

|         |         |   |
|---------|---------|---|
| 氏名(本籍)  | なかむらともみ | 中村友美(東京都)   |
| 学位の種類   |         | 博士(医学)  |
| 学位記番号   |         | 博甲第5816号  |
| 学位授与年月日 |         | 平成23年3月25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   |         | 人間総合科学研究科   |
| 学位論文題目  |         | <b>M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体に対するモノクローナル抗体の作製と機能解析</b> |
| 主査      | 筑波大学教授  | 医学博士 二宮治彦   |
| 副査      | 筑波大学准教授 | 博士(医学) 石井朝夫                                       |
| 副査      | 筑波大学講師  | 博士(医学) 森島祐子                                       |
| 副査      | 筑波大学講師  | 博士(医学) 松下昌之助                                      |

## 論文の内容の要旨

### (目的)

シェーグレン症候群 (Sjögren's Syndrome ; SS) は慢性の唾液腺炎、乾燥性角結膜炎を主症状とする自己免疫性疾患であり、涙腺および唾液腺の導管周囲に CD4 陽性 T 細胞を主とした浸潤が認められている。SS では、抗核抗体やリウマトイド因子などの多彩な自己抗体が高頻度に認められる。

M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 (M3R) は、涙腺・唾液腺上皮細胞表面に発現している 7 回膜貫通型 G 蛋白共役受容体 (GPCR) であり、涙液・唾液の分泌を促す。M3R の第 2 細胞外領域 (M3R<sup>2nd</sup>) は、細胞内へのシグナル伝達に重要な部位であり、近年では SS 患者および小児発症 SS 患者血清中に M3R<sup>2nd</sup> に対する自己抗体 (抗 M3R<sup>2nd</sup> 抗体) が検出されている。GPCR における第 2 細胞外領域は、自己免疫疾患において自己抗体の存在が報告されており、自己免疫疾患の病因抗体となりうる可能性が考えられている。さらに、SS 患者血清 IgG を用いた機能解析の報告では、ヒト唾液腺 (human salivary gland) 細胞の細胞内シグナルを抑制する報告があり、抗 M3R 抗体はアゴニストに対して細胞内シグナル伝達を抑制するような機能を有する可能性が示唆されている。本研究では、抗 M3R<sup>2nd</sup> 抗体陽性の SS 患者血清 IgG と、M3R 特異的アゴニストである塩酸セビメリン、および HSG 細胞を用いた抗体の機能解析、さらに、抗 M3R<sup>2nd</sup> モノクローナル抗体を作製し、詳細な抗 M3R<sup>2nd</sup> 抗体の機能の解析を目的とした。

### (対象と方法)

- ① 成人 SS 患者 105 名、および健常人 70 名の血清、抗原として M3R<sub>25</sub> および、コントロールペプチド (Neg<sub>25</sub>: SGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS) を用いて ELISA にて抗 M3R<sub>25</sub> 抗体価の測定および抗 M3R<sub>25</sub> 抗体陽性率を検定した。
- ② 抗 M3R<sub>25</sub> 抗体陽性成人 SS 患者 3 名、陰性成人 SS 患者 3 名、および健常人 3 名の血清 IgG と M3R 特異的アゴニストである塩酸セビメリンを、HSG 細胞へ同時添加したときの細胞内カルシウム濃度を測定した。
- ③ M3R<sub>25</sub> ペプチドまたは 2 コントロール (PBS) と CFA を等量混合して作成したエマルジョンを、6 週令の C57BL/6 マウスの尾部へ 2 週間毎計 3 回皮内注射を行った後、ELISA にて抗 M3R<sub>25</sub> 抗体価の測定を行った。

