

膠原病と自己抗体

Connective tissue diseases and autoantibodies

東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 准教授

窪田 哲朗

TETSUO KUBOTA

東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 大学院生

新居登紀子

TOKIKO NII

Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Health Sciences

1. はじめに

免疫系はウイルス、細菌、真菌など、外から体内に侵入してくる病原微生物を撃退するためのしくみであり、免疫応答を引き起こす原因物質を抗原と呼ぶ。しかし、たいして害が無いような抗原に対しても過剰に応答してしまうと、かえって不快な結果がもたらされる。これをアレルギー (allergy) または過敏症 (hypersensitivity) とよぶ。近年、花粉症、食物アレルギー、薬剤アレルギー、アトピー性皮膚炎などに悩まされている人は非常に多い。

さらに、真の病因抗原が不明であるけれども、結果的に生じた免疫応答で抗体やリンパ球が自己の正常の抗原とも反応してしまう病態が自己免疫疾患である。これには、たとえば血小板の細胞膜の糖タンパク質と反応する自己抗体が産生されて、血小板減少、出血傾向がもたらされる特発性血小板減少性紫斑病など、特定の細胞または組織のみが標的となる組織特異的自己免疫疾患と、様々な組織に障害がもたらされる全身性自己免疫疾患がある。後者はいわゆる膠原病とよばれる概念とほぼ同義と考えて良い。ここでは膠原病にみられる自己抗体について述べてみたい。

2. 膠原病とは

アメリカの病理学者Paul Klempererによって1942年に提唱された概念で、その当時までの臓器別の疾患概念とは異なって、全身の血管や結合組織にフィブリノイド変性を認める疾患群が存在するという、画期的な概念であった。その後しばらくの間は、全身性エリテマトーデス、関節リウマ

チ、全身性強皮症、多発性筋炎および皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、リウマチ熱の6疾患が膠原病とよばれていたが、近年では混合性結合組織病、顕微鏡的多発血管炎など新しく加わった疾患や、Sjögren症候群、Wegener肉芽腫症、Behçet病、成人Still病、高安動脈炎、好酸球性筋膜炎など、多数の周辺疾患も含めた用語として用いられることが多い。さらに、上記のようにこれらの疾患では自己免疫反応が病態形成に重要な関わりをもっていることが次第に明らかにされ、全身性自己免疫疾患という概念ともオーバーラップするようになった。

3. 膠原病と自己抗体

患者さんからよく「膠原病ってどんな症状がでるんですか?」、「どういう検査で診断できるんですか?」と訊かれる。まず、症状であるが、膠原病といっても多彩で疾患毎に異なるし、同じ疾患であっても患者さんごとに異なるので、簡単には説明できない。検査所見も、たとえば癌であれば、癌細胞が見つかったら自覚症状がなくても癌なのであって、さっさと取ってしまった方がよいのであるが、膠原病を診断できる特異的な検査はないので、これも簡単ではない。いくつか具体的な例を挙げて説明してみよう。

最も患者数が多いのは関節リウマチで、わが国には60万人程の患者さんがいらっしゃるが、この疾患で最も重要な症状は慢性的に、何週間も何ヶ月も何年も続く関節炎による関節の痛みや変形である。その他に発熱、倦怠感、呼吸器症状などを認めることもある。検査所見としては、リウマトイド因子とよばれる自己抗体が有名であるが、感度、特異度ともに80%程度である。すなわち、関節リウマ

チでありながら20%の人はリウマトイド因子が陰性である、他の膠原病や感染症などでも、あるいは健常人でさえもしばしば陽性となる、という点を知っておかなければならない。検診等でリウマトイド因子が陽性と指摘されたという理由でわざわざ大学病院を受診する人も多いが、関節が腫れたり痛かったりという症状がなければ診断することはできないし、もちろん治療も必要ない。

次に多いのが全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)という20~30歳代の女性に好発する疾患である。厚生労働省の特定疾患(難病)に指定されており、わが国の患者数は5万人程度である。原因不明の発熱、皮疹、光線過敏症、関節痛などで始まることが多く、腎炎(ループス腎炎)や中枢神経障害(けいれん、意識障害、精神症状)など重篤な病態を呈することもある。

