可逆的に切断	SSc
セントロメア (A, B, C, D)	動原体を構成	CREST
Ku (p70/p80)	DNA依存性キナーゼを構成 (NFIVと同一)	SLE, SSc
PCNA	DNAポリメラーゼの補助因子	SLE
HMG (HMG-1, 2, 17)	DNA-ヒストンに付着	JRA
p80-コイリン	コイルド体を形成し スプライシングに関与?	様々
ポリ(ADP-リボース) ポリメラーゼ	DNA鎖修正 クロマチン構造形成に関与	SjS 神経炎
NuMA	有糸分裂に関与 紡錘体極	様々

自己抗原複合体のその構成成分の一つの分子に特異的なB細胞が、その複合体全体を取り込んでプロセッシングし、他の構成分子を抗原提示することは十分に考えられる。このB細胞の抗原提示能力は、後で述べるmolecular mimicry説でも重要なポイントとなる。また自己抗原分子間の交差反応性も報告されており、このような例でも交差反応性B細胞を通じて新たな分子が免疫系に認識される可能性がある。このような自己抗原同士の関係も、疾患ごとに異なる自己抗体のパターンに影響していると考えられる。

従って自己抗原複合体の構成分子、細胞内での局在という点に注意しながら自己抗原を理解することが重要であるので表1では、その点を明確化した。

### 第三節 自己抗体産生機序の様々な仮説

自己抗体の産生機序については様々な仮説が発表されており、表2にまとめた。

マウスで実験的に自己抗体を産生させる系がいくつか報告されている。細胞死を抑制するようなbcl2遺伝子をIgHエンハンサーを用いて導入したtransgenic mouseではpolyclonal B cell activationが起き、さらに抗Sm抗体や抗dsDNA抗体といった疾患特異的な自己抗体が出現する(5)。したがって、B細胞全般に異常を起こすような、そして、自己反応性B細胞をも活性化できるような異常というのは自己抗体産生につながるのではないかと考えられる。

マウスにおいて実験的に慢性のGVH(graft versus host)やHVG(host versus graft)反応をおこすと同様のpolyclonal B cell activationがみられ、抗nRNP抗体を始めとする自己抗体の出現が見られる(6)。T細胞レセプターの $\alpha$ 鎖をknock outしたマウスでは $\alpha\beta$ 型のT細胞が欠如しているがこのマウスでもpolyclonal B cell activationに続きIgG型の疾患特異的な自己抗体、抗dsDNA抗体や抗nRNP抗体が出現することが報告されている(7)。In vitroでB細胞をLPSなどで刺激してpolyclonal B cell activationをおこしてもT細胞なしではIgMからIgGへのクラススイッチがみられない。従って疾患特異的なIgG型自己抗体が出現するこれらの実験モデルでは、単なるpolyclonal B cell activationだけでなく、質的に異なるシグナルでB細胞が活性化されていると考えられる。GVHモデルマウスではT細胞サブセットがTh2優位となり産生亢進したIL-4が(8)、また $\alpha$ 鎖knock out mouseでは $\alpha\beta$ 型の代わりに $\gamma\delta$ 型のT細胞が自己抗体産生を介助しているとも考えられる。中でもGVHの系でしめされているようにCD40Lを介する刺激は、自己反応性B細胞をも活性化しうる(9)。こうしたいわばB細胞に

としてのco-stimulatory signal が、B細胞免疫寛容からの離脱に重要かもしれない。

またヒトでも polyclonal B cell activation を介する自己抗体産生の検討がなされている。superantigen をB細胞に加えると、T細胞の存在、あるいは非存在でも、B細胞にクラスII分子を介してシグナルが入り、抗原非特異的にB細胞を活性化することが示されている(10,11)。こうした考えは、自己抗原がT-independent antigen ではないかという考えにつながっており、たしかに自己抗原は多価抗原であると推測されるものが多いが、その証明はまだない(12)。細胞死に関わる分子であるFas抗原とそのリガンドの異常であるlpr変異及びgld変異マウスでも疾患特異的自己抗体が出現するのはよく知られているが、その機序がT細胞から自己反応性B細胞へ細胞死のシグナルが入らないのが問題なのか自己反応性T細胞のactivation induced cell deathの欠如なのかは明確でない。bcl-2トランスジェニックマウスの系にしてもIgHエンハンサーはT細胞にも発現を誘導するので、B細胞だけが異常とは現時点ではいいきれない。いずれにせよどちらも末梢性に自己反応性のT細胞あるいはB細胞を除去する末梢免疫寛容維持機構で重要な役割を果たしている分子である。T細胞の関与の有無は別として、自己反応性のB細胞を活性化したり生存を延長させたりするB細胞自体の異常はいずれも自己抗体産生に結びつく可能性があるといえよう。

B細胞全般の異常に基づいて自己抗体が出現するという考え方に対して、抗原特異的なT細胞を重視する考え方もある。実際に患者末梢血中に自己抗原特異的なT細胞が存在することが確かめられている(13,14)。また我々のグループを含めて様々なグループが行った自己抗原での自己抗体認識領域の検討(B細胞エピトープマッピング)の結果から、自己抗原上には複数個のエピトープがあるということが判明し(15)、またIgG型の自己抗体を産生するようなハイブリドーマの免疫グロブリン可変部領域を調べるとCDR領域にhypermutationが集積していた(16)。従って、自己抗原特異的なT細胞が出現し、そのT細胞が自己抗体産生を促している、antigen drivenのメカニズムは自己抗体産生上働いているということは、現在コンセンサスを得ている。また自己抗原特異的なT細胞が存在すれば、B細胞レベルでの免疫寛容も破れるであろうと想像されている。さらに自己反応性T細胞が、自らが認識する抗原そのものでなくそれと複合体を形成する分子に対する抗体産生を促進する現象も知られており(complex特異的なT細胞)(17)、ひとつの自己反応性T細胞により

表2 自己抗体の産生機序についての仮説

non-specific B cell activation

1. polyclonal B cell activation
2. graft-versus -host like reaction
3. superantigen

antigen-specific B cell activation

4. antigen driven
5. complex specific T cell
6. altered self
7. hapten - carrier
8. molecular mimicry
9. increased amount of released autoantigen

表3

自己抗原上のエピトープとの分子相同性が報告されているウイルス抗原

自己抗原	ウイルス抗原
U1snRNP-70K	retrovirus p30gag influenza B virus M1 protein
U1snRNP-C	herpes simplex virus
SSB/La	feline sarcoma virus gag protein
SSA/Ro	vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein
Ki/SL	SV40 T antigen NLS

複数の自己抗体産生が制御されている可能性もある。

全身性自己免疫疾患で標的となっている自己抗原は全身的に発現しており、臓器特異的  
自己免疫疾患でみられるような隔絶抗原ではなくT細胞はignorantという状態ではな  
う。全身的に発現している自己抗原に対する自己反応性T細胞はnegative selectionの過程で  
完全にclonal deletionをうけるのではなく、少なくとも一部はそこから逃れ、おそらく  
anergyの状態で末梢血中に存在していると考えられる。従っていかに自己抗原特異的なT  
細胞が活性化されるかということが重要な問題である。

例えば選択的スプライシングによるアイソフォームの出現、化学修飾による抗原性の変  
化とか、異所性の自己抗原出現などといった自己抗原自体の変異が免疫系に認識される契  
機となる可能性がある(altered self)。アポトーシスを起こしている細胞表面に形成された  
blebには、RoRNPやsnRNPなどが集族しており、こうした表面への移行に伴い酸化などの  
傷害反応を自己抗原が受け抗原性が変化するのではないかという考え方もある(18)。従来  
までの細胞表面での自己抗原を検出できたという報告はいずれも免疫寛容破綻に対する意  
義が曖昧であったが、それらよりは進んだ考え方である。最近シェーグレン症候群患者B  
リンパ球より作成したcDNAライブラリーよりLa(SS-B)分子に選択的スプライシングがお  
きていることが報告された(19)。実際にこの選択的スプライシングの結果としての蛋白レ  
ベルでのアイソフォームの存在は確認されておらず、また患者特異的なできごとかどう  
かも判明していないが、altered self説の方向の知見ではある。またSLEの患者末梢リンパ球  
ではアポトーシスになる細胞の比率が高いという報告がある(20)。プロカインアミド、キ  
ニジンやヒドララジンなど薬剤誘発性SLEをおこしやすい薬剤が活性化好中球のミエロ  
ペルオキシダーゼにより強い細胞傷害性を獲得するという報告もある(21)。アポトーシスを  
促進するヌクレオバインディンがprマウスで発見されたことを考えても(22)、こうした全  
身性自己免疫疾患患者体内ではアポトーシスになった細胞より血中に放出されるヌクレオ  
ソームなどの自己抗原の量は増えている可能性があり、それらが免疫系を刺激増悪させ  
ているのかもしれない。

SLEやSScなどの全身性の自己免疫疾患の発症過程に細菌やウイルスなどの外来微生物  
の関与は従来より想定されてきた。外来抗原と自己抗原が結合し、いわばハブテンとキャ

リヤーの関係が自己抗原認識につながるのではないかという考え方がある。SV40 T抗原は癌抑制遺伝子p53と結合するが、このSV40/p53複合体で免疫してやるとp53に対する免疫寛容が破られることが示されている(23)。RNAポリメラーゼIII転写物のポリUストレッチに結合するLaもウイルスRNAと結合することが知られている。

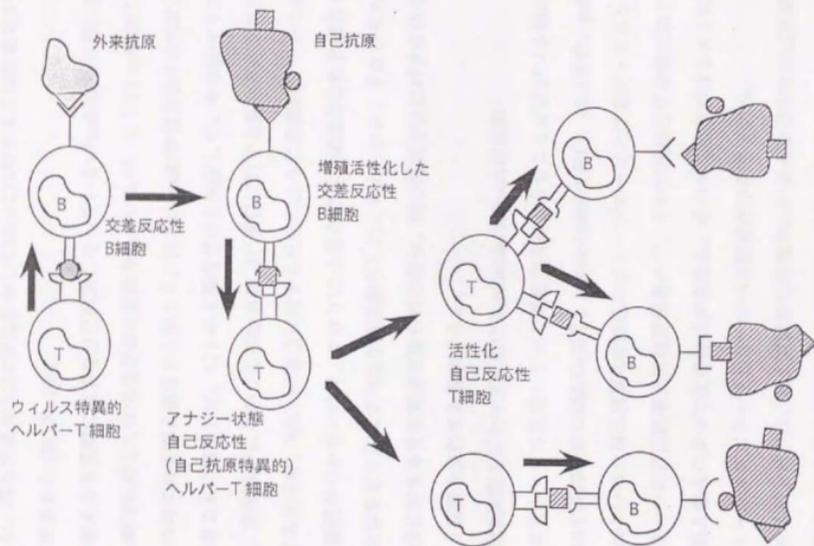
外来微生物と自己成分との分子相同性 (molecular mimicry) は以前より注目されてきた(24)。molecular mimicryという用語は1964年Damienが、寄生虫と宿主間で抗原性のある領域に共通性があることを指摘して使用したのが最初である(25)。自己抗原と相同性を持つようなウイルスなどの外来微生物が感染すると、ウイルス特異的なヘルパーT細胞の介助により、この自己抗原に交差反応性を持つようなB細胞が活性化され増殖する。この活性化増殖し質的にも量的にも十分なシグナルを送れる交差反応性B細胞がこの自己抗原をT細胞に抗原提示することがT細胞の免疫寛容の破綻につながると考えられる。そして、活性化された自己抗原特異的T細胞は、今度はantigen-drivenのメカニズムを介し、様々なエピトープを認識するようなB細胞の一群の増殖を促進していくであろうと考えられる。(図1)

このB細胞がT細胞にペプチドを抗原提示するときにT細胞が免疫寛容を導入される時に使われたペプチドとは違うペプチド(クリプティックエピトープ (cryptic epitope)) を抗原提示することが重要だという説がある(26)。その場合だと活性化され自己抗体産生を促進していくT細胞は、免疫寛容導入によりanergicになっていた自己抗原特異的T細胞ではなくnaive T細胞ということになる。こうした以上の一連の過程を筆者らは、エピトーププログレッション仮説 (epitope progression hypothesis) と称している(27)。

