

氏 名（本籍） さい とう しん いち ろう
 齋 藤 真 一 郎

学位の種類 博 士 （医 学）

学位記番号 医 博 第 1 2 9 5 号

学位授与年月日 平 成 8 年 3 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科
 （博士課程）内科学系専攻

学位論文題目 Destiny of Nephritogenic anti-DNA antibody
 producing B cell in SLE.
 （SLE における腎障害性抗 DNA 抗体産生クロー
 ンの消長）

（主 査）

論文審査委員 教授 阿 部 圭 志 教授 田 上 八 朗

 教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

O-81 及び NE-1 クロームは、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 症例より得た腎障害性抗体のイディオタイプを有する抗 DNA 抗体産生クロームである。本クロームは自己抗体特有であることが推定される VH 遺伝子 V3-7 及び VH4-21 を胚細胞型遺伝子としている。この自己抗体関連 VH 遺伝子の *in vivo* での存在様式を検討し、自己抗体発現機序を追求することを目的とした。

1) heterogenous なリンパ球集団のなかから、特定の VH 遺伝子 (V3-7) を使用する B 細胞クロームを特異的に検出する系を確立することを試みた。この結果、V3-7 に特異的なプライマーやオリゴプローブを用い、PCR RT-PCR, Southern hybridization を施行することにより、genomic DNA 及び mRNA レベルで、胚細胞型あるいは再構成型の特定の VH 遺伝子 (V3-7) の検出が可能とされることを確認した。

2) 1) に基づきヒト *in vivo* (末梢血中) における V3-7 遺伝子の存在様式を検討した。その結果、胚細胞型及び再構成型 V3-7 遺伝子が SLE のみならず正常人の末梢血単核球からも検出されると推定された。更に RT-PCR 産物の塩基配列の決定により、これが V3-7 に由来することを確認した。このことから V3-7 を使用する B 細胞は正常人にも存在し、活性化されていると考えられ、V3-7 遺伝子のみでは必ずしも病的な抗 DNA 抗体産生クロームの指標となり難いことが示唆された。

3) ヒトモノクロナル抗 DNA 抗体産生 O-81 クロームは SLE 例 K.O. の末梢血 B 細胞より得られている。O-81 クロームとクローナリティーの一致するクロームは抗 DNA 抗体産生クロームである可能性があるので、K.O. 例につき、serial study により、生体内での O-81 関連クロームの消長を検討した。

この結果、クロームに固有の塩基配列を持つとされる CDR3 領域をプローブとして PCR-Southern hybridization を施行することにより、O-81 VH と関連する VH 遺伝子を使用するクロームを末梢血中から検出しようと考えられた。この O-81 関連 VH 遺伝子の塩基配列を決定したところ、O-81 VH 遺伝子に極めて類似し、N 領域を含む CDR3 領域の塩基配列が一致した。このことから、K.O. には O-81 クロームとクローナリティーが一致し、抗 DNA 抗体産生クロームと同一の起源を持つと考えられるクロームが *in vivo* に存在することが示された。

また、O-81 クロームと同一の起源を示すクロームは、経過と共に CDR2 領域を中心としていくつかの塩基の変異を生じていることが判明し、VH 遺伝子の超可変部位を中心とした somatic mutation が生じていることが示された。また、寛解期の持続に伴って VH 遺伝子にストップコ

ドンを有するクロンを多数認め、その後 O-81 関連クロンは検出不能となった。

このクロンの変化は臨床的経過とも相関し、本例における腎障害性の病的クロンの消失を示唆する所見と推定され、組織障害性自己抗体の消長の機序を検討するうえで興味深い所見と考えられた。

審査結果の要旨

自己抗体を規定するヒト免疫グロブリン重鎖 VH 遺伝子の研究は、自己免疫病の遺伝的背景、自己抗体の発現に関する貴重な情報を与え得る。0-81 クローンは、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 症例より得た腎障害性抗体のイディオタイプを有する抗 DNA 抗体産生 B 細胞クローンである。本クローンは自己抗体に特有とされる VH 遺伝子 V3-7 を胚細胞原型遺伝子として使用している。本研究は、この自己抗体関連 VH 遺伝子の *in vivo* での存在様式を検討し、自己抗体発現機序を追求して行われ、次の成果を得ている。

1) ヒト末梢血中の heterogeneous なリンパ球集団の中から、特定の VH 遺伝子 (V3-7) を使用する B 細胞クローンを特異的に検出する系を確立した。この結果、V3-7 に特異的なプライマーやオリゴプローブを検出し、genomic DNA および mRNA レベルで、胚細胞型あるいは再構成型の VH 遺伝子 (V3-7) の検出が可能であることを見出した。2) 1) に基づきヒト *in vivo* (末梢血中) における V3-7 遺伝子の存在様式を検討した。その結果、胚細胞型および再構成型 V3-7 遺伝子が SLE のみならず正常人の末梢血単核球からも検出された。更に RT-PCR 産物の塩基配列の決定によりこれが V3-7 に由来することを確認した。3) 0-81 クローンとクローナリティの一致するクローンは SLE 例 K.O. においてのみ検出できた。その末梢血 B 細胞より経時的に生体内での 0-81 関連クローンの消長を検討した。クローンに固有の CDR3 領域をプローブとして PCR-Southern hybridization を施行し、VH 遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、0-81 VH 遺伝子に極めて類似し、N 領域を含む CDR3 領域の塩基配列が一致するクローンを得た。これらは経過と共に CDR2 領域を中心としていくつかの塩基の変異を生じている。すなわち、VH 遺伝子の超可変部位を中心とした somatic mutation が生じていることを見出した。また、寛解期の持続に伴って VH 遺伝子にストップコドンを持つクローンを多数認め、その後 0-81 関連クローンは検出不能となった。

以上より、自己抗体の原型 VH 遺伝子を有するクローンは正常人の末梢循環血中のレパトリーを構成する B 細胞にも存在し得ることを見出した。機能的な病的抗 DNA 抗体産生に関与する V 遺伝子として発現した例では、その病的クローンの CDR 領域に常に somatic mutation が生じたが、疾患の安定と共に血中より消失した。これらのことより、病的抗 DNA 抗体を誘発する抗原が存在し、これが消失することにより病的クローンも消失、自己免疫状態の改善がもたらされることが推定される。このような生体内における自己抗体の V 遺伝子レベルでの研究は、これまでに報告がない。自己免疫病の発症や病態を分子レベルで理解することに貢献する貴重な研究であり、十分学位論文に値するものである。