SLEでは様々な自己抗体が検出されるが、なかでも抗DNA抗体と抗Sm抗体は本疾患に特異性が高く、診断に際して重要な情報となる。特に抗DNA抗体については、典型的な症例では抗DNA抗体高値の状態が続くとループス腎炎を来し、適切な治療が行われないと腎不全に至る。これは、抗体が血液中でDNA、ヒストン、ヌクレオソーム等と結合して免疫複合体を形成し、腎臓の糸球体に沈着して炎症を起こすために発症するもので、ステロイドホルモン剤や免疫抑制剤を投与して治療すれば抗体価の低下とともに軽快する。

一方、抗Sm抗体というのは、細胞の核のなかでRNAのスプライシングを行うRNA-タンパク質複合体であるsnRNPを構成するタンパク質と反応する抗体である。

全身性強皮症は、指先から始まって、全身の皮膚が硬くなる疾患で、肺、消化管などの臓器でも線維化が進行する。わが国の患者数は約6,000人で、特定疾患に指定されている。皮膚硬化が長年、手指のみに限局するタイプでは、抗セントロメア抗体が高率に検出され、染色体のセントロメアタンパク質であるCEMP-A、CEMP-B、CEMP-Cなどと反応する。一方、皮膚硬化が全身に広がるタイプではDNAの超らせん構造をほぐす酵素であるDNA topoisomerase I に対する抗体が検出される。

皮膚筋炎/多発性筋炎は、首、肩、腕、臀部、大腿部など、体に近い部分の筋肉に炎症が起こって力が入らなくなる疾患で、わが国の患者数は約6,000人、これも特定疾患に指定されている。細胞質でタンパク質合成が行われる際に、mRNAの配列に対応したtRNAがアミノ酸を

結合してリボゾームに運搬するが、本疾患では、ヒスチジンをtRNAに結合させるヒスチジルtRNA合成酵素に対する自己抗体が20~30%に検出される。

4. 疾患モデルマウス

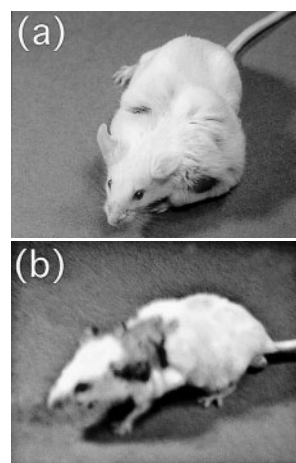


図1 MRL/lprマウス。外見上はリンパ節腫脹(a)や、脱毛(b)を認め、抗DNA抗体、抗Sm抗体などの自己抗体が産生され、糸球体腎炎を発症する。

自己抗体の性質を詳細に検討するために、モノクローナル自己抗体もたくさん作製されているが、患者リンパ球から作製することは容易ではないので、モデルマウスがあると都合が良い。特に、SLEに類似した病態を自然発症するモデルマウスとして、(NZB×NZW)F₁、BXSB、MRL/lprなどが有名で広く用いられている(図1)。これらのマウスは経過とともに抗DNA抗体などの自己抗体を産生し、やがて腎炎を起こして、半年から1年程で死亡する。

5. モノクローナル抗DNA抗体の精製

SLE患者血清中のポリクローナル抗DNA抗体を精製して特異性を検討してみると、2本鎖(ds)DNAと強く反応する抗体や、1本鎖(ss)DNAと強く反応する抗体など、色々な抗体の混合物であることがわかる¹⁾。しかし、患者あるいはモデルマウス由来のモノクローナル抗体で検討すると、抗体が認識する構造をもう少し詳しく明らかにすることができる。

抗体の特異性について詳述する前に、ここで抗体の精製法について少し触れておきたい。一般的には硫酸アンモニウムを用いた塩析法、DEAEカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、プロテインAまたはブ

ロテインG、あるいは抗IgG抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーなどが広く用いられている。IgM抗体の場合には、水に対して透析する手もある。血清などのポリクローナル抗体から特定の抗原と反応する抗体のみを分離するためには、抗原を担体としたアフィニティーカラムクロマトグラフィーが有効で、これは抗DNA抗体の精製にも応用できる¹⁾。

