

論 文 内 容 要 旨

ループス腎炎の発症に特定の抗体がクリティカルな役割を演じていることは、ループス腎炎自然発症マウスよりクローン化された抗体が正常マウスに致死的な糸球体腎炎を誘導できる事実より明らかになってきた。しかしこれらの腎炎惹起性抗体ならびにその遺伝子の起源については、なお不明な点が多い。現在、ループスマウスに特異的な抗 DNA 抗体や IgG リウマチ因子などの自己抗体の出現は正常マウスにおける外来抗原刺激の場合と同様、自己抗原刺激による特異的 B 細胞活性化の結果であることが示されている。更に、このような自己抗体可変領域に蓄積した体細胞性突然変異が腎炎惹起性抗体の出現をも説明し得る概念（体細胞性突然変異説）として受け入れられてきた。しかし、ループス腎炎における腎炎惹起性抗体の出現がこの概念に合致する可否か、また、腎炎惹起性抗体を生む抗体可変領域 germline 遺伝子も明らかにされておらず、ループスマウス特有の重鎖可変（VH）領域遺伝子がループス腎炎発症を規定している（germline 説）可能性も不明のまま残されている。

I 腎炎惹起性抗体産生ハイブリドーマクローン, B1

以前、我々はループス腎炎自然発症マウス MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) に由来し、正常マウスにもループス腎炎を誘導できるハイブリドーマクローン B1 を樹立した。この cDNA の解析より V 領域以外にはアミノ酸の置換や変異は存在しないことが明らかにされた。今回は、B1 抗体によるループス腎炎成立に、宿主側の免疫学的因子が影響している可能性を排除するために、宿主として先天的に T, B 両リンパ球を欠損する SCID マウスを用いて、B1 抗体の腎炎惹起能を再検を行った。B1 クローン 10^7 個を腹腔内に移植された個体は、移植後20日までに B1 抗体の沈着を伴う wire loop 様の糸球体病変を再現した。これにより、B1 抗体自体の腎炎惹起能が確認された。

II 腎炎惹起性抗体 germline VH 遺伝子の遺伝的多型

腎炎惹起性抗体の出現は、その VH 領域の由来する germline VH 遺伝子に規定され得る可否かを明らかにするために、MRL/*lpr* マウス、および MRL 系の遺伝的背景を構成する C3H/HeJ-*lpr/lpr* (C3H/*lpr*), C57BL/6J-*lpr/lpr* (C57BL/*lpr*), LG/J および AKR/J マウスの肝臓より抽出した genomic DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。C3H/*lpr* と C57BL/*lpr* マウスはループス腎炎を発症しないことが明らかにされている。プローブは B1 抗体 cDNA VH 領域より調整し、Framework region (FR) 1 から FR3 の 5'側までの 203bp と残りの FR3 の 3'側 83bp の 2 種を用いた。B1 germline VH 遺伝子は、いずれの系統も EcoR I -2.4kb あるいは HindIII -3.2kb DNA 断片上に存在することが予想された。更に両プローブでクロスハイブ

リダイズする DNA 断片を含め、MRL/lpr ループスマウス固有の遺伝的多型は検出されなかった。

Ⅲ 腎炎惹起性抗体 germline VH 遺伝子の単離

VH 遺伝子上の体細胞性突然変異が B1 抗体分子の腎炎惹起能に必要なものであるのか、また、B1 germline VH 遺伝子には遺伝的多型は見出せなかったが、塩基配列レベルでも腎炎発症を規定する因子がそこに存在しないと言えるか、この2点を明らかにするために、MRL/lpr マウスと、非ループスマウスとしての C3H/lpr マウスより B1 germline VH 遺伝子を単離した。サザンハイブリダイゼーションの結果に基づき、両マウスの胎児 genomic DNA より EcoR I -2.4kb DNA 断片を含むサイズ分画ライブラリーを作成し、20万クローンをサザンハイブリダイゼーションの際に用いたプローブと条件でスクリーニングした。B1 cDNA VH 領域と MRL/lpr 由来の germline VH 遺伝子を比較すると、この領域には体細胞性突然変異によるアミノ酸置換は存在せず、B1 抗体の腎炎惹起能には VH 領域の体細胞性突然変異は必要としていないことが明らかとなった。更に、両マウス由来の germline VH 遺伝子を比較すると、5'側の転写調節配列を含む領域から3'側のイントロンまで完全に一致し、ループス個体固有の腎炎惹起性抗体 VH 遺伝子の存在は否定された。

Ⅳ 結語

腎炎惹起性 B1 抗体産生クローンの出現は、以上の結果より、従来の体細胞性突然変異説を軸としてきた腎炎惹起性抗体の出現機序によっても、一方の germline 説によっても説明できない現象である。すなわち、B1 抗体の存在は腎炎惹起性抗体の出現機序に、新なる展開を迫るものである。

審査結果の要旨

SLEに見られるループス腎炎の発症には、ある特定の抗体がクリティカルな役割を演じていると考えられている。この概念に帰する最近のほとんどの研究の方向性は、ループス個体内における腎炎惹起性抗体の誘導過程の解明に向けられている。この問題に対して、抗DNA抗体やリウマチ因子等の自己抗体の遺伝子レベルの解析から、今日、主な2つの仮説が提唱されている。1つは抗原刺激による抗体可変(V)領域の体細胞性突然変異が、抗体の腎炎惹起能獲得に必要であるとする立場で、体細胞性突然変異説と呼ばれる。もう1つは、ループス個体では、V領域を生み出す germline 遺伝子に異常があるとする立場で、germline 説と呼ばれている。現在まで、両説が腎炎惹起性抗体の誘導過程を説明し得る仮説にとどまる理由は、自己抗体と腎炎惹起性抗体の間をつなぐ実証がなされていなかったことにある。本研究は、腎炎惹起性抗体をクローン化し、続いてその germline V_H gene を明らかにすることによって、腎炎惹起性抗体の起源を明確に示した初めてのものである。

本研究の対象となった B1 ハイブリドーマクローンは、ループス腎炎自然発症マウスに由来し、その腎炎惹起能は、正常マウスへの B1 クローン移植により、糸球体病変を再構築できることで確認されている。さらに、抗体 cDNA の前塩基配列から、V 領域以外の領域にはループスマウス固有の変異は存在しないことを示した上で、まず V_H 領域に腎炎惹起能の責任を求め、ループスマウスと正常マウスより、その germline 遺伝子の単離へと進めている。以上の研究の流れに無理な飛躍は感じられない。その観察結果から、B1 抗体の V_H 領域にはアミノ酸置換が存在しないことを明らかにし、抗体の腎炎惹起能獲得に、V_H 領域の体細胞性突然変異は必要としないと結論した。さらに、塩基配列レベルで正常マウスにもループスマウスと全く同じ germline V_H 遺伝子が備わっていることを示し、この抗体の腎炎惹起能は、germline V_H 遺伝子の異常によるものではないと結論した。結果より導かれる結論は免疫病理学的にも極めて合理的で、かつ妥当であると判断される。

本研究は、抗体の腎炎惹起能獲得に V_H 領域の体細胞性突然変異は必要としないことを初めて明確に示し、さらに従来の仮説にはよらない腎炎惹起性抗体の誘導過程が存在するという、新たなループス腎炎研究の展開の必要性にまで言及したという点で、学位論文に値するものと考えられた。