#### 第四節 molecular mimicry説を支持するモデル実験

こうした我々の交差反応性B細胞に注目する考え方を支持する実験が、エール大学のMamulaらによって行われている。マウスのチトクロームC(以下Mcyt C)はマウスにとって自己抗原であるためそれを免疫しても反応は起きない。ヒトのチトクロームC(以下Hcyc C)は104アミノ酸のうちわずか9アミノ酸しかマウスと違わないが、そのHcyc Cを免疫するとマウスにはT細胞応答及び、ヒトとマウスの区別のつかない交差反応性抗体産生がおきる。今度このHcyc CとMcyt Cを一緒に免疫してやると、ヒトのだけでなくマウスのcyt

図1 自己抗体産生機序における  
エピートププログレッション仮説



antigen-driven の機序による自己抗体産生の進展

Cに対するT細胞の反応も見られるようになる。そこで、Hcyc Cを免疫したマウスからB細胞だけを取り出して、そのB細胞とMcyt Cと一緒に注射してやると、Mcyt Cに対するT細胞の反応が見られた。即ち交差反応性B細胞を介してMcyt Cに対するT細胞寛容が破られたということが証明された(28, 29, 30)。

彼らはさらにこの考え方を実際に重要な自己抗原となっているU1 snRNP複合体に拡張した。マウスのU1 snRNPに対しては免疫寛容は維持されているが、ヒトU1 snRNPには免疫反応が起きる。この時に反応がA蛋白から始まり、同じU1 snRNP複合体中の70K、B/B'蛋白へと反応が広がることに着目して、ヒトのA蛋白だけを免疫して、その後マウスのU1 snRNPを免疫すると、免疫原中になかった70K、B/B'、B''蛋白に対する免疫反応が見られる(31)。70K蛋白に対する反応は、B/B'、B''蛋白に対する反応のようにB細胞レベルのA蛋白との交差反応性では説明がつかないので、やはりU1-A蛋白特異的の交差反応性B細胞がこのU1 snRNP complex全体を取り込んで70Kを抗原提示したと考えられる。すなわちある複合体の中の一つの成分に対する免疫寛容が破られた場合、他の構成分子に対する免疫寛容も破られていくという仮説を支持する実験である。

#### 第五節 自己抗原B細胞エピトープにおけるmolecular mimicryの実例

自己抗体のB細胞エピトープを決定していく過程で次のようなことに気がつき始めた。我々のグループは、U1-C蛋白の他にSSB/La蛋白、topoisomerase I蛋白、U1-A蛋白、poly (ADP-ribose) polymeraseといった自己抗原のB細胞エピトープマッピングを行ってきたが、エピトープというのは一つの自己抗原上に複数個あって、それが抗原分子全体にわたって分布しており、患者個人個人によって反応様式が異なる。その中に患者のほとんどによって認識されるユニヴァーサルエピトープともいふべき領域が存在する(27)。

このユニヴァーサルエピトープは、例えば酵素の活性中心であるなどその自己抗原の機能上非常に重要な部分で、分子構造上特別に抗原性が強い部分の可能性もある。しかし、患者血清を用いて経時的にエピトープの反応を追って行くと、ユニヴァーサルエピトープのみを認識し続ける症例があること、あるいはこのユニヴァーサルエピトープに始まり、他のエピトープに次第に反応が移っていく症例も見いだせることから、このユニヴァーサルエピトープは自己抗原に対するB細胞の免疫反応の始まりとなったエピトープである可

能性も考えられる。このユニヴァーサルエピトープの領域にウイルスとの分子相同性が見いだされる。第一章で述べるがごとく、抗U1-C抗体陽性患者全例で認識される主要エピトープの領域には、単純ヘルペスウイルスTYPE IのICP4 ( $\alpha$  4) 蛋白と6アミノ酸の分子相同な領域がある(15)。こうしたB細胞エピトープにおけるウイルスとの分子相同性はU1-70K蛋白とretrovirus p30 gag (32),あるいはインフルエンザウイルス(33)との交差反応性を始めとして、他にも幾つか報告されている(34, 35)(表3)。このU1-Cの主要エピトープ部分にはさらにもう一つの交差反応性があり、この主要エピトープポリペプチドでアフィニティ複製した患者血清は、U1-C蛋白それ自体に加えて、同じU1RNP complex中のB/B'蛋白及びA蛋白とも反応した。このRNP複合体の構成分子同士の交差反応の報告は既に幾つかあり、U1-AからU1-C、U1-CからB/B'、U1-AからU2-B'などがある(36, 37)。この二つの交差反応性は前述のエピトーププログレッションの説を支持する結果であった。

#### 第六節 molecular mimicry 説の妥当性と問題点

全身性自己免疫疾患患者体内で、免疫反応の標的となっている自己抗原の多くは、細胞内で重要な機能を果たしているものが多く進化的に良く保存されている。またウイルスや細菌側としても感染増殖の過程で宿主側の因子を利用したり、また免疫系の攻撃をかわすためその構成蛋白は宿主のものと相同性を有したほうが有利なこともある。コンピュータで自己抗原の一次アミノ酸配列を調べると外来抗原と相同性のある領域が多数検出される(38)。またウイルスにたいするモノクローナル抗体の中には自己に反応するものが3.5%もみつかったり、あるいはウイルス感染時に増殖したCTLを調べると自己に反応するものが多数であった(39)。自己への反応性を使って免疫系は外来微生物と戦っているのではないかという考え方もある。そうだとすれば、molecular mimicryと交差反応性という問題は決して稀な現象ではないといえるであろう。しかしmolecular mimicryが想定される自己抗原に対する免疫反応がおきている患者体内でいまのところ実際にそのmolecular mimicryを有するウイルスなどの外来微生物の感染が確認はされていない。またある自己抗原は他の自己抗原への免疫寛容破綻の結果として反応が続いておきているとしても、現在のところ分子相同性は一次構造でしか検討できない為、主要エピトープにおける分子相同性が証明された自己抗原はむしろ少ない。むしろ免疫寛容破綻を起こした後は、その原因ウイ

ルスは姿を消してもよいし、分子相同性の検索にしても非連続エピトープも含めればすべての外来抗原候補を検討できるわけでもない。さらにたとえ自己抗原が免疫系に認識されるようになったきっかけが分子相同性であるとしても、その自己免疫反応の持続にむしろ全身性自己免疫疾患の問題点があるのかもしれない。

#### 第七節 今後の自己抗原研究の発展

自己抗原に関する研究はその同定とB細胞応答の解析に始まり、最近では自己抗原反応性T細胞の検討へと進み始めた。現在のところこうした自己抗原への免疫反応が全身性自己免疫疾患の病態形成にどのような役割を果たしているかは明確でない。

多発性硬化症や自己免疫性糖尿病などの臓器特異的自己免疫疾患では、それぞれ、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスあるいはNODマウスといった動物モデルを使用して、自己抗原に対する免疫反応が検討されてきた。そして自己抗原の投与だけでなく、自己抗原特異的なT細胞クローンの移入によって、その病気をひき起こせることが知られている。従って、臓器特異的な自己免疫疾患の病態では、自己抗原反応性T細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。さらにこうした病原性T細胞のV領域ペプチドを使ったT細胞ワクチネーション、またはT細胞エピトープのアンタゴニストアナログペプチドによるクローン麻痺導入、自己抗原による経口減感作療法などの新しい免疫療法が検討されている。こうした自己抗原特異的な免疫療法は、現在のステロイド剤やサイクロスポリンなどの免疫系全体を抑制するような治療法に比べて、より副作用の少ない治療法であることが期待されている。

これに対して全身性自己免疫疾患ではこのような自己抗原に対する免疫学的異常が、病態形成に重要な役割を果たしているのかは未だ不明である。核内分子に対する自己抗体の意義は、患者血清より精製した自己抗体のマウスへの移入実験などによって検討されたが(抗DNA抗体の腎病変形成への寄与を例外として)、直接病態形成に大きな役割を果たしていないのではないかの考え方が有力である。今後全身性自己免疫疾患における新しい抗原特異的免疫制御療法の可能性を検討していくには、自己抗原に対する免疫反応をB細胞に限らず解析していく必要があるであろう。

#### 第八節 結語

以上、自己抗体とその標的分子並びに自己高値産生機序に関する概説を試みた。すでに完成した病像の全身性自己免疫疾患患者体内では抗原特異的に自己免疫反応が起こっている。免疫系に全般的な異常があるにしてもどのようにしてこのような抗原特異的な反応につながるのか、また抗原特異的自己免疫反応が自己免疫疾患の病像形成の上でどのような役割をはたしているか今後検討されるべき課題であろう。

## 本論

### 第一章 U1snRNP-C蛋白のcDNAクローニング及びエピトープマッピング

#### 第一節 緒言

SLEやMCTDで出現する抗nRNP抗体は主にU1snRNPを認識している。U1snRNPはU1snRNAにU1snRNP特異的な70K, A, Cの各蛋白及びUsnRNP複合体共通のSm蛋白群であるB/B', D, E, F, G, Hの各蛋白が結合してできた核酸蛋白複合体である。このU1snRNP核酸蛋白複合体はU1, U2, U4/5/6などのUsnRNP群として他の非RNPと一緒にスプライソゾームを構成しmRNAスプライシングという重要な機能に関与している(40)。従ってこれらの分子を認識する自己抗体は基礎生物学者達にとって、その遺伝子クローニングや機能の解析に重要な武器となってきた。

序論でも述べたように、自己抗体産生機序を解明する道筋のひとつとして、自己免疫疾患患者体内の自己抗原に対する免疫応答の様式を解析することが重要である。抗nRNP抗体は主にU1snRNPの70K, A, C蛋白を認識している。そこでこのU1snRNP-C蛋白に対する免疫応答を解析を目的としてU1-C自己抗原のB細胞エピトープ領域の決定を行った。そしてこのエピトープを通じた分子相同性が自己抗体産生に関連し得るかを検討した。

#### 第二節 材料と方法

##### 患者血清

東京大学医学部附属病院物療内科で集められた、それぞれ厚生省班会議及びアメリカリウマチ学会の診断基準に基づき診断を下したMCTDとSLE患者血清を選び出し使用した。

抗nRNP抗体陽性であることはHeLa細胞を用いた蛍光抗体法、及びウサギ胸腺抽出物と標準血清を用いた二重拡散法にて確認した。

##### U1-C蛋白全長発現プラスミド及びU1-C蛋白削除変異株の作成

U1-C蛋白全長を規定するcDNAクローンを単離する為に、U1-C部分を規定するcDNA, PS2を用いてヒト繊維芽細胞及び包皮上皮細胞から作成されたpCDプラスミドライブラリーを通常の方法でスクリーニングした(41)。得られた陽性クローンの0.7KbpのcDNAインサート(FS2)の蛋白読み枠の塩基配列はオランダのグループが報告したU1-Cの全長cDNAと同じであり、このFS2はU1-C全長を規定するクローンと判明した。このFS2 cDNAをpED

プラスミドベクターに組み込み、FS2EDと名づけた。pEDプラスミドベクターはpEXプラスミドベクターのクローニングサイトにSacI, KpaI, Sal I, BanHI, SmaI, XbaIを組み込んだものである。

Heikoff とPutney の方法に習い、FS2 の3' 末端からエクソヌクレアーゼIIIを用いて詳細に削った、削除変異株を作成した(42, 43)。この変異株の中からU1-C全般にわたり分布するように9つの削除変異株M1-M9を選び出した。

エピトープ領域だけを規定するエピトープ発現株はPCR法、または合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、クロー酵素で二本鎖にすることにより作成した二本鎖cDNAを発現ベクターpEXに組み込んだ(44)。すべてのエピトープ発現株は塩基配列決定により正しい配列と読み枠を保持していることを確認した。

#### DNA塩基配列決定

塩基配列は<sup>35</sup>S-dATPとシークエネースキット2.0を用いて決定した(45)。

#### 免疫ブロッティング

Towbinらの方法に基づいてイムノブロットを行った(46)。即ちHeLa細胞抽出物あるいは大腸菌リコンビナント蛋白を8%アクリルアミドSDSゲルに展開し、ニトロセルロース膜に電気的に転写した。転写ニトロセルロースは1%スキムミルク入りPBSで40分間ブロッティング後0.5% Tween PBSで洗浄した後、1%スキムミルクPBSで希釈した患者血清または精製抗体で室温にて一時間インキュベートした。この結合した抗体は、ウサギ抗ヒトイムノグロブリン抗体(5  $\mu$ g/ml)とペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG抗体(5  $\mu$ g/ml)にて発色させた。

