【294】

氏　名（本籍）	坪　井　洋　人（茨　城　県）
学位の種類	博　　士（医　　学）
学位記番号	博　甲　第　5815　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	**New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome** （シェーグレン症候群における抗 M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体抗体のエピトープと機能解析）

主　　査	筑波大学教授	博士（医学）	渋　谷　　彰
副　　査	筑波大学准教授	博士（医学）	楊　　景　堯
副　　査	筑波大学准教授	医学博士	坂　本　　透
副　　査	筑波大学講師	博士（医学）	三　島　　初

論文の内容の要旨

（目的）

シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome; SS）は唾液腺炎・涙腺炎を主体とし、様々な自己抗体の出現がみられる自己免疫疾患である。SS では外分泌腺へのリンパ球浸潤に加えて、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体、リウマトイド因子といった種々の自己抗体が検出されるが、SS に特異的な病因抗体はいまだ同定されていない。

近年、SS 患者において、外分泌腺に発現し、腺分泌に重要な役割を果たす M3 ムスカリン作働性アセチルコリ受容体（M3 muscarinic acetylcholine receptor ; M3R）に対する自己抗体の存在が報告されている。

抗 M3R 抗体は、M3R を介する平滑筋収縮や唾液腺細胞内 Ca 濃度上昇を抑制する可能性が複数の先行研究で示されている。しかしながら、抗 M3R 抗体の正確なエピトープおよび機能との関連はいまだ明らかにされていない。

そこで本研究では、SS 患者において、抗 M3R 抗体のエピトープと機能を明らかにすることを目的とした。

（対象と方法）

1）ヒト M3R の 4 つの細胞外領域（N 末端、第 1、2、3 細胞外ループ）の合成ペプチドを作成した。これらのペプチドを抗原として、SS 患者 42 例（1 次性 15 例、2 次性 27 例）および健常人（HC）42 例の血清中抗 M3R 抗体価を ELISA で測定し、臨床像との関連を検討した。

2）ヒト唾液腺（Human salivary gland: HSG）上皮細胞株を抗 M3R 抗体陽性 SS、陰性 SS、HC の血清から精製した IgG（1.0 mg/ml）と 12 時間共培養した。Ca の蛍光プローブである Fluo3 を添加後、M3R アゴニストの塩酸セビメリン（20mM）で刺激し、HSG 細胞内 Ca 濃度変化を蛍光プレートリーダーで測定した。

（結果）

1）すべての細胞外領域に対して、抗 M3R 抗体の抗体価は HC と比較して、SS 患者で有意に高値であった（$P<0.05$）。HC における平均値 +2SD をカットオフレベルとしたときの抗体陽性率は、N 末端領域は SS 患者

42.9％（18/42 例）、HC4.8％（2/42 例）、第 1 細胞外ループはそれぞれ 47.6％（20/42 例）、7.1％（3/42 例）、第 2 細胞外ループは 54.8％（23/42 例）、2.4％（1/42 例）、第 3 細胞外ループは 45.2％（19/42 例）、2.4％（1/42 例）であり、すべての細胞外領域に対して、抗 M3R 抗体の陽性率も HC と比較して、SS 患者で有意に高値であった（P<0.05）。また、多くの SS 患者において、M3R の複数の細胞外領域を認識する抗 M3R 抗体が存在することが明らかとなった。抗 M3R 抗体陽性と陰性の SS を比較すると、抗 M3R 抗体陽性 SS は罹病期間が有意に短く、抗 SS-A 抗体陽性率および血清 IgG が有意に高値であった。唾液分泌・涙液分泌・口唇唾液腺生検での病理組織像を含めて、他の臨床像には有意な差はみられなかった。

2）第 2 細胞外ループに対する抗 M3R 抗体陽性 SS の IgG（N=2）は、HC の IgG（N=1）と比較して、塩酸セビメリン刺激後の細胞内 Ca 濃度上昇を有意に抑制した（P<0.05）。一方 N 末端および第 1 細胞外ループに対する抗 M3R 抗体陽性 SS の IgG（それぞれ N=1）は Ca 濃度上昇を有意に増強した（P<0.05）。第 3 細胞外ループに対する抗 M3R 抗体陽性 SS および抗 M3R 抗体陰性 SS の IgG（それぞれ N=1）は Ca 濃度上昇に影響しなかった。

（考察）

本研究により、M3R の 4 つの細胞外領域（N 末端領域、第 1、第 2、第 3 細胞外ループ）すべてが抗 M3R 抗体のエピトープとなることが示された。また、抗 M3R 抗体の細胞内 Ca 濃度上昇に対する影響は、エピトープにより異なる可能性も示された。

平滑筋細胞や唾液腺細胞を用いた機能解析や M3R 発現細胞を用いたフローサイトメトリーによる抗 M3R 抗体の検出は、手技が煩雑であり、多数例の解析や、日常診療への応用は困難である。一方、本研究で確立した ELISA による検出は、簡便であり、多数例の解析も可能である。今後、より多数例の SS 患者での測定を行い、臨床像との関連を明らかにしていく必要がある。また、関節リウマチや全身性エリテマトーデスといった他の自己免疫疾患においても抗 M3R 抗体を測定し、疾患特異性に関して検討する必要がある。

機能解析に関しては、エピトープにより異なった細胞内シグナルへの影響を与える分子メカニズムは不明である。第 1 に、抗 M3R 抗体が直接 M3R の細胞内へのシグナル伝達に影響する可能性、第 2 に、抗 M3R 抗体が M3R へのアゴニストの結合に影響する可能性、第 3 に、抗 M3R 抗体が M3R の細胞表面への発現に影響する可能性が考えられる。今後、これらの点についての解析が必須である。

抗 M3R 抗体は複数のエピトープを有し、M3R を介する唾液分泌に影響する可能性が示唆された。また唾液分泌への影響は、抗 M3R 抗体のエピトープにより異なる可能性も示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はシェーグレン症候群の自己抗体である抗 M3R 抗体のエピトープを初めて明らかにし、その機能を解析したもので、本疾患の病態の解明や分子標的療法の開発を行う上で有意義な極めて価値の高い論文である。

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。