

筑波大学

博士（医学）学位論文

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

2016

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

土 井 昭 宏

目次

1. 実験背景および目的	3
1-1. 自己免疫疾患について	3
1-2. 全身性エリテマトーデスについて	4
1-3. Natural killer細胞について	5
1-4. キラー細胞免疫グロブリン様受容体ファミリーについて	6
1-5. NK細胞と自己免疫疾患との関連	7
1-6. KIRファミリーと自己免疫疾患との関連	8
1-7. 本研究の目的および研究意義	9
2. 材料と方法	12
2-1. 患者検体	12
2-2. RPDL法によるSLE患者の血清中に存在する未知自己抗体 の探索	12
2-3. リコンビナントタンパク質の発現および精製	14
2-4. ELISA法によるSLE患者の血清中に存在する抗KIR3DL1 自己抗体の検出	14
2-5. KIR3DL1の抗原決定基を含むペプチドを用いた ELISA吸収実験	15
2-6. 統計解析	16

3. 結果	17
3-1. RPD法によるSLE患者の血清中に存在する新規自己抗体 の同定	17
3-2. SLE患者および非SLE患者の血清を用いた抗KIR3DL1 自己抗体活性の解析	18
3-3. KIR3DL1の抗原決定基を含むペプチドを用いた ELISA吸収実験	20
4. 考察	22
4-1. SLE患者の血清中に存在する抗KIR3DL1自己抗体について	22
4-2. SLE患者の血清中に存在する自己抗体のKIR3DL1 結合部位について	23
4-3. SLE患者の血清中に存在する自己抗体がKIR3DL1 ⁺ NK細胞の 細胞傷害活性に与える影響について	25
5. 謝辞	28
6. 図表の説明	29
7. 参考文献	36
図表	46

1. 実験背景および目的

1-1. 自己免疫疾患について

自己免疫疾患は正常な生体機能を阻害する自己抗体の産生および、Th17 (**T** helper **17**) 細胞などの炎症性T細胞による、正常の細胞および組織に対する炎症性の傷害によって引き起こされる [1]。また、自己免疫疾患には主としてT細胞の自己寛容の機構の破綻が大きく関わっている。すなわち、自己寛容の維持および組織の炎症に対する防御機構に重要な働きを持つ制御性T細胞 (**R**egulatory **T** cell; Treg) と、炎症性サイトカインの産生に関わるTh17 との調和が崩れ、正常細胞および組織の損傷が進行することで、自己免疫疾患が発症する [2, 3]。このような免疫応答の異常に伴い、B細胞から自己抗体が産生され、組織の炎症および損傷が促進される [1]。自己免疫疾患はその標的組織や症状が多岐にわたり、特定の臓器を標的とする疾患がある一方、全身を標的とする疾患もある [1]。とりわけ、生体維持の基本機能に関わる組織が標的となる場合、疾患の進行によって生命が脅かされる [4]。多くの自己免疫疾患では女性の発症頻度が男性と比べて高い [5, 6]。

自己免疫疾患に対する感受性は家族性を示し、その感受性に影響を及ぼす最も重要な遺伝因子は、ヒト白血球型抗原 (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen; HLA) 複合体である [7, 8]。HLAはヒトゲノムの中で最も多型性に富み、ヒト免疫応答や免疫関連疾患の発症を制御する遺伝子である [7]。血縁関係のない患者と健常者とを比較した研究で得られた結果から、自己免疫疾患は多型に富むHLAクラスIおよびクラスIIの対立遺伝子と最も強い相関を示すが、腫瘍壊死因子 α (**T**umor **N**ecrosis **F**actor- α ; **TNF** $\cdot\alpha$) のような他の遺伝子の多型との強い相関はみられていない [9, 10]。