#### 発現蛋白の精製

発現ベクターpEXやpEDに組み込んだcDNAは大腸菌内で42℃で熱ショックをかけることと $\beta$ -ガラクトシダーゼとの融合蛋白を産生する(44)。Luria-Bertani (LB)培地で蛋白を誘導した大腸菌を集めた後超音波粉砕、DNase I処理し50mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5% Triton X 100 10mM EDTAで2回洗浄した。この沈殿物を8M尿素、10mM DTT PBSで可溶化した。

#### ペプチドの合成

ペプチドはペプチド合成機 (Applied Biosystems) を用いて合成され、逆相HPLC C18 カラムで精製した。

#### ELISA

96穴プレートに、リコンビナント蛋白あるいは合成ペプチドをpH 9.7の炭酸緩衝液で固相化し、スキムミルクまたはBSAでブロッキングした後、適当な希釈した患者血清を各穴にいった。結合した抗体はペルオキシターゼ結合プロテインGとフェニルジアミンで発色させた。吸光度は492 nmで測定した。リコンビナント蛋白を抗原にした場合は、インサートをもたないpEXが産生したガラクトシデアスを同様の方法で精製し、その蛋白に対する吸光度を目的の蛋白に対する吸光度から差し引いたものを表示した。

抑制試験では、抑制ペプチドと患者血清を2時間室温でインキュベートしてから、ELISAの系に加えた。患者血清中より抗体を精製するためにCNBr活性化セファロース4Bビーズにリコンビナント蛋白を規定のプロトコールに従い結合させた。このビーズに結合した患者血清を、0.2 Mグリシン塩酸 (pH 2.6) にて回収し、2Mトリスで中和した(47)。

#### 抗体の精製及び反応性の吸収

患者血清中の反応性の吸収は、ニトロセルロース膜に結合させたリコンビナント蛋白と4°C O/N及び2時間室温にて反応させた上清及び1回洗浄液を回収して、その反応性を検討した。

#### コンピューター解析

cDNAの塩基配列及びアミノ酸配列の外來抗原との相同性の解析は、SDC-GENETYXを用いて、EMBL及びNBRF、SWISS-PRТ データベースを検索した。

#### 第三節 結果

##### U1-C蛋白全長の発現

U1-C蛋白全長を規定するcDNAはヒト繊維芽細胞より作成したPCD cDNAライブラリー(岡山博士より供与を受けた)をU1-C蛋白の3'末側を規定する部分cDNAであるPS2クローンを用いてクローニングした(48)(図2)。この0.7 kbpのcDNAクローン(FS2)はオランダのグループがとったU1-C蛋白全長を規定するcDNAクローンと蛋白規定領域の塩基配列が一致したので、このFS2クローンはU1-C蛋白全長を規定するcDNAと結論した

(49)。このFS2クローンを制限酵素認識部位(Nsp I, Stu I)を用いて $\beta$ ガラクトシデースとの融合蛋白として挿入遺伝子を発現するpEX-3由来のpED-3ベクター(削除変異株を創出しやすいクローニングサイトに制限酵素認識部位を追加してある)に組み込んだ(pFS2ED)。この発現蛋白FS2EDはU1-C陽性患者血清でいずれも認識されU1-C蛋白の抗原性を発現していると考えられた(図3)。

#### エピトープマッピング

U1-C蛋白のB細胞エピトープを検討する為にU1-Cを規定するcDNAを3'末より削除した削除変異株のシリーズ(M1-M9)を作成した(図2)。これらの変異株が産生する蛋白を患者血清にて免疫染色すると、どの患者血清でもM1とM3の間で大きく抗原性が変化し、この領域にU1-C蛋白の主要な抗原性決定領域が存在することが示唆された。またこの大きな変化以外にも患者血清によってはM8とM9の間、M3とM4の間でも抗原性が変化し、これらの部位にもエピトープが存在することが示唆された(図3)(表4)。

PCRC領域が主要エピトープ領域である。

M1とM3の間のM2はこの中間の反応性を示すことから、この主要エピトープと想定される領域は少なくとも二つのエピトープに分けられる。そこでこの主要エピトープと想定される領域全体とその領域を三つに分けて発現させた(PCRC, ACE1-3)(図2)。PCRCは免疫染色にて抗U1-C抗体陽性血清全例にFS2と同じくらいの強さで認識され、PCRC領域は独立した強い抗原性をもつことが確認された(図3)。このPCRC領域が主要エピトープであることを確認するためPCRCによる吸収試験を行った。PCRCはFS2と同じかそれ以上に抗U1-C抗体活性を吸収した(図4)。以上よりPCRC領域がU1-C蛋白の患者血清全例にて主要エピトープであることが判明した。

主要エピトープはエピトープの巣状の集合である。

ACE1, ACE2, ACE3は免疫染色にて抗原性をもつことを確認しさらに各患者血清による抗原性の強さの違いをELISAにて検討した(図5)。ACE1, ACE2, ACE3はいずれも殆どの患者血清に認識されるが、それぞれの患者血清間で認識強度のパターンは異なった。ACE1, ACE2, ACE3はそれぞれ、殆どの患者血清によって認識される独立したエピトープであることが確認された。

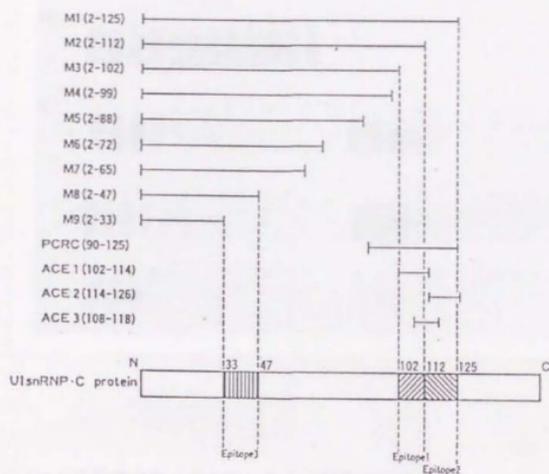


図2 U1snRNP-C蛋白上のB細胞エピトープ及びエピトープマッピングに用いた  
 コンストラクト

M1-M9は、U1-C全長を規定するFS2の3末端から削った削除変異株である。PCRC, ACE1, ACE2, ACE3はエピトープ領域だけを規定するエピトープ発現株である。各コンストラクトに記された数字はそれぞれが規定するU1-Cのアミノ酸残基である。

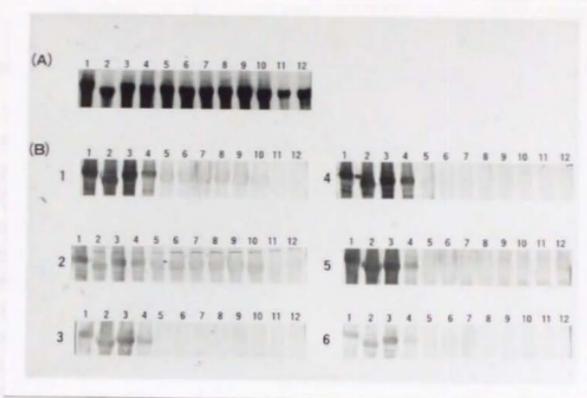


図3 U1-C変異株の産生する融合蛋白の代表的免疫染色

大腸菌にて発現させたリコンビナント蛋白を8% ポリアクリルアミドSDS ゲルにて泳動しニトロセルロース膜に電氣的に転写した。(A)クマシーブリリアントブルー染色 (B) 6人の患者血清による免疫染色。患者血清1は1:10000希釈で、それ以外の患者血清は 1:1000希釈で、レーン1は陽性コントロールとしてFS2ED、レーン2はPCR、レーン 3-11は M1-M9、レーン12は陰性コントロールとしてpED産生融合蛋白を负荷した。

No.	patient	FS2	PCRC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	pEX
1	Y.S.	3+	2+	3+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	---	---
2	M.F.	3+	2+	3+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	---	---
3	K.K.	2+	3+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	---	---
4	S.M.	2+	2+	2+	1+	---	---	---	---	---	---	---	---
5	H.F.	3+	3+	3+	2+	---	---	---	---	---	---	---	---
6	S.S.	2+	2+	2+	1+	---	---	---	---	---	---	---	---
7	S.T.	3+	3+	3+	1+	---	---	---	---	---	---	---	---
8	Y.K.	2+	2+	2+	1+	---	---	---	---	---	---	---	---
9	Y.Y.	2+	2+	2+	1+	---	---	---	---	---	---	---	---
10	Y.T.	3+	N.D.	2+	1+	---	---	---	---	---	---	---	---
11	S.S.	2+	N.D.	2+	2+	---	---	---	---	---	---	---	---
12	Y.T.	3+	N.D.	3+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	---	---
13	Y.I.	3+	3+	3+	3+	1+	1+	---	---	---	---	---	---
14	Y.A.	2+	2+	2+	1+	1+	1+	---	---	---	---	---	---
15	Y.K.	2+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	---	---
16	K.K.	2+	2+	2+	---	---	---	---	---	---	---	---	---
17	S.N.	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	---	---

表4 変異株産生融合蛋白の免疫染色のまとめ

反応性の強さを-から3+で表示した。すべての患者血清でPCRCはFS2と同等あるいはそれ以上の抗原性を示した。どの患者血清でもM1とM3の間で大きく抗原性が変化し、この領域にU1-C蛋白の主要な抗原性決定領域が存在することが示唆される。またこの大きな変化以外にも患者血清によってはM8とM9の間、M3とM4の間でも抗原性が変化しており、これらの部位にもエピトープが存在することが示唆される。

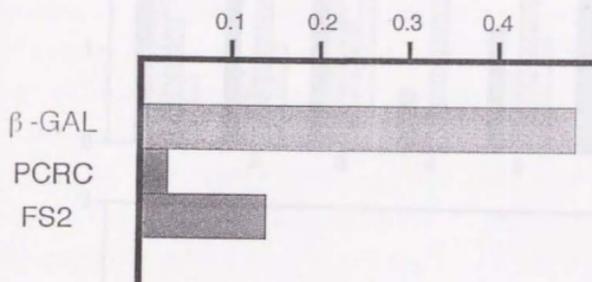


図4 PCRCによる患者血清の抗U1-C抗体活性の吸収

PCRC及びコントロールとして大腸菌産生 $\beta$ -ガラクトシデースとFS2を用いて患者血清の抗U1-C活性の吸収を行った。吸収後の血清の抗U1-C活性をELISAにて測定した。横軸の数字はOD。PCRCはFS2と同じかそれ以上に抗U1-C抗体活性を吸収した。

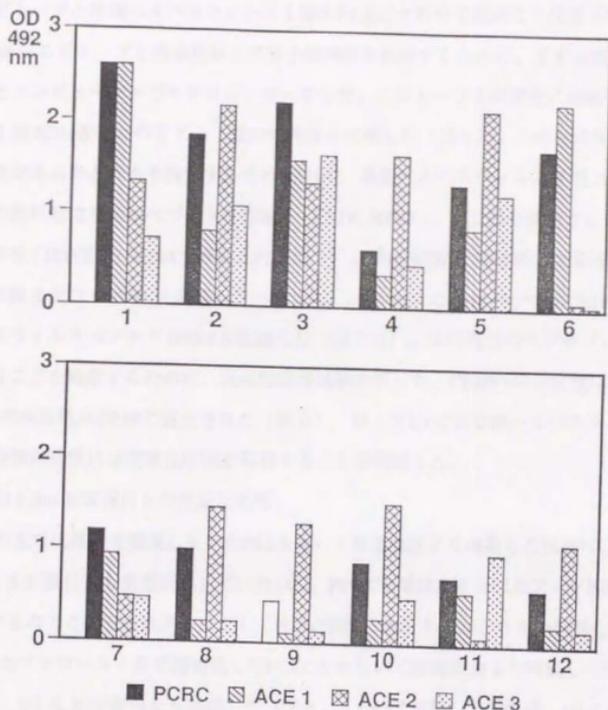


図5 各エピトープの抗原性

エピトープ部位だけを発現する変異株PCRC, ACE1, ACE2, ACE3が産生する融合蛋白をELISAにて患者血清(1-12)との反応性を検討した。患者血清は1:250倍希釈で使用した。縦軸に吸光度を示した。ACE1, ACE2, ACE3はそれぞれ殆どの患者血清に認識されるが、それぞれの患者血清間で違うパターンで反応する。ACE1, ACE2, ACE3はそれぞれ殆どの患者血清によって認識される独立したエピトープを発現していることが確認された。