ここでもうひとつ、関東化学の大瀧氏に教えていただいた便利な方法を紹介する^{2, 3)}。彼らは γ -グロブリンに親和性の高いピロリン酸マグネシウムをカラムの充填剤として使えるように球状粒子として合成し、HPLCでIgGやIgM抗体を簡便に精製する方法を発表している。筆者らは球状ピロリン酸マグネシウムを単に3mlの注射筒の中に入れてフラクションコレクターに接続して用いているが(図2)、食塩を含まない中性のリン酸緩衝液にて平衡化したカラムにIgG抗DNAモノクローナル抗体を吸着させると、500mMの食塩を含んだリン酸緩衝液を用いて溶出することができ、そのピークに一致して抗体活性もほぼ完全に回収される(図3)。このようにして精製した抗体の比活性は、ハイブリドーマの培養上清を50%飽和硫酸アンモニウム溶液で塩析した分画と比べて約10倍高く(図4)、通常の種々の実験に用いるのに十分な純度と活性を有していた。



図2 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによる抗体精製。当研究室では注射用シリンジに充填して(a)、フラクションコレクターに接続している(b)。

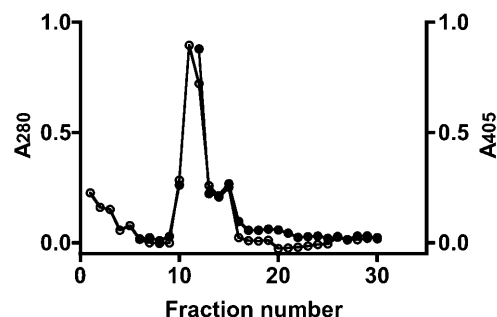


図3 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによるIgGモノクローナル抗dsDNA抗体2C10の精製。フラクションNo. 8から500 mM NaClを含むバッファーで溶出している。左軸にタンパク質濃度(●)、右軸に各フラクションを800倍に希釈してELISAで測定した抗体活性(○)を示す。

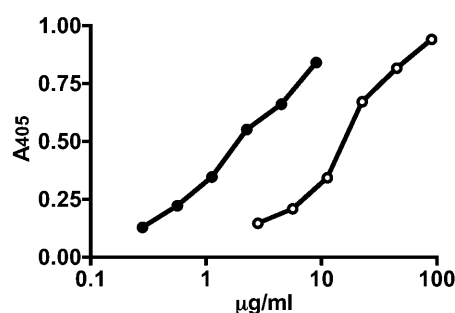


図4 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによるIgGモノクローナル抗dsDNA抗体2C10の精製。カラムに通す前の50%飽和硫酸アンモニウム溶液で塩析した分画(○)と、精製後の抗体(●)の抗体活性をELISAで測定した。

6. 抗DNA抗体の認識する構造

精製したモノクローナル抗体を使って、その認識する構造について様々な研究が行われてきたが、いくつかを紹介する。

従来からSLEではしばしば、梅毒血清反応が偽陽性を呈することが知られていたが、このメカニズムをモノクローナル抗体を用いて初めて証明したのはLaferla⁴⁾であった。梅毒血清反応では抗原としてcardiolipin (diphosphatidyl glycerol) というリン脂質が汎用されているが、DNAの糖リン酸骨格と共通した構造をもっている(図5)。彼女らは、モノクローナル抗DNA抗体の中にはcardiolipinと交叉反応性を示し、かつループスアンチコアグulantとしての活性を示すものがあることを証明したのである。ちなみにループスアンチコアグulantとは血液の凝固反応を阻害する抗体で、これを持っている患者は、かえって血栓症を生じやすい(抗リン脂質抗体症候群: この逆説的現象の解明が現在の筆者らの研究テーマとなっている)。

一方、ループス腎炎の発症と関連する抗dsDNA抗体が

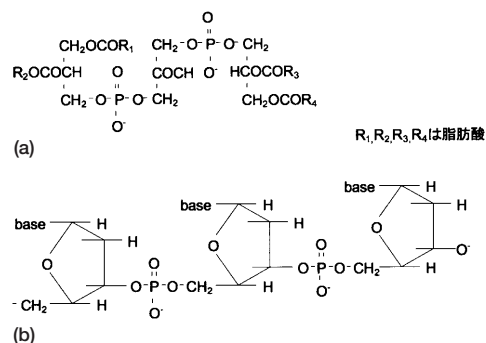


図5 SLEで梅毒血清反応が偽陽性を呈する理由の一つ。炭素原子3つとリン酸基が交互に繰り返す配列はcardiolipin(a)とDNAの糖リン酸骨格(b)に共通して認められるため、抗DNA抗体の中にはcardiolipinと交叉反応性を示すものがある。

