

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 大西 佐知子

論 文 名 ループス腎炎の新規自己抗原の同定

---

### 学位論文要旨

目的：全身性エリテマトーデス(SLE)は様々な自己抗体が出現し、免疫複合体を形成して臓器病変を生じる疾患である。抗 dsDNA 抗体はループス腎炎の活動性の指標として重要であるが、抗 dsDNA 抗体のみで全てのループス腎炎の活動性を評価することはできない。例えば、抗 dsDNA 抗体はループス腎炎以外の病態でも上昇し、また、抗 dsDNA 抗体の上昇がみられなくてもループス腎炎が増悪する例もある。このため、他にもループス腎炎の指標となる自己抗体が存在すると考えられ、自己抗原の検索を行った。

方法：SLE 患者のうちループス腎炎患者 1 名、腎炎のない患者 1 名の活動期・非活動期のペア血清を用いて、愛媛大学プロテオサイエンスセンターで構築された 2,296 の cDNA ライブラリーからビオチン化たんぱく質を作成し、AlphaScreen 法により自己抗体を検索した。活動期・非活動期で変動があったタンパク質のうち、17 種類の腎炎患者に特異的に検出されたタンパク質を選択し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法でビオチン化タンパクを作成し免疫沈降を行った。免疫沈降法でループス腎炎患者に陽性であったタンパク質が、免疫複合体としてループス腎炎患者の腎組織に沈着しているか調べるため免疫染色を行った。免疫複合体の沈着を認めた 2 種類のタンパク質[Ribosomal RNA-processing protein 8 (RRP8)および Spermatid nuclear transition protein 1 (TNP1)]に対する ELISA を作成し、SLE および他の膠原病患者 238 名と健常者 41 名の血清から抗体価を測定した。さらに SLE 患者では、抗 RRP8 抗体および抗 TNP1 抗体が抗 dsDNA 抗体や補体など SLE の疾患活動性と関連するか検討した。また、RRP8 もしくは TNP1 を C57BL/6 マウスに投与し、腎炎が惹起されるかを検討した。

結果：AlphaScreen 法により活動期・非活動期で変動があったタンパク質は、腎炎患者 456 個、

腎炎のない患者で 525 個であった。このうち、腎炎患者に特異的に検出された 17 タンパクを選択し、SLE、強皮症、皮膚筋炎・多発性筋炎患者血清を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降では RRP8、TNP1、Sperm protamine P1 (PRM1)、Protamine-2 (PRM2)が SLE に特異的に反応した。PRM1 および PRM2 はループス腎炎のみではなく他の SLE 患者でも反応した。RRP8 および TNP1 はループス腎炎患者に特異的に反応したため、RRP8 と TNP1 がループス腎炎の病態と関連するか検討した。ループス腎炎患者の腎生検および剖検腎組織を免疫染色したところ、一部の患者で RRP8、TNP1 両方もしくはいずれか一方の免疫複合体の沈着を認めた。これらの自己抗原に対する ELISA を作成し抗体価を測定した。健常人の平均+5SD をカットオフとしたところ、抗 RRP8 抗体の陽性率は SLE で 20%、関節リウマチで 5.5%、ベーチェット病で 4.5%であった。さらに、ループス腎炎患者での陽性率は、腎炎のない SLE 患者と比較して有意に高かった(63.6% vs 12.5%)。一方、抗 TNP1 抗体陽性率はループス腎炎患者で 45.5%、腎炎のない SLE 患者で 9.4%、関節リウマチ 1.8%、ベーチェット病 9.1%であった。抗 RRP8 抗体価と抗 TNP1 抗体価は、抗 dsDNA 抗体価および SLEDAI スコアと弱い相関を認めたが、腎機能(eGFR)とは相関しなかった。7名のループス腎炎患者で、活動期・非活動期の抗体価を比較したところ、抗 RRP8 抗体・抗 TNP1 抗体ともに非活動期に低下していた。RRP8 もしくは TNP1 との免疫複合体が腎炎を誘発するか検討するために、C57BL/6 マウスに精製タンパク質を 10 日毎に静注した。7~9 回静注後、マウスの腎組織を解析した。両タンパク質とも静注されたマウスでは、PAS 染色で基底膜肥厚を認め、蛍光抗体法で免疫複合体の沈着を認めた。

結論：コムギ胚芽無細胞タンパク質を用いた AlphaScreen 法は、多くの自己抗原を一度に検索できるため自己抗体検出のスクリーニングに大変有用であると考えられた。ループス腎炎患者の血清中に抗 RRP8 抗体、抗 TNP1 抗体を認めた。これらの抗体は他疾患と比較しループス腎炎に有意に認められ、さらに腎生検の免疫染色でこれらの自己抗原の免疫複合体沈着を認めた。また、RRP8、TNP1 をマウスに投与したところ腎組織に免疫複合体の沈着を認めた。したがって、RRP8、TNP1 は腎炎発症の病因に関与すると考えられた。これらの自己抗体は抗 dsDNA 抗体陰性ループス腎炎の診断および活動性のバイオマーカーになることが示唆された。

キーワード (3~5)	全身性エリテマトーデス ループス腎炎 自己抗体 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法
-------------	---