- ④得られた血清が M3R<sub>25</sub> ペプチド特異的抗体であることを検討するために、M3R の 4 細胞外領域の合成ペプチドを用いた peptide block ELISA を行った。
- ⑤ M3R<sub>25</sub> 免疫マウスの脾細胞とマウスミエロマ細胞を PEG 法にて細胞融合し、HAT 選択培地にてハイブリドーマの生育を行い、抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の選定を ELISA 法にて行った。
- ⑥得られたハイブリドーマの培養上清から、抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体を精製しアイソタイプの検定を行った。
- ⑦ヒトリコンビナント M3R 蛋白 (Hr-M3R) と抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体の結合を、ウエスタンブロット法にて検討した。
- ⑧抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の CDR 領域解析を、アミノ酸シーケンス法にて行った。
- ⑨得られた抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体が、M3R<sub>25</sub> ペプチド特異的抗体であることを検討するために、M3R の 4 細胞外領域における合成ペプチドを用いた peptide block ELISA を行った。
- ⑩ HSG 細胞を 96 ウェル遮光プレートで 48 時間培養後、モノクローナル抗体と 12 時間共培養を行い、カルシウムプローブである Fluo-3 を添加後セビメリン刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  を測定した。

#### (結果)

- ① SS 患者血清中抗 M3R<sub>25</sub> 抗体価 ( $0.166 \pm 0.152$ ) は、健常人 ( $0.135 \pm 0.08$ ) と比較して高い傾向が認められた ( $p > 0.05$ )。また、抗 M3R<sub>25</sub> 抗体陽性率 (14%) は、健常人 (3.0%) と比較して有意に高頻度であった ( $p = 0.0239$ )。
- ②抗 M3R<sub>25</sub> 抗体陽性 SS 患者の血清 IgG の症例では、抗 M3R<sub>25</sub> 抗体陰性成人 SS 患者および健常人血清 IgG の症例と比して、塩酸セビメリン刺激による細胞内カルシウム濃度の増強または抑制が認められた。
- ③ M3R<sub>25</sub> ペプチド免疫マウス血清中の抗 M3R<sub>25</sub> 抗体価は、コントロールと比較して免疫回数依存的に上昇した。
- ④ M3R<sub>25</sub> ペプチド免疫マウス血清 IgG は、M3R<sub>25</sub> ペプチドの濃度依存的に吸光度の減少が認められた ( $p < 0.05$ )。
- ⑤抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローンは 4 クローン (S66, S112, S118, S138) 得られた。
- ⑥すべての抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体のアイソタイプは IgG2b であった。
- ⑦すべての抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体は、Hr-M3R と結合した。
- ⑧ S66, S112, S138 は、同一クローン (VH558, V $\kappa$ 19) であり、S118 は別クローン (VH3609, V $\kappa$ 21) であった。
- ⑨ S112 および S118 由来の抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体は、M3R<sub>25</sub> ペプチドの濃度依存的に吸光度の減少が認められた ( $p < 0.05$ )。
- ⑩ S112 および S118 由来の抗 M3R<sub>25</sub> モノクローナル抗体と共培養した HSG 細胞は、塩酸セビメリン刺激による細胞内シグナルを抑制した ( $p < 0.05$ )。

#### (考察)

抗 M3R<sup>2nd</sup> モノクローナル抗体は、塩酸セビメリンの刺激による細胞内シグナルを抑制した結果より、SS 患者血清中の M3R<sup>2nd</sup> 抗体が唾液腺上皮細胞上に発現している M3R からの細胞内シグナルを阻害している可能性が示唆された。SS 症候群を含めて、抗体が少なくとも一部の自己免疫病態に関与していることが示唆される。

### 審査の結果の要旨

1. SS 患者において、少なくとも一部の患者において M3R<sup>2nd</sup>Loop に対する自己抗体が存在することを

ELISA において示している。しかしながら、臨床病態にどのような関連性があるかについては、さらに症例数の追加しての検討が必要である。

2. 得られた2種のモノクローナル抗体は、M3R2ndLoop を介した刺激系において共に抑制的に作用することを *in vitro* で証明した。HSG 細胞をセビメリン刺激によって細胞内Cイオンの増加を指標としているが、この M3R2ndLoop を抑制することが外分泌に抑制的に作用するかについては証明していない。
3. この得られた抗体を如何に臨床あるいは研究に応用できるかについての具体的展望が明らかでないが、少なくともこの抗体が認識する受容体は SS 症候群の臨床病態に重要な役割を果たしていると考えられ、症例数の追加や特異的な自己抗体の検出系の開発への応用を期待する。一部論文の修正を必要としたが、貴重な研究結果を提供したと考えられる。

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。