

氏名	土井 昭宏		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第	7915	号
学位授与年月	平成 28年 7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	Random Peptide Display Library 法を用いた全身性エリテマトーデス患者の血清中に存在する未知自己抗体の探索		
主査	筑波大学教授	薬学博士	金保 安則
副査	筑波大学教授	Doctor of Public Health	我妻 ゆき子
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	渋谷 和子
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	臼井 丈一

### 論文の内容の要旨

土井昭宏氏の博士学位論文は、全身性エリテマトーデスの診断に応用可能な、新規自己抗体および対応抗原を同定することを目的としたものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的) 土井昭宏氏は、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus; 以下 SLE) の診断に応用可能な、新規自己抗体および対応抗原を同定することを目的に研究を開始した。土井昭宏氏の所属する研究部では、Random Peptide Display Library 法により、SLE 患者の血清中に含まれる IgG と特異的に結合するペプチドを発現する大腸菌クローンを解析し、患者に特異的に発現するタンパク質を同定している。その先行研究の結果、候補タンパク質の一つとして KIR3DL1 が得られている。KIR3DL1 は NK 細胞の膜上に発現する抑制型の受容体である。土井昭宏氏は、KIR3DL1 に対する自己抗体が SLE 患者の血清中に存在する可能性について検討するため、ELISA 解析により SLE 患者の血清の自己抗体活性を解析した。

(対象と方法) Strep-tag 付きリコンビナント KIR3DL1-EGFP および EGFP タンパク質を、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムにより発現させ、精製を行った。各タンパク質を、strep-tag と結合するストレプトアビジンがコートされた ELISA プレートに結合させた。これらのプレートを用いた ELISA 解析で、SLE 患者、関節リウマチ患者、および健常者の各血清が KIR3DL1 と特異的な結合を示すかについて解析を行った。強い自己抗体活性を示した 2 名の SLE 患者の血清に対して、Bw4 あるいは抗 KIR3DL1 抗

## 審査様式 2 - 1

体との結合に関与するアミノ酸を含む、KIR3DL1 特異的な配列を持つ 10 アミノ酸からなるペプチドを用いて、ELISA 吸収実験を行った。

**(結果)** 土井昭宏氏は、KIR3DL1 に対する自己抗体が SLE 患者の血清中に存在する可能性を明らかにするため、ELISA 解析により各血清の自己抗体活性を解析した。その結果、KIR3DL1 に対する自己抗体が、高い陽性率で SLE 患者の血清中に存在していることを明らかにした。SLE 患者の血清は、関節リウマチ患者および健常者の血清と比較して、統計的に有意に KIR3DL1 に対する自己抗体活性を示した。SLE 患者の約 80%は KIR3DL1 に対する自己抗体が陽性であり、とりわけ、疾患発症時で治療前の SLE 患者では約 90%が陽性を示した。一方、関節リウマチ患者および健常者における陽性率はそれぞれ、約 25%および 0%だった。ELISA 吸収実験の結果から、Bw4 および抗 KIR3DL1 抗体との結合に関与する、KIR ファミリーの中で特異的なアミノ酸残基を含む KIR3DL1 のペプチド配列が、SLE 患者の血清との結合に関与していることが示唆された。

**(考察)** 本研究において土井昭宏氏は、疾患発症時/治療前の SLE と関連し得る抗 KIR3DL1 自己抗体の存在を初めて明らかにした。疾患発症時/治療前に採血した SLE 患者における抗 KIR3DL1 自己抗体の陽性率は既存の診断マーカーと同程度であることから、抗 KIR3DL1 抗体の検出は、SLE の新規診断マーカーとしての応用が期待される。今後、同一患者で治療前後での ELISA score の変動を解析すると共に、SLEDAI を指標とした疾患活動性の亢進/低下と ELISA score との関連についての詳細を明らかにする必要がある。

土井昭宏氏が得た研究結果から、KIR3DL1 の D0 および D1 ドメインにおける Bw4 および抗 KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸を含む KIR3DL1 特異的な配列が、SLE 患者の血清中に存在する自己抗体との結合に重要な関わりを持っていることが示唆された。今後、各ドメインあるいは複数のドメインを組み合わせたリコンビナントタンパク質を用いた吸収実験を行うことで、SLE 患者の自己抗体に大きく関わる KIR3DL1 のドメイン、および抗原決定基を特定する必要がある。SLE の活動性と抗 KIR3DL1 自己抗体の活性との関連は見られなかったが、抗 KIR3DL1 自己抗体は KIR3DL1 の Bw4 結合部位に結合し、NK 細胞の正常な機能を阻害する可能性がある。自己免疫疾患患者の血中に存在する抗 KIR3DL1 自己抗体が、KIR3DL1 を発現する NK 細胞にどのような影響を及ぼすのか等、KIR3DL1 と疾患との関連についての詳細は、今後の検討課題である。

## 審査の結果の要旨

**(批評)** これまでに、KIR3DL1 の多型および頻度と自己免疫疾患との関連については報告されているが、本研究では土井昭宏氏は抗 KIR3DL1 自己抗体の存在を初めて明らかにした。抗 KIR3DL1 自己抗体は既存の SLE 診断マーカーと比較しても同等の陽性率を示したことから、臨床への応用が可能な新規自己抗体を発見した点が評価できる。今後同一の SLE 患者で治療前後の抗体活性を解析し、さらに、抗 KIR3DL1 自己抗体が NK 細胞の機能に及ぼす影響を明らかにすることで、新規 SLE 診断マーカーへの応用、および KIR3DL1 と SLE との関連の解明につながるものと期待できる。

平成 28 年 6 月 2 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求

## 審査様式 2 - 1

め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。  
よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。