主要エピトープと単純ヘルペスウイルス I 型 ICP4 蛋白との分子相同性と交差反応性

U1-C 蛋白エピトープと外来抗原との分子相同性を検討するために、まず主要エピトープ領域とコンピューターでホモロジーサーチした。エピトープ 1 の部分に単純ヘルペスウイルス I 型 ICP4 蛋白との 6 アミノ酸の相同性が判明した (図 6)。この相同な部位に共通抗原性があるかどうかを検討するため、U1-C、単純ヘルペスウイルス I 型 ICP4 蛋白それぞれの相同部位を含むペプチドを作成し (CE1P, HSVP)、また融合蛋白として大腸菌にて発現させ (HSVEX) ELISA で検討した (図 7)。抗 nRNP 抗体陽性患者血清はヘルペスウイルス融合蛋白 HSVEX を認識した (図 7 A)。また U1-C 相当ペプチド CE1P と同時にヘルペスウイルスペプチド HSVP も認識した (図 7 B)。この両者のペプチドに交差反応性があることを確認するために、反応性阻害試験を行った。CE1P への反応性は HSVP で、HSVP への反応性は CE1P で阻害された (図 8)。従って U1-C と単純ヘルペスウイルス ICP4 蛋白相同部位には交差反応性が存在することが判明した。

U1-C 蛋白と Sm-B/B' 蛋白との交差反応性

U1-C の主要抗原性を発現していた PS2 を用いて患者血清より精製した抗体は、U1-C だけでなく B/B' 蛋白にも交差反応していた (48)。PCRC 領域は B/B' と似たアミノ酸配列を保持しているのでこの交差反応がはたして PCRC 領域に由来するかどうかを検討した。PCRC をセファロース 4 B で固相化した PCRC をもちいて患者血清より精製した抗体は U1-C に加え、U1-A、B/B' 蛋白をも認識した (図 9)。FS2 で精製した抗体は、U1-C と B/B' を認識したが A 蛋白には反応しなかった。また ACE1、ACE2、ACE3 それぞれで精製した抗体では B/B' 蛋白への反応は観察できなかった。

#### 第四節 考察

U1-C 蛋白の 102-125 アミノ酸の領域は、抗 U1-C 抗体陽性患者血清全例で認識される主要な抗原性決定領域であることが判明した。またこの主要エピトープ以外にも患者血清によって反応性が異なる幾つかのエピトープが存在することが示唆された。さらにこの主要エピトープ領域も複数個のエピトープからなる、エピトープの巣状の集合体である。従ってこの領域に対して非常に強い免疫反応がおきていると考えられる。主要なエピトープとなっている領域が、数多くのエピトープの集合体であるという現象は、U1-68/70 K 蛋白でも

CE1P : <sup>102</sup>MPMMGPPPPGMMPVGP<sup>117</sup>

HSVP : <sup>316</sup>WPGAGPPPPGRVLYGG<sup>331</sup>

図6 U1-C主要エпитープと単純ヘルペスウィルス I 型ICP4蛋白との分子相同性領域  
U1-C主要エイトープ領域エイトープ1(106から111アミノ酸残基)の部分に単純ヘルペスウ  
ィルス I 型ICP4蛋白(320から325アミノ酸残基)との6アミノ酸の相同性が存在する。それ  
ぞれの相同領域を含むペプチドCE1P(U1-C蛋白102から117アミノ酸残基)及びHSVP(  
ICP4蛋白316から331アミノ酸残基)を合成した。下線部がHSVEXで発現しているポリペプ  
チド。

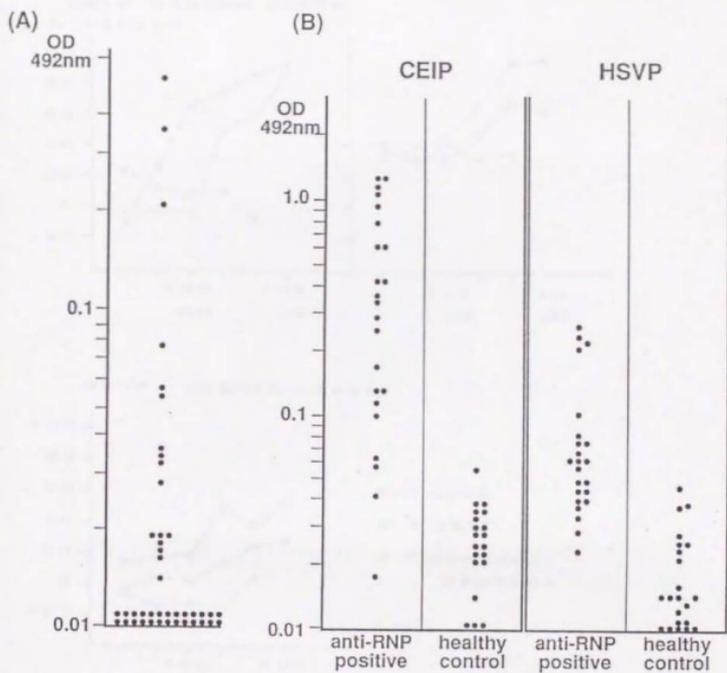


図7 抗nRNP抗体陽性患者血清陽性患者血清のヘルペスウイルスペプチドへの  
交差反応性

二種のヘルペスウイルスペプチド、(A) HSVEX融合蛋白 (B) CEIP 及びHSVP、に対する  
抗nRNP抗体陽性患者血清及び対照としての健常人血清の反応性をELISAで検討した。縦  
軸は吸光度を示す。抗nRNP抗体陽性患者血清の中には HSVEXに反応するものがあつた。  
また抗nRNP抗体陽性患者血清の中にはCEIPを、また同時に HSVPも認識した。

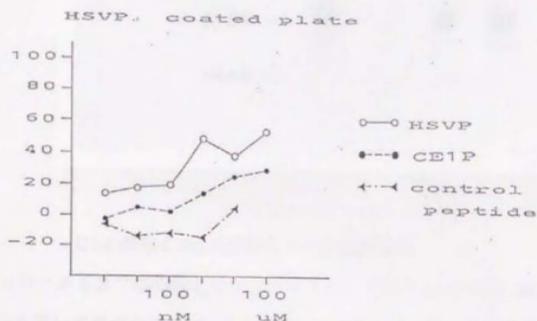
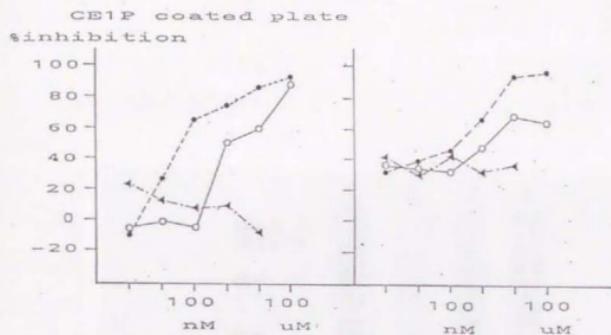


図8 CE1PとHSVPの交差反応性  
 (A) CE1Pへの反応性をHSVPが、(B)HSVPへの反応性をCE1Pが抑制するかを検討する為に、  
 1nMから100μMにそれぞれ濃度を変化させた競合ペプチド(横軸に示す)と患者血清を2  
 時間室温でインキュベートしてから、ELISAの系に加えた。(1)(2)はそれぞれ患者血清を  
 示す。無関係の対照ペプチドと比べ、CE1Pへの反応性の系ではHSVPを、HSVPへの反応  
 性の系ではCE1Pをそれぞれcompetitorとして用いた。いずれの系でもそれぞれ競合ペプチ  
 ド濃度依存性に反応性が阻止された。

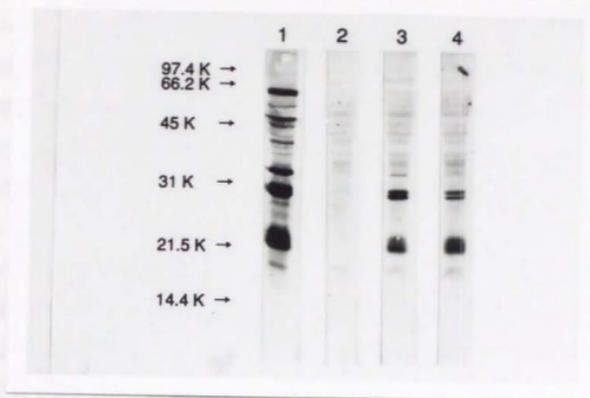


図9 U1-C蛋白とSm-B/B'蛋白との交差反応性  
セファロース 4 B で固相化した  $\beta$ -ガラクトシデース (レーン2), PCRC (レーン3), FS2 (レーン4) を用いて患者血清(Y.S.)より精製した抗体でポリアクリルアミドで電気泳動した HeLa細胞可溶化抽出物を染色した。対照として元の患者血清(Y.S.)(レーン1)を使用した。この血清は抗nRNP及び抗Sm活性を持つ。精製抗体はU1-Cに加えて、U1-B/B'及びU1-Aも認識した。

いられている (50)。

またこの主要エピトープ領域に単純ヘルペスウイルス I 型 ICP4 蛋白と 6 アミノ酸の分子  
相同性があり、実際にこの両者に交差反応性が存在することも判明した。

単純ヘルペスウイルス I 型 ICP4 ( $\alpha 4$ ) 蛋白は、単純ヘルペスウイルスの潜伏感染から増  
殖サイクルへの進出を調節している 175K の分子である (51)。I 型単純ヘルペスウイルス  
は宿主に潜伏感染しときおり増殖を繰り返すウイルスであり、この ICP4 蛋白は繰り返し宿  
主の免疫系を刺激している可能性は十分にある。実際に単純ヘルペスウイルス感染者でこ  
の ICP4 蛋白にたいする抗体が存在することは確認されているが (52)、その抗体が U1-C 蛋  
白との相同部位を認識するかまたその感染者血清に抗 U1-C 抗体が存在するかについては  
わかっていない。

またこの主要エピトープ領域は U1-C 蛋白と U1-A 蛋白、Sm-B/B' 蛋白との交差反応性を担  
っている領域であることも判明した。オランダのグループも U1-C 全体で精製した抗体が A  
と B/B' に交差反応することを報告している (37)。この領域以外に交差反応する部位がある  
ことを否定はできないが、PCRC 領域が U1-C の抗原性の大部分を担うことからやはりこの  
主要エピトープを通じた交差反応性の可能性が高いと考えられる。同様の snRNP 間での交  
差反応性は B/B' と U1-A、U1-A と U2-B' の間でも報告されており、いずれも snRNP 間のア  
ミノ酸配列の類似によると考えられている (36, 53)。この PCRC 領域に、U1-C と B/B' にも  
類似した配列があり、合成ペプチドをもちいた検討では交差反応が確認されている (54)。  
その配列に相当する ACE1 及び ACE3 を用いて精製した抗体で HeLa 細胞抽出物を免疫染色し  
た我々の検討では交差反応性を確認できなかった。従って免疫染色で確認できるような交  
差反応性は ACE1 や ACE3 より広い部分に依存している可能性がある。

以上の結果に基づいて自己抗体の出現過程を推定してみると、ヘルペスウイルスの持続  
感染があると個体ごとに異なる免疫反応のなかでさまざまな抗体が出現してくるが、その  
中に抗 ICP4 ( $\alpha 4$ ) 抗体も出現しうる。この抗 ICP4 ( $\alpha 4$ ) 抗体を認識する B 細胞が交差反応す  
る U1-C 蛋白をとりこみ、自己反応性 T 細胞を活性化することによって U1-C 抗原に対する  
免疫寛容が破られる。一度 U1-C 抗原に対して免疫寛容が破られると今度は U1-C 抗原と他  
の自己抗原との交差反応により U1-A や Sm-B/B' 抗原も免疫系に認識されていくという道筋

