

氏名(本籍)	すずきもとひろ 鈴木基博(山形県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2423号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	CLONING AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF ANTI-DOUBLE STRAND DNA IgG AUTOANTIBODIES USING THE PHAGE-DISPLAY METHOD (Phage-display法を用いたIgG型抗二重鎖DNA自己抗体のクローニングとその機能解析)
主査	筑波大学教授 医学博士 大塚 藤 男
副査	筑波大学教授 医学博士 小山 哲 夫
副査	筑波大学教授 理学博士 坂内 四 郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 澁谷 彰
副査	筑波大学助教授 医学博士 玉岡 晃

論文の内容の要旨

(目的)

2本鎖(ds)DNAに対する自己抗体は全身性エリテマトーデス(SLE)の病因である可能性が指摘されているが、ヒトのIgG型モノクローナル抗体作成は困難であり、同抗体の分子生物学的性状や病態生理的側面に関する研究は進んでいなかった。近年開発されたphage-display法はヒトIgG型抗体産生とその遺伝子解析に有用であることが分かってきており、同方法を用いてSLE患者の末梢血リンパ球(PBL)から抗DNA抗体のFabクローンを作成し、その遺伝子を解析、SLEにおける抗ds-DNA抗体の病態生理学上の意義、特に腎炎発症との関連性を解明しようとした。

(方法) 抗DNA抗体のphage Fabクローンの作成:mRNAをループス腎炎(WHO IIIa)を発症している抗ds-DNA抗体高値の活動期SLE患者のPBLから分離し、それをcDNAに逆転写しPCRにより重鎖(VH)DNAと軽鎖(VL)DNAを増幅した。それらをFeb分子がphage表面に発現するベクターpComb-3Hに組み込み、大腸菌(XL-1 Blue cells)に導入した。さらにhelper phageを感染させFeb-phageを作成した。プレートに固相化したDNA抗原にFeb-phageライブラリーを反応させ、抗原に結合したFeb-phageを回収するパニングを5回行いDNA結合性のphageをクローン化した。可溶性のFebはphagemid DNAからgene III部分を切り離し、大腸菌に導入した後IPTGで誘導し作成した。(2) 抗原特異性の検討:FebのDNAやその他の抗原(SS-A,RNP,ovalbumin,thyroglobulin,cardiolipin)に対する結合性をELISAにより調べた。(3) 抗DNA抗体活性の測定:Fabの抗ds-DNA抗体活性を濃度希釈によるクリチジアの蛍光抗体法(kinetoplastの特異蛍光)で確認した。(4) Fabの電荷測定:等電点泳動法によりFabの電荷を測定した。(5) 抗体のVH, VL領域の塩基配列:各Fabクローンの塩基配列を、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerにより解析し、これまで報告されているgermline遺伝子と比較した。

(結果と考察)

固相化したDNAに対して結合活性を示す8個のFabクローン(1-1,1-3,3-2,3-9,5-1,5-9,7-4,7-11)が得られ、ELISA分析では各FabクローンのDNAに対する特異性は高いが、SS-A,U1-RNPなどに対する結合性は低かった。クリチジ

アの蛍光抗体法でこれらのFabクローンが高活性の抗ds-DNA抗体であることを確認した。等電点泳動法にて抗ds-DNA抗体活性の高いFabクローンが陽イオン化していることを明らかにした。塩基配列解析により、これら抗ds-DNA Fab クローンのVHの可変領域はほぼ同一で、そのVH遺伝子はVH26 germline 遺伝子由来であった。一方軽鎖VLは多様な遺伝子由来で一定性はなかった。結合活性の弱いクローンにはVLのCDR1に陰性荷電のアミノ酸(アスパラギン酸)への変異をみるものがあった。以上より、得られた抗ds-DNA抗体はDNAへの結合特異性が強く、また陽イオン化していて、SLE及びその動物モデルの腎炎で報告されている陽性荷電の抗DNA抗体と同様に病原性を有する抗体である可能性が示唆された。これらのFabのVHはVH26 germline 遺伝子由来であったが、この遺伝子は抗DNA抗体以外にも様々な抗体に使われるので、抗体特異性への関与が少なく、多様性に富むVL遺伝子が抗DNA抗体において重要である可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文ではヒトIgG型抗体産生とその遺伝子解析に有用であるphage-display法を用いて、腎炎を合併する全身性エリテマトーデス患者末梢血リンパ球から高DNA結合活性の抗ds-DNA抗体Fabクローンを得ている。これらのFabクローンの生物学的、化学的性格を明らかにして腎炎発症に果たす役割の一部を示すとともに、FabクローンのVH、VL遺伝子解析によって抗DNA抗体の特性とその意義の一端を明らかにした点で価値ある論文である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。