認識する構造はどのようなものであろうか。Stollarら⁵⁾は、種々の合成ヌクレオチドとH241と命名されたMRL/lprマウス由来のモノクローナル抗体との反応性を詳細に検討し、この抗体は糖リン酸骨格をまたいでDNAのmajor groove側とminor groove側の両方からグアニン-シトシンの塩基対と接触することを明らかにした。一方、筆者ら⁶⁾は、MRL/lprマウス由来の抗dsDNA抗体2C10は、minor groove側からアデニン-チミン塩基対と接触することを明らかにした。これらを漫画で説明したものが図6であり、H241はモノレールの様にして糖リン酸骨格にまたがり、グアニン-シトシン塩基対が3つくらい連続して存在する場所に来ると停止して強く結合する。2C10は2本のレール上を進んで、アデニン-チミン塩基対が存在する所で停止する。

以上のように、一口に抗DNA抗体と言っても、DNAの骨格部分と反応するもの、塩基と反応するもの、骨格・塩基両方からなる構造を認識するもの、あるいはヌクレオソームの立体構造を好むもの⁷⁾など様々である。

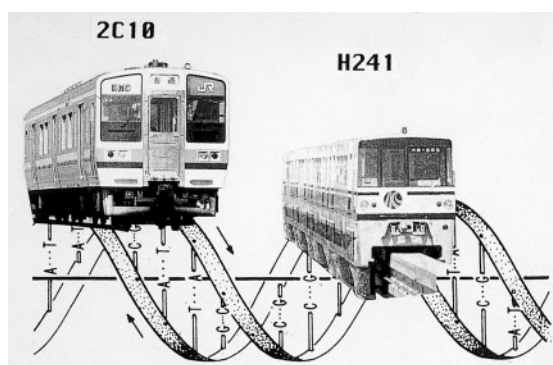


図6 抗dsDNA抗体が認識する構造の例。モノクローナル抗dsDNA抗体2C10は、DNAのminor groove側からA-T塩基対に結合する。H241は、糖リン酸骨格にまたがってmajor groove側とminor groove側からG-C塩基対に結合する。

7. おわりに

以上述べてきたように、膠原病では各疾患に特徴的な様々な自己抗体が産生され、その対応抗原は細胞の表面抗原であったり、細胞質の抗原であったり、核内の分子であったりと、多彩である。しかし、いずれにしてもそれらの自己抗原は正常のヒトや動物には抗原性が乏しく、人為的に動物を免疫しても多くの場合、抗体を得ることはむずかしい。それが何故、患者では産生され続けるのか、という古くからの疑問に対して、未だに明確な答えが見つかっていない。また、それらの抗体が病態の形成に関わっているのか否かについても、わずかに抗DNA抗体とループス腎炎の間に因果関係を認める例を除いて、明らかにされていない。したがって、本稿ではやや古い文献を引用しながらの話にとどまったが、そろそろこのあたりでbreakthroughを期待したいところである。

参考文献

- 1) Kubota T, Akatsuka T, Kanai Y. DNA affinity column chromatography: application in the isolation of distinct antibody populations from SLE sera. *Clin Exp Immunol*, **62**,321 (1985).
- 2) Inoue S, Ohtaki N. Pyrophosphates as biocompatible packing materials for high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **645**,57 (1993).
- 3) 大瀧伸之, 井上千也. 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによる免疫グロブリンの分離と精製. *分析化学*, **44**,875 (1995).
- 4) Lafer EM, Rauch J, Andrzejewski Jr C, Mudd D, Furie B, Schwartz RS, Stollar BD: Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J Exp Med*, **153**,897 (1981).
- 5) Stollar BD, Zon G, Pastor RW. A recognition site on synthetic helical oligonucleotides for monoclonal anti-native DNA autoantibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**,4469 (1986).
- 6) Kubota T, Watanabe N, Kanai Y, Stollar BD. Enhancement of oxidative cleavage of DNA by the binding sites of two anti-double-stranded DNA antibodies. *J Biol Chem*, **271**,6555 (1996).
- 7) 陸青, 宮坂信之, 窪田哲朗. 全身性エリテマトーデスにおける抗ヌクレオソーム抗体の評価方法について. *臨床検査*, **47**,559 (2003).