が考えられる。実際抗Sm抗体陽性患者血清は殆ど抗nRNP抗体陽性であり、抗nRNP抗体から抗Sm抗体へと進展するのではないかと考えられている (55)。

## 第二章 56K自己抗原のcDNAクローニングとB細胞応答の解析

### 第一節 緒言

SLEなどの全身性自己免疫疾患では多彩な自己抗体が出現することはよく知られているが、同様に全身性自己免疫疾患の一つとして考えられているRAでは、それほど多数の自己抗体は報告されていない。確立した自己抗体はリウマチ因子 (RF) やRA33くらいであり (56)、同じ自己免疫疾患でも自己抗体産生機序及び免疫寛容の破綻に違いがあるのではないかと推測される。抗56K抗体はこのRAなどの自己免疫患者血清中に出現する56Kの抗原を認識する自己抗体である (57, 58)。我々は、この自己抗体の対応抗原の性格づけを目的にcDNAクローンの単離をおこなった。このcDNAはウシのCa依存性リン脂質結合蛋白アネキシンXIと極めて相同性が高くヒトアネキシンXIと同定できた。このアネキシンはCa依存性リン脂質結合蛋白のファミリーを形成しているユニークな蛋白群であるが、その細胞内機能についてはつまびらかでない。そこでさらにこの抗56K自己抗体とアネキシンXIの分子構造との関連、またアネキシンXIの細胞内分布に解析を加えた。

### 第二節 材料と方法

#### 血清

患者血清はオランダ王国ナイメーヘン市、聖ラドボウド病院及び聖マルテンス病院のリウマチ科で診療した患者より採取された。患者の診断はアメリカリウマチ協会の診断基準に基づきそれぞれの主治医により下された。正常人血清は、オランダ王国アムステルダム市血液センターから供与された。

#### cDNAクローニング

5つの抗56K抗体陽性患者血清を混合し、1:500にPBSにて希釈して使用した。YoungとDavisの方法に基づきY1090感染λファージの $10^6$ のブラークをスクリーニングした (59)。IPTGと42℃の熱ショックで蛋白を誘導し、ニトロセルロース膜上にファージ群産生蛋白を結合させた。ニトロセルロース膜に結合したファージ蛋白を3% BSA, 0.5% Tween 20 PBSでブロッキングした後患者血清でインキュベートし、結合した抗体を $^{125}$ Iラベルヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体でオートラジオグラフィーにて検出した (60)。

## 削除変異株の作成

陽性クローンからEco RI 消化にて cDNA インサートを回収し pGEM-3 Zf (+) (Promega) に組み込み、このインサート cDNA の 3' 末端から第一章の如くエキソヌクレアーゼ III を用いて詳細に削った、削除変異株を作成した (42)。

## *in vitro* transcription 及び *in vitro* translation

鋳型 DNA を Hind III で線状化した後、T7 RNA polymerase で転写し、wheat germ extract (Amersham) を用いて  $^{35}\text{S}$  メチオニン存在下で翻訳した。

## 大腸菌での発現及び精製

56K 分子の抗原性を規定する cDNA を NcoI Bam HI で pET8c に組み込んだ (61)。IPTG で蛋白発現を誘導し、ベレットを 8M 尿素に溶解した (62)。

## 免疫染色

第一章と同様の方法で行った。即ち HeLa 細胞抽出物あるいは大腸菌リコンビナント蛋白を 10% アクリルアミド SDS ゲルに展開し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。転写ニトロールは 3% BSA -PBS で 40 分間ブロッキング後 0.5% Tween PBS で洗浄した後、1% スキムミルク PBS で希釈した患者血清または精製抗体で室温にて一時間インキュベートした。この結合した抗体は、ウサギ抗ヒト IgG 抗体 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) とペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) にて発色させた。

## 抗 56K 抗体のアフィニティー精製

第一章の如くにリコンビナント 56K/アネキシン XI をセファロース 4B で固相化し患者血清より抗 56K 抗体をアフィニティー精製した。

## 免疫沈降

10  $\mu\text{l}$  の 50% プロテイン A セファロースビーズと 10  $\mu\text{l}$  の患者または正常血清を 500  $\mu\text{l}$  の IPP500 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 0.1% Tween 20, 0.1% Nonidetp-40) で 1 時間インキュベーションした。このビーズを洗浄後、リコンビナント蛋白と、500  $\mu\text{l}$  の IPP 500 でインキュベートし、最後にビーズを洗浄後、SDS 試料液に溶かした。この試料は 12% SDS ポリアクリルアミドまたは、トリシン SDS ポリアクリルアミドにて展開した (63)。

## 蛍光抗体法

HEp-2 単層培養細胞を4% パラホルムアルデヒド入りPBS で15分固定し、0.1% TritonX-100 で5分間インキュベートして透過性にした。精製抗体、免疫ウサギ血清、免疫前ウサギ血清をPBS で希釈して、結合抗体を蛍光ラベルウサギ抗ヒトまたはブタ抗ウサギイムノグロブリン抗体で発色させた。

#### コンピューター解析

コンピューターによるホモロジーの検討にはFASTAプログラムを使用し、GenBank とEMBLデータベースを検索した。GCGグループのPepPlot プログラムを使用して蛋白構造の予測を行った。

#### ELISA

56K / アネキシンXI リコンビナント蛋白を0.1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で35mM  $\text{NaHCO}_3$ 、15mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9.6 の緩衝液中にて4°C O/N で固相化した。0.1% BSA 2時間室温インキュベーションし、ブロッキングを行い、10% ウサギ血清を含んだRIA (10mM Tris pH 7.6, 150mM NaCl, 0.3% sodium deoxycholate) で1:200 に希釈した患者血清または健常者血清で室温1時間インキュベーションした。結合抗体をペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒト抗体で発色させた。この時各アイソタイプを検出するために、抗IgG ( $\gamma$  鎖)、抗IgA ( $\alpha$  鎖)、抗IgM ( $\mu$  鎖) を使い、全てのクラスの免疫グロブリンを検出するために抗カッパ鎖、抗ラムダ鎖抗体を1:500 で用いた (64)。

他の自己抗原との抗原性を比較するために、同様の方法で発現、精製した、Ro 60、トポイソメラーゼI、CENP-B、アネキシンXI を0.2  $\mu\text{g/ml}$  で固相化した。患者血清を段階的に希釈し、吸光度1.0を示す血清の希釈度を抗体価とした。

#### 第三節 結果

##### cDNA クローンの単離

免疫ブロット上56K抗原にだけしかも強く反応する抗56K抗体陽性患者血清を5例選出し、この混合血清を用いて、ヒト奇形腫より作成した $\lambda$ gt11発現ライブラリーをスクリーニングした。3つの陽性クローン( $\lambda$ ZV5,  $\lambda$ ZV8,  $\lambda$ ZV53)が単離され、この3クローンのインサートはいずれも同じ2.0 kbpのcDNAであった。

$\lambda$ ZV5より回収したcDNA, ZV5は、56K蛋白全長を規定していることが明らかになった。

なぜなら 1) *in vitro* 翻訳物は、SDS-PAGE上でおよそ56Kであった。2) この生成物はいずれの抗56K抗体でも免疫沈降できた。3) このクローンを大腸菌にて発現させたりコンピナント蛋白を用いて精製した抗体はHeLa細胞抽出物中の56K蛋白を認識したからである(図10)。

#### 56K cDNAの核酸塩基配列決定

ZV5, ZV8, ZV53の塩基配列を決定するとこの3つのクローンはいずれも同じcDNAクローンであり、1992塩基で最長読み枠は1515塩基で505のアミノ酸を規定していた(図11)。この予測生成物の分子量は約54396Kで、目的の分子量に非常に近い。また5'側最初のメチオニンはコザックによる真核生物翻訳開始のコンセンサス配列に一致して存在していた(65)。3'側には7つのAが連続しているがこれはポリ(A)末尾由来と考えられる。5'側にはポリ(A)様配列が存在するが、これはcDNAライブラリー作成時の人為的問題と推測される。

#### 56K抗原はヒトアネキシンXIである

56Kの構造をコンピューター解析すると、かなり構造の異なる二つの部分からなっていることが判明した。アミノ末端195アミノ酸は非親水性で(4つしか荷電アミノ酸がない)、 $\alpha$ ヘリックスを形成しそうにない。カルボキシル末端の300アミノ酸は親水性で $\alpha$ ヘリックスを形成する可能性も高い。この56KcDNAをEMBL/GenBank™のデータベースでコンピューター検索すると、アネキシンと相溶性が高いことが判明した。このアネキシンはCa依存性リン脂質結合蛋白のファミリーであり、このアネキシンファミリーの蛋白はいずれも相同なカルボキシル末端側を保有しており、それぞれのアミノ末端側は異なっている(66, 67)。このカルボキシル末端側での各アネキシンメンバーと56Kとの相溶性は約60%くらいであった。なかでもこのcDNAはウシのCa依存性リン脂質結合蛋白アネキシンXIと極めて相溶性が高いことが判明した(68)。即ちアネキシンメンバー間でかなり異なるアミノ末端側でも非常に類似しており、全体のアミノ酸レヴェルで92.5%の相溶性が明らかになった。またウサギよりカルサイクリン結合蛋白としてクローニングされ、後にウサギアネキシンXIと同定されたCAP-50ともよく似ており(69)、この56Kはアネキシンファミリーに属するヒトアネキシンXIと同定できた(図12)。

#### 56K/アネキシンXIの細胞内分布

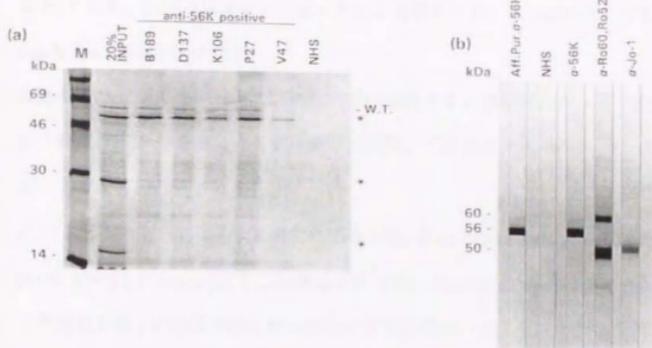


図10 cDNAクローンZV5は56K抗原を規定している。

(A) ZV5 cDNAを *in vitro* で翻訳したポリペプチドを抗56K抗体陽性患者血清にて免疫沈降を行い、沈降物をSDS-PAGEにて泳動した。(左から右に) 分子量マーカー、負荷量の20%、5つの抗56K抗体陽性患者血清 (B189, D137, K106, P27, V47) 並びにコントロールとして健常人血清 (NHS) による免疫沈降物である。全長56KポリペプチドをW.T.で表示した。\*の位置(分子量概ね50, 28, 17 kDa)は内部メチオニンからの翻訳開始物と考えられる。

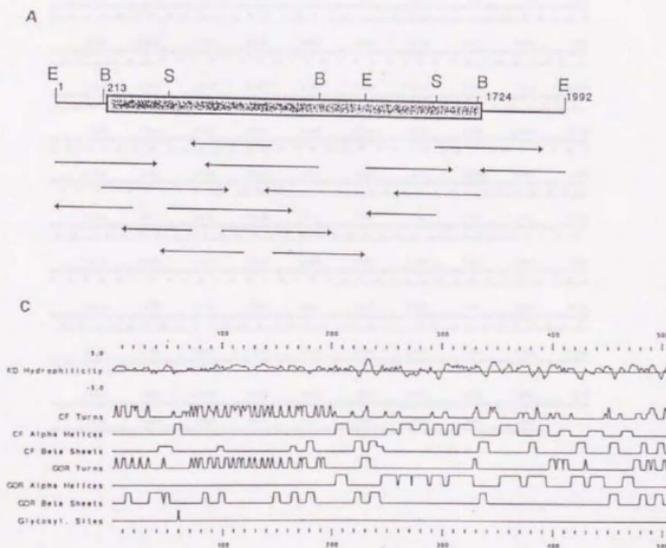
(B) リコンビナントZV5を用いて抗56K抗体陽性患者血清 (K106) から精製した抗体はHeLa細胞細胞質分画中の56K抗原を認識している。 $\alpha$ -56Kはポジティブコントロールとして元の患者血清(K106)を、またネガティブコントロールとして健常人血清 (NHS) を使用した。他の50-60 kDaの自己抗原と56K抗原の異同を明確にするために、抗Ro60, Ro52, La抗体 ( $\alpha$  Ro60, Ro52, La) と抗Jo-1抗体 ( $\alpha$  Jo-1) の血清による免疫染色も示した。

図11 56K cDNA の構造

A. 56K ZV5 cDNA クローンのシェーマ。黒塗りボックスは蛋白読み枠 (213から1724塩基)である。矢印は塩基配列決定の方向と領域を示す。E, B, SはそれぞれEco RI, Bgl II, Sph I認識部位を表す。

B. 56K ZV5 cDNA クローンの塩基配列及び演繹アミノ酸配列。\*\*\*で表される部分が終始コドンである。#は糖修飾可能部位。下線部はアネキシン-コンセンサス-リピートで4回繰り返される。

C. コンピューターによる56K蛋白の構造予測。KyteとDoolittleによる親水性の予測(KD)、ChouとFasmanによる二次構造予測(CF)、GamierとOsguthorpeとRobsonによる二次構造予測(GOR)及び糖付加修飾部位予測を図示した。上下の数字はアミノ酸残基。





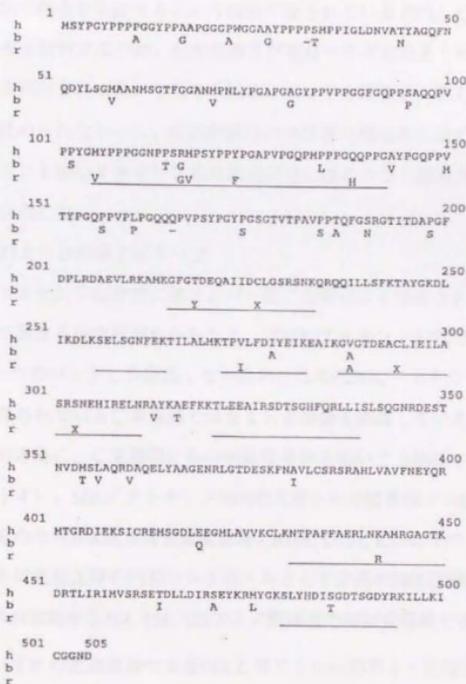


図12 ヒト、ウシ、ウサギアネキシンXIアミノ酸配列の比較

ウシ(b)ウサギ(r)(CAP-50)アネキシンXIIはヒト(h)アネキシンXIと異なる配列のみ表示した。ウサギアネキシンXIIは発表されている部分のみを示した。Xは決定できなかったアミノ酸残基である。アミノ酸残基の数字はヒトのものに準じた。ウシアネキシンXIIはアイソフォームAを示した。

アネキシンは、そのリン脂質と結合するという性格から細胞膜周囲に存在すると考えられてきた。しかし最近集積しつつある知見では、細胞内或いは核内にも存在するという報告がある。ウサギアネキシンXI (CAP-50) では、ネズミ胎児繊維芽細胞 (3Y1細胞) を用いて分裂期にループ状の構造を形成するという報告がなされている (70)。そこでヒトアネキシンXIの細胞内分布を検討するため、患者血清及び免疫ウサギ血清よりの精製抗体を用いて蛍光抗体法による検討を行った。どちらの抗体によっても細胞質、核どちらも染色された。核小体の染色は認められなかった。分裂期細胞には特有の構造物を認められなかった (図13)。以上よりヒト56K/アネキシンXIは細胞周期に関わりなく細胞内に広く分布する分子であることが判明した。

#### 56K/アネキシンXI上のB細胞エピトープ

前述のようにアネキシンは非常に各メンバー間で非常によく保存されたC末端側と、メンバーそれぞれで異なるN末端側とからなる。抗56K/アネキシンXI抗体は、免疫プロット上では、56Kの一つのバンドしか認識しないため、この抗56K/アネキシンXI抗体はアネキシン間でよく保存されているC末端側ではなくN末端側を認識していることが予想される。このことを確かめる為に、C末端側からの削除変異株を用いてB細胞エピトープマッピングを行った (図14)。56K/アネキシンXIのC末端側からの変異株5つを選び出し *in vitro* で転写、翻訳したものを抗56K抗体陽性患者血清 (B189, D137, K106, P27, V47) を用いて免疫沈降した。さらに免疫沈降の内部コントロールとして全長の56Kの翻訳物 (W.T.) を使用した。それぞれN末端から314, 191, 123アミノ酸残基の削除変異株である  $\Delta C_{314}$ 、 $\Delta C_{191}$ 、 $\Delta C_{123}$  はいずれの患者血清で全長56Kと同じくらい効率よく免疫沈降された。しかしN末端から49アミノ酸残基の削除変異株である  $\Delta C_{49}$  ではV47のみが反応し、さらにN末端から32アミノ酸残基の  $\Delta C_{32}$  削除変異株ではすべての血清が反応しなくなった。56K全長を翻訳した際、おそらく内部メチオニンからの翻訳開始によると思われるより短い翻訳物が観察でき (だいたい 50, 28, 17kDa くらいの大きさ)、いわばN末端側からの削除変異株に相当するが、これらの翻訳物は患者血清により認識されない (図10)。特に50kDaのものはおそらく61番あるいは70番目からの翻訳開始と推定できる。以上より、抗

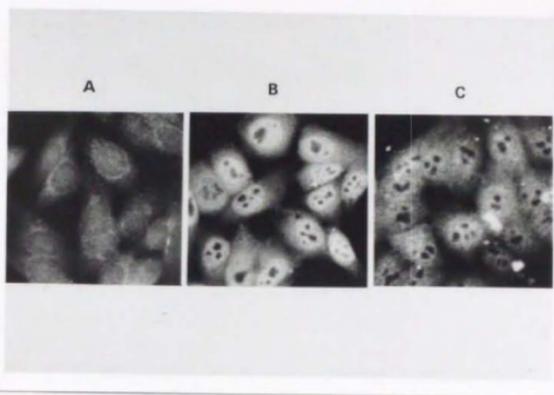


図 13 56K / アネキシンXIの細胞内局在

固定されたHEp-2細胞を(A) 免疫前のウサギ血清(1:50希釈) (B) リコンビナント56K / アネキシンXIで免疫したウサギ血清(1:50希釈) (C)患者血清K106より精製した抗体(元の血清の1:20希釈相当)。結合した抗体を蛍光イソシアネート標識二次抗体で検出した。



図 1 4 56K/アネキシンXIの削除変異体の免疫沈降パターン

56K/アネキシンXIのC末端からの変異株5つを選び出し*in vitro*で転写、翻訳したものを抗56K抗体陽性患者血清(B189, D137, K106, P27, V47)を用いて免疫沈降した。陰性コントロールとして健常人血清(NHS)を用いた。また陽性コントロールとして加えた翻訳ポリペプチドの20%をゲルに流した。Mはマーカー蛋白である。さらに免疫沈降の内部コントロールとして全長の56Kの翻訳物(W.T.)を使用した。 $\Delta C_{314}$ 、 $\Delta C_{191}$ 、 $\Delta C_{123}$ 、 $\Delta C_{49}$ 、 $\Delta C_{32}$ はそれぞれN末端から314, 191, 123, 49, 32アミノ酸残基の削除変異株である。

56K/アネキシンXI自己抗体のB細胞エピトープの発現には、N末端より123アミノ酸が必須であり、この部分は少なくとも二つのエピトープに分かれる。そしてもしこのエピトープが短いポリペプチドからなる連続性エピトープにちかものであるならば、32番から70番の間にある可能性が強い。

#### 抗56K/アネキシンXI抗体の疾患における分布

抗56K/アネキシンXI抗体は、RAやSLEの患者血清で観察されていたが、はたして疾患特異性があるのかどうかをELISAで検討した。まずELISAにおけるバックグラウンドを決定するために正常人血清を解析した(図15)。144例中2例が高値であったが(1.4%)、この2例は非常に高力価の抗体で免疫プロットでも陽性を示すので、この2例をのぞいた142例からバックグラウンド値を算出した。この数字に基づきさまざまな全身性自己免疫疾患における陽性率を検討した。慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、全身性硬化症、シェーグレン症候群で6.7-10.1%の陽性率であった。レイノー症候群のみでは4.1%であった(表5)。従って抗56K/アネキシンXI抗体はRAやSLEに特徴的とはいえずさまざまな全身性自己免疫疾患で出現することが明らかになった。

正常人では稀ではあってもこの抗56K/アネキシンXI抗体は全身性自己免疫疾患で広く出現する。従って、慢性に経過する炎症性疾患や感染症など多クローン性高ガンマグロブリン血症でも陽性になる可能性があるので、EBウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘ヘルペスウイルス、トレポネーマパリドゥム、マイコプラズマ感染者血清を解析した。検討した血清数が少ないが、これらの感染者でも抗56K/アネキシンXI抗体は稀ではあった。従って抗56K/アネキシンXI抗体の出現は全身性自己免疫疾患に限られている可能性が強い。

#### 抗56K/アネキシンXI抗体のアイソタイプ及び力価

全身性自己免疫疾患で広く出現する自己抗体は例えばIgM型リウマチ因子や抗ssDNA抗体などはIgM型の自己抗体であり、抗原特異性も明確でなく、これらはIgM抗体の多特異性(polyreactivity)を反映した自己抗体であると考えられている。また高ミトコンドリア抗体や抗トポイソメラーゼI抗体ではIgG型とIgA型の自己抗体でエピトープが異なり、病因への関与のしかたが異なるのではないかという報告もある(64, 71)。そこで抗56K/アネ

キシンXI抗体がどのような自己抗体であるかを検討するために、そのアイソタイプの解析、さらに疾患特異的で診断的価値の確立されている他の代表的自己抗体との力価の比較を行った。アイソタイプは、すべての患者血清でIgG型が優位であった(図16)。正常人で抗56K/アネキシンXI抗体は陽性であった2例でもIgG型であった。この56K/アネキシンXIと同様の方法で大腸菌での発現及び精製を行った代表的リコンビナント自己抗原SS-A/Ro, CENP-B, トポイソメラーゼIに対するそれぞれの陽性血清の力価を決定すると、抗56K/アネキシンXI抗体はこれらの疾患特異的抗体と同じかそれ以上の力価で産生されていることが判明した(図17)(表6)。

#### 第四節 考案

抗56K抗体で認識される56Kの分子はアネキシンXIであることが判明した。アネキシンXIはカルシウム依存性リン脂質結合蛋白群を構成するアネキシンファミリーに属する。このアネキシンファミリーは現在まで13のアネキシンが見いだされている。このアネキシンはメンバー間で非常によく保存されているC末端側とメンバーそれぞれで異なるN末端側とからなるのが特徴的である。カルシウム依存性にリン脂質と結合する能力はこのC末端領域が保持しており、N末端領域は従ってそれぞれのアネキシンメンバーが固有の機能を果たすのに重要だと考えられている。

アネキシンの中には他の分子と結合するものがある。例えばアネキシンIIはp11という11Kdの蛋白と2個ずつ会合しあい四量体を形成することが判っている(72)。このp11という分子は別のカルシウム結合蛋白群であるS100ファミリーに属する。またやはりこのS100ファミリーに属するカルサイクリンがアネキシンXIと結合することも報告されている。細胞内分布については、細胞質及び細胞膜に存在するとされているが、アネキシンVのように核にも存在することが報告されるようになってきた。ウサギアネキシンXI(CAP-50)では、ネズミ胎児繊維芽細胞(3Y1細胞)を用いて分裂期にループ状の構造を形成するという報告がなされているが(70)、しかしHEp-2を用いた我々の検討では確認できなかった。従ってアネキシンXIが、細胞分裂時に特定の分子と関係するかどうかについては未だ不明である。

アネキシンが果たして生体内でどのような役割をはたしているかについては、抗凝血作

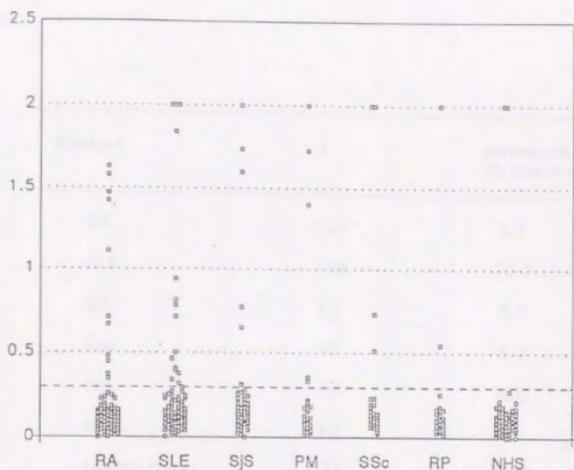


図15 全身性自己免疫疾患における抗56K/アネキシンX1抗体陽性率

慢性関節リウマチ(RA), 全身性エリテマトーデス(SLE), シェーグレン症候群(SjS), 多発性筋炎(PM), 汎発性強皮症(SSc), レイノー症候群(RP)といった全身性自己免疫疾患患者血清を1:200希釈でELISAを行った。対照として健常人血清(NHS)を使用した。縦軸に吸光度を表示した。破線は $OD_{450}$ で0.285を示し、これはバックグラウンド平均(0.099)の標準偏差(0.062)三倍上(3SD)に相当し、これ以下を陰性とした。

disease†	n	prevalence (% positive sera)
RA	136	8.1
SLE	149	10.1
SjS	89	6.7
SSc	50	8.0
PM	50	10.0
RP	49	4.1
healthy human controls	144	1.45

表5 各種全身性自己免疫疾患における抗56K/アネキシンXI抗体陽性率

図15の結果をまとめた。

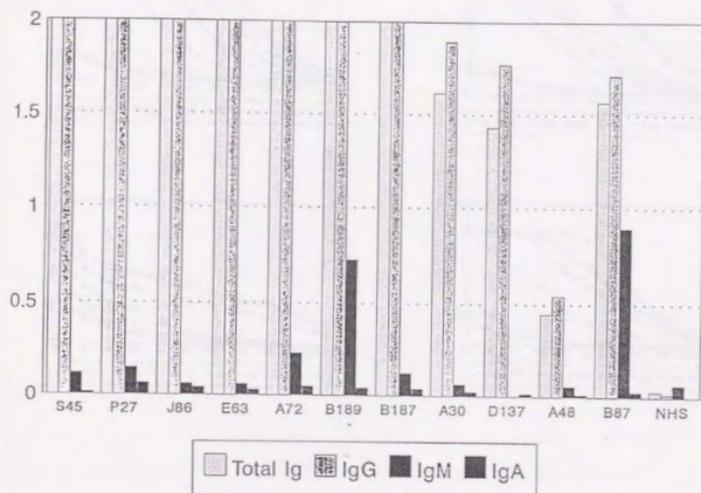


図 16 抗56K/アネキシンXI抗体の免疫グロブリンアイソタイプ

アイソタイプ特異的の抗体を二次抗体に使用し、抗56K/アネキシンXI抗体陽性患者血清を用いて56K/アネキシンXIに対する反応をELISAで解析した。

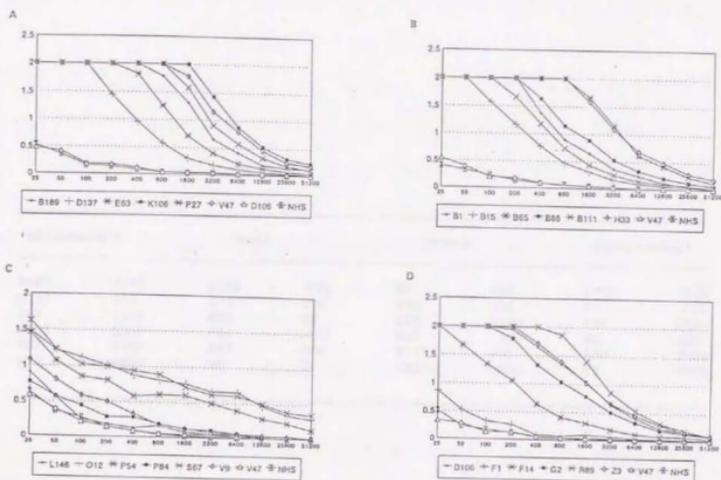


図 1 7 抗56K/アネキシンXI抗体価と他の代表的自己抗体の抗体価の比較

同じ方法で精製されたリコンビナント自己抗原に対するB細胞反応の強さを比較するために、それぞれの抗原に対する自己抗体抗体価の高い患者血清を選び出し、段階的に希釈してELISAを行った。A. 56K/アネキシンXI、B. CENP-B、C. Ro60、D. トポイソメラーゼIを抗原として使用した。ネガティブコントロールとして健康人血清とその自己抗体を含まない血清 (AではD106、B、C、DではV47)を使用した。

	56K/annexin XI		Ro60		CENP-B		topoisomerase I
B187	2240	L146	<25	B1	650	D106	1600
D137	400	O12	200	B15	300	F1	<25
E63	1120	P54	60	B65	3800	F14	200
K106	5300	P84	<25	B86	1150	G2	800
P27	3100	S67	200	B111	600	R89	2600
V47	4400	V9	30	H33	3800	Z3	1600

表6 抗56K/アネキシンXI抗体価と他の代表的自己抗体の抗体価の比較

図16の結果をまとめた。OD<sub>450</sub>が1.0を示す血清の希釈倍率の逆数を抗体価とした。

用、開口分泌、細胞内骨格、エンドサイトーシス、フォスホリパーゼA2阻害、Z型DNAとの結合などが提唱されている(66, 67, 73)。しかし報告されている多くの作用はカルシウム依存性にリン脂質と結合する性質に基づいておりそのアネキシン固有のものといえず、未だに一定の見解はない。

またアネキシンの中にはアイソフォームが見出されているものもあり、ウシアネキシンXIでも選択的スプライシングにより生じるA, B二つのアイソフォームがあり、全体の長さは2アミノ酸しか違わないが、N末端より21から60アミノ酸の部分が異なる(74)。ウシではタイプAの方が多いとされている。我々がクローニングしたヒトアネキシンXIIはこのタイプAのホモログと考えられる。ヒトにもこのタイプBが存在するのか、また互いの異なる部分はウサギアネキシンXIでの検討に基づいて推測するとカルサイクリンとの結合部分なので、タイプBはカルサイクリンと結合しないのか、さらに抗56K/アネキシンXI抗体の認識エピトープともかさ重なっているので抗56K/アネキシンXI抗体はタイプAのみを認識するのか、などの問題が提起されるであろう。

今までもアネキシンに対する自己抗体の報告はあり、アネキシンI及びアネキシンIIに対するものが知られている(75, 76)。しかしこの自己抗体は、IgM型であり、またアネキシン同士で交差反応しているので低親和性のアネキシン相同領域に向けられた自己抗体である可能性が高い。その点この抗56K/アネキシンXI抗体は他のアネキシン蛋白と相同なC末端側でなくアネキシンXI固有のN末端を認識し、またRA, SLEに限らず自己免疫疾患全体で広く8-10%出現するものの高親和性高力価のIgG型の抗体である。本研究で力価を比較したSS-A/Ro, CENP-B, トポイソメラーゼIなどの自己抗原に対しては高力価で高親和性の自己抗体が産生されており(77, 78, 79)、antigen-drivenの機構が働いていると考えられている。従ってアネキシンXIIに対する特異的免疫応答もこれらの自己免疫疾患でおきている可能性が高い。全身性自己免疫疾患では、特にSLEに代表されるように様々な全身性の自己抗原に対して免疫寛容が破綻していると考えられている。しかしRAではこのような例とは違い、リウマチ因子やRA-33自己抗原などは知られているが、高力価高親和性の自己抗体の報告は少なくその意味でも抗56K/アネキシンXI抗体は注目される。

抗56K/アネキシンXI抗体は広い疾患スペクトルで出現しているが、例えばRAがそれぞ

れ他の疾患と合併しているわけではなく（レイノー症候群は他の疾患で合併することはあっても検討したRPは他の疾患を合併していないものを選び出した）やはり全身性自己免疫疾患全般にわたって出現しているのであろう。混合性結合組織病(MCTD)でも出現するかどうかは興味深いところである。

どのような機序でこの抗56K/アネキシンXI抗体が出現しうるのか推測は難しい。我々の検討の結果からは慢性に経過する単なる多クローン性B細胞活性化だけでは出現しないことが判明している。また出現の意義も不明である。アネキシンの中にはウィルスの細胞膜レセプターとして働くのではないかとされているものもある。従ってウィルスのハプテーンキャリアーの関係あるいはイデオタイプ（インターナルイメージ）とし出現する可能性があるが、我々のウィルス感染患者血清を用いての検討では特に抗56K/アネキシンXI抗体は検出できなかったので、少なくとも調べた範囲内のウィルスには関係がなからう。アネキシンに対する自己抗体が炎症を鎮める働きのあるリポコルチンの作用を阻害することが、炎症の増悪に意味があるのではないかという説がある(80, 81)。アネキシンファミリーはリン脂質結合蛋白であり、抗凝固作用をもつことから抗リン脂質抗体症候群との関連が考えられている。なかでもアネキシンVが抗リン脂質抗体のコファクターとして注目されている。 $\beta_2$ グリオブリンIも抗リン脂質抗体のコファクターとして知られているがそれ自身に対する自己抗体もあるらしい。アネキシンV自体が自己抗原となっているかは不明であるが、少なくとも抗56K/アネキシンXI抗体はアネキシンVと交差反応しないので、アネキシンVからの交差反応ではない。アネキシンXIが抗リン脂質抗体のコファクターである可能性を検討したが、予備的な実験では否定的であった。またB細胞でアポトーシスの進行によるフォスファチジルセリンが細胞表面にあらわれてくるが、これに伴いアネキシンVが表面に出現してくるという報告がある(82)。アネキシンXIでも同様の現象がみられるのか興味深い。今後アネキシンXIの本当の細胞内機能の追求と併せて検討されるべき課題であろう。

謝辞

東京大学医学部内科物理療法学教室にて研究する機会をお与え頂いた物療内科教授伊藤幸治教授、宮本昭正名誉教授に深謝いたします。本研究をまとめるにあたり終始ご指導戴きました九州大学生体防御医学研究所臨床免疫学部門山本一彦教授、56K自己抗原の研究に際し多大のご援助を頂いたオランダ王国ナイメーヘン大学理学部生化学教室 van Venrooij教授に深謝いたします。実験を進めるにあたり御協力頂いた多くの方々、特に東京大学医学部物療内科の一條弘子氏、三菱油化BCLの三浦比斗志氏、オランダ王国ナイメーヘン大学理学部生化学教室 Pruijn 博士、そして本論文を作成するのに協力してくれた妻成子に感謝いたします。

文献

1. 三崎義堅 : 自己抗原とB細胞応答. 1994 分子レベルの自己免疫疾患 (山本一彦編集) p62-79. 中外医学社.
2. Tan, E.M. 1989. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv. Immunol* 44:93-151.
3. Tan, E.M. 1991. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67:841-842.
4. Lanzavecchia, A. 1990. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol* 8:773-793.
5. Strasser, A., S. Whittingham, D.L. Vaux, M.L. Bath, J.M. Adams, S. Cory, and A.W. Harris. 1991. Enforced BCL2 Expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8661-8665.
6. Goldman, M., P. Druet, and E. Gleichmann. 1991. TH2 cells in systemic autoimmunity : insights from allogenic diseases and chemically induced autoimmunity. *Immunol Today* 12:223-227.
7. Wen, L., S.J. Roberts, J.L. Viney, F.S. Wong, C. Mallick, R.C. Findly, Q. Peng, J.E. Craft, M.J. Owen, and A.C. Hayday. 1994. Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in  $\alpha\beta$  (+) T cells. *Nature* 369:654-658.
8. De Wit, D., M. Van Mechelen, C. Zanin, J. Doutrelepon, T. Velu, C. Gerard, D. Abramowics, J. Scheerlinck, P. De Baetselier, J. Urban, and M. Moser. 1993. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J. Immunol.* 150 :361-366.
9. Cooke, M.P., A.W. Heath, K.M. Shokat, M. Howard, and C.C. Goodnow. 1994. Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-reactive B cells. *J. Exp. Med*

179:425-438.

10. Fuleihan, R., W. Mourad, T. Chatila, and e. al. 1991. Engagement of MHC-class II molecules by staphylococcal exotoxins delivers a comitogenic signal to human B cells. *J. Immunol.* 146:1661.
11. He, X., J. Goronzy, and C. Weyand. 1992. Selective induction of rheumatoid factors by superantigens and human helper T cells. *J. Clin. Invest.* 89, no. 2:673-680.
12. Friedman, S., D. Posnett, and M. Crow. 1991. A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 34:468.
13. Okubo, M., K. Yamamoto, T. Kato, N. Matsuura, T. Nishimaki, R. Kasukawa, k. Ito, Y. Mizushima, and K. Nishioka. 1993. Detection and epitope analysis of autoantigen-reactive T cells to the U1-small nuclear ribonucleoprotein A protein in autoimmune disease patients. *J. Immunol.* 151, no. 2:1108-1115.
14. Crow, M.K., G. DelGiudice-Asch, J.B. Zehetbauer, J.L. Lawson, N. Brot, H. Weissbach, and K.B. Elkon. 1994. Autoantigen-specific T cell proliferation induced by the ribosomal P2 protein in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest* 94:345-352.
15. Misaki, Y., K. Yamamoto, K. Yanagi, H. Miura, H. Ichijo, T. Kato, T. Mato, S. Welling-Wester, K. Nishioka, and K. Ito. 1993. B cell epitope on the U1 sn RNP-C autoantigen contains a sequence similar to that of the herpes simplex virus protein. *Eur. J. Immunol.* 23:1064-1071.
16. Diamond, B., J. Katz, E. Paul, C. Aranow, D. Lustgarten, and M. Scharff. 1992. The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu. Rev. Immunol.* 10:731-757.
17. Mohan, C., S. Adams, V. Stanik, and S.K. Datta. 1993. Nucleosome: A major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J. Exp. Med* 177:1367-1381.

18. Casciola-Rosen, L.A., G. Anhalt, and A. Rosen. 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 179:1317-1330.
19. Tröster, H., T.E. Metzger, I. Semsei, M. Schwemmler, A. Winterpacht, B. Zabel, and M. Bachmann. 1994. One gene, two transcripts : isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögren's syndrome. *J. Exp. Med.* 180:2059-2067.
20. Emlen, W., J. Niebur, and R. Kadera. 1994. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 152:3685-3692.
21. Jiang, X., G. Khursigara, and R.L. Rubin. 1994. Transformation of lupus-inducing drugs to cytotoxic products by activated neutrophils. *Science* 266:810-813.
22. Kanai, Y., O. Takeda, Y. Kanai, K. Miura, and Y. Kurosawa. 1993. Novel autoimmune phenomena induced in vivo by a new DNA binding protein Nuc : a study on MRL/ N mice. *Immunol. Lett.* 39, no. 1:83-89.
23. Dong, X., K.J. Hamilton, M. Satoh, J. Wang, and W.H. Reeves. 1994. Initiation of autoimmunity to the p53 tumor suppressor protein by complexes of p53 and SV40 large T antigen. *J. Exp. Med.* 179:1243-1252.
24. Oldstone, M. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50:819-820.
25. Damien, R.T. 1964. Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Naturalist.* 98:129-149.
26. Lehmann, P.V., T. Forsthuber, A. Miller, and E.E. Sercarz. 1992. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358:155-157.

27. 三崎義堅: 自己抗体とmolecular mimicry. 1994. シンポジウム 炎症と免疫特集. 遺伝因子と環境因子. 3(2)47-53.
28. Lin, R.-H., M.J. Mamula, J.A. Hardin, and J. Charles A. Janeway. 1991. Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells. *J. Exp. Med* 173:1433-1439.
29. Mamula, M.J. 1993. The inability to process a self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J. Exp. Med* 177:567-571.
30. Mamula, M.J., S. Fatenejad, and J. Craft. 1994. B cells process and present lupus autoantigens that initiate autoimmune T cell responses. *J. Immunol* 152:1453-1461.
31. Fatenejad, S., M.J. Mamula, and J. Craft. 1993. Role of intermolecular/intrastructural B-cell determinants in the diversification of autoantibodies to ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:12010-12014.
32. Query, C.C., and J.D. Keene. 1987. A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of homology that is crossreactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 51:211-220.
33. Guldner, H.H., H.J. Netter, C. Szostecki, E. Jaeger, and H. Will. 1990. Human anti-P68 autoantibodies recognize a common epitope of U1 RNA containing small nuclear ribonucleoprotein and influenza B virus. *J. Exp. Med* 171:819-829.
34. Kohsaka, H., K. Yamamoto, H. Fujii, H. Miura, N. Miyasaka, K. Nishioka, and T. Miyamoto. 1990. Fine epitope mapping of the human SS-B/La protein. Identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein. *J. Clin. Invest.* 85:1566-1574.
35. Scofield, R.H., and J.B. Harley. 1991. Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3343-3347.

36. McAllister, G., A. Roby-Shemkovitz, S.G. Amara, and M.R. Lerner. 1989. cDNA sequence of the rat U snRNP-associated protein N: description of potential Sm epitope. *EMBO J* 8:1177-1181.
37. Habets, W.J., M.H. Hoet, B.A.W.d. Jong, A.v.d. Kemp, and W.J.v. Venrooij. 1989. Mapping of B cell epitopes on small nuclear ribonucleoproteins that react with human autoantibodies as well as with experimentally -induced mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 143 (8):2560-2566.
38. Douvas, A., and S. Sobelman. 1991. Multiple overlapping homologies between two rheumatoid antigens and immunosuppressive viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6328-6332.
39. Nahill, S.R., and R.M. Welsh. 1993. High frequency of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes elicited during the virus-induced polyclonal cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med* 177:317-327.
40. Sharp, P.A. 1987. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235:766-771.
41. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, editors. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
42. Putney, S.D., S.J. Benkovic, and P.R. Schimmel. 1981. A DNA fragment with an alpha-phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78:7350-7354.
43. Henikoff, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28:351-359.
44. Stanley, K.K., and J.P. Luzio. 1984. Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors : identification of cDNA clones coding for human liver proteins. *EMBO J.* 3:1429-1434.
45. Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*

214:1205-1210.

46. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
47. Olmsted, J.B. 1981. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J. Biol. Chem* 256:11955-11957.
48. Yamamoto, K., H. Miura, Y. Moroi, S. Yoshinoya, M. Goto, K. Nishioka, and T. Miyamoto. 1988. Isolation and characterization of a complementary DNA expressing human U1 small nuclear ribonucleoprotein C polypeptide. *J. Immunol* 140:311-317.
49. Sillekens, P.T.G., R.P. Beijer, W.J. Habets, and W.J.v. Venrooij. 1988. Human U1 snRNP-specific C protein : complete cDNA and protein sequence and identification of a multigene family in mammals. *Nucleic Acids Research* 16:8307-8321.
50. Netter, H.J., H.H. Guldner, C. Szosteki, and H. Will. 1990. Major autoantigenic sites of the (U1) small nuclear ribonucleoprotein-specific 68-kDa protein. *Scand. J. Immunol.* 32:163-176.
51. McGeoch, D.J. 1989. The genomes of the human herpesviruses: contents, relationships, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:235-265.
52. Kahlon, J., and R.J. Whitley. 1988. Antibody response of the newborn after herpes simplex virus infection. *J. Infect. Dis.* 158:925-933.
53. Habets, W.J., P.T.G. Sillekens, M.H. Hoet, G. McAllister, M.R. Lerner, and W.J.v. Venrooij. 1989. Small nuclear RNA-associated proteins are immunologically related as revealed by mapping of autoimmune reactive B-cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4674-4678.
54. James, J.A., and J.B. Harley. 1992. Linear epitope mapping of an Sm B/B' polypeptide. *J. Immunol.* 148:2074-2079.

55. Hardin, J.A. 1986. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 29:457-460.
56. Steiner, G., K. Hartmuth, K. Skriner, I. Maurer-Fogy, A. Sinski, E. Thalmann, W. Hassfeld, A. Barta, and J.S. Smolen. 1992. Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *J. Clin. Invest* 90:1061-1066.
57. Van Venrooij, W., K. Wodzig, W. Habets, D. De Rooij, and L. Van de Putte. 1989. Anti-56K: a novel, frequently occurring autoantibody specificity in connective tissue disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 7:277-282.
58. Pruijn, G.J.M., B. Bozic, F. Schoute, L.A. Rokeach, and W.J.v. Venrooij. 1992. Refined definition of the 56K and other autoantigens in the 50-60 kDa region. *Mol. Biol. Rep.* 16:267-276.
59. Young, R.A., and R.W. Davis. 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1194-1198.
60. Sillekens, P.T.G., W.J. Habets, R.P. Beijer, and W.J. van Venrooij. 1987. cDNA cloning of the human U1 snRNA-associated A protein: extensive homology between U1 and U2 snRNP-specific proteins. *EMBO J.* 6:3841-3848.
61. Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, and J.W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods. Enzymol.* 185:60-89.
62. Verheijen, R., B.A.W.d. Jong, , and W.J. van Venrooij. 1992. Molecular cloning of a major CENP-B epitope and its use for the detection of anticentromere autoantibodies. *Mol. Biol. Rep.* 16:49-59.
63. Schägger, H., and G.V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem* 166:368-379.
64. Verheijen, R., B.A.W.d. Jong, and W.J. van Venrooij. 1992. A recombinant

- topoisomerase I ELISA: screening for IgG, IgM and IgA anti-topo I autoantibodies in human sera. *Clin. Exp. Immunol* 89:456-460.
65. Kozak, M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol* 196:947-950.
66. Crompton, M.R., S.E. Moss, and M.J. Crompton. 1988. Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell* 55:1-3.
67. Creutz, C.E. 1992. The annexins and exocytosis. *Science* 258:924-931.
68. Towle, C.A., and B.V. Treadwell. 1992. Identification of a novel mammalian annexin. *J. Biol. Chem* 267:5416-5423.
69. Tokumitsu, H., A. Mizutani, H. Minami, R. Kobayashi, and H. Hidaka. 1992. A calyculin-associated protein is a newly identified member of the  $Ca^{2+}$ /phospholipid-binding proteins, annexin family. *J. Biol. Chem* 267:8919-8924.
70. Mizutani, A., N. Usuda, H. Tokumitsu, H. Minami, K. Yasui, R. Kobayashi, and H. Hidaka. 1992. CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. *J. Biol. Chem* 267:13498-13504.
71. Van de Water, J., J. Turchany, P. Leung, and E. Gershwin. 1993. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis: evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J. Clin. Invest.* 91:2653-2664.
72. Becker, T., K. Weber, and N. Johnsson. 1990. Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of binding site of annexin II for p11. *EMBO J* 9:4207-4213.
73. Gruenberg, J., and N. Emans. 1993. Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol* 3:224-227.
74. Towle, C.A., L. Weissbach, and B.V. Treadwell. 1992. Alternative spliced annexin XI transcripts encode proteins that differ near the amino-terminus. *Biochem. Biophys Acta* 1131:223-226.

75. Hirata, F., R.D. Carmine, C.A. Nelson, J. Axelrod, E. Schiffmann, A. Warabi, A.I.D. Blas, M. Nirenberg, V. Manganiello, M. Vaughan, S. Kumagai, I. Green, J.L. Decker, and A.D. Steinberg. 1981. Presence of autoantibody for phospholipase inhibitory protein lipomodulin, in patients with rheumatic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3190-3194.
76. Goulding, N.J., M.R. Podgorski, N.D. Hall, R.J. Flower, J.L. Browning, R.B. Pepinsky, and P.J. Maddison. 1989. Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 48:843-850.
77. Zouali, M., R. Jefferis, and A. Eyquem. 1984. IgG subclass distribution of antibodies to DNA and to nuclear ribonucleoproteins in autoimmune diseases. *Immunology* 51:595-600.
78. Eisenberg, R., K. Dyer, S. Craven, C. Fuller, and W. Yount. 1985. Subclass restriction and polyclonality of the systemic lupus erythematosus marker antibody anti-Sm. *J. Clin. Invest.* 75:1270-1277.
79. Rubin, R., F. Tang, E. Chan, K. Pollard, G. Tsay, and E. Tan. 1986. Subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome and drug-induced autoimmunity. *J. Immunol.* 137:2528-2534.
80. Goulding, N., and P. Guyre. 1992. Regulation of inflammation by lipocortin 1. *Immunol Today* 13:295-297.
81. Goulding, N.J., C.M. Jefferiss, L. Pan, W.F.C. Rigby, and P.M. Guyre. 1992. Specific binding of lipocortin-1( annexin I ) to monocytes and neutrophils is decreased in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35:1395-1397.
82. Koopman, G., C. Reutelingsperger, G. Kuijten, R. Keehnen, S. Pals, and M. van Oers. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415-1420.



KODAK  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8  
in 1 2 3 4 5 6 7 8

### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

### Kodak Gray Scale

**C** **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