1-2. 全身性エリテマトーデスについて

全身性エリテマトーデス (**S**ystemic **L**upus **E**rythematosus; **SLE**) は、臨床的および血清学的に最も多様と言える自己免疫疾患であり、これまでに 100 種類以上の自己抗体がSLE患者の血清中から見つかった [11]。SLE患者の血清中に存在する自己抗体は、核、細胞質、細胞膜、リン脂質、内皮細胞、および赤血球など多種多様な抗原を標的とし、その病態についても、軽い症状から生命を脅かす多臓器不全まで様々である。自己抗体の産生、免疫複合体の沈着、および補体の活性化を含めたSLEの特徴的な症状は、免疫異常に伴って生じると考えられている [12]。細胞表面に自己抗体が結合した場合、細胞および組織の損傷の原因となる炎症反応が生じる。さらに、この過程で可溶性の細胞内抗原が放出され、それが可溶性の免疫複合体を形成する。この免疫複合体が血管、腎臓、関節などの組織に沈着し、さらなる炎症反応を引き起こす結果、自己成分に免疫応答がより反応しやすい環境がもたらされる。このように、SLEは全身の組織を巻き込み、異常な自己免疫応答がさらなる自己免疫を刺激することで、免疫系が制御不能になる炎症性疾患である。SLEはアフリカやアジアに起源を持つ出産適齢期の女性に特に多く、罹患率は 10 万人あたり 4.3–150 人である [13–16]。SLEを引き起こす、自己免疫の引き金となる詳細な要因は未だ明らかになっていない。

SLEの症状は多岐にわたり、突発性の炎症期と比較的沈静した時期を交互に繰り返すため、診断および治療が困難である。SLEの一般的な症候には、顔面に現れる蝶形紅斑、関節炎、筋肉痛、漿膜炎、および腎炎などがある。寛解率はとても低く、多くの患者は持続的な炎症症状に苦しんでいる。SLEに対する現在の治療法としては非ステロイド系の抗炎症薬、抗マラリア薬、およびコルチコステロイドが使用され、これにより症状を和らげることができるが、SLEの進行を抑えるにはより強力な薬剤が必

要となる。さらに、多くの薬剤、とりわけコルチコステロイドには副作用があるため、長期の服用が制限される [16–19]。

SLEの診断には米国リウマチ学会の分類基準に基づいた診断 [20] が、これまでに用いられている。しかしながら、その診断基準は皮膚ループスに重点が置かれており、神経症状を含めた他臓器の疾患が見過ごされるといった問題がある [21]。さらに、血清学的診断基準で現在用いられている自己抗体-抗原の組み合わせは約 6 種類に限られており（抗二本鎖DNA抗体、抗Sm抗体、抗ヌクレオソーム抗体、抗リン脂質抗体、抗ヒストン抗体、抗SSA抗体）、未だ十分な特異性が得られていないため、診断の遅れが生じやすいといった問題も指摘されている [17, 21]。

1-3. Natural killer細胞について

Natural killer (NK) 細胞は自然免疫応答に重要な働きを持つリンパ球であり、癌細胞およびウイルス感染細胞を含めた異常細胞の認識および排除に関わる他、骨髄移植の際の拒絶反応にも関わる [22–24]。NK細胞は細胞膜に発現しているリガンド結合性受容体群を持ち、それらの受容体群が伝達するシグナルによりNK細胞の増殖、傷害活性、および種々のサイトカインの産生が制御されている [25]。NK細胞の受容体は、異常のある抗原提示細胞の細胞膜に発現している、主要組織適合遺伝子複合体 (**Major Histocompatibility Complex; MHC**) クラスIと結合する [24]。ヒトのMHCはHLAと呼ばれ、古典的HLAクラスI分子としてHLA-A, B, Cが知られている [26]。NK細胞の受容体は構造の違いにより、NK細胞免疫グロブリン様受容体とNK細胞レクチン様受容体の 2 種類に大きく分類される。抑制性NK細胞受容体のほとんどはMHCクラスIをリガンドとするものであるが、カドヘリンやコラーゲンのような、体

内に普遍的に発現する分子をリガンドとする受容体もこれまでに見つかった [25, 27–30]。

NK細胞の活性は細胞膜上で発現する、異なる受容体による活性型および抑制型シグナルのバランスによって制御されており、NK細胞が持続的に出すシグナルは抑制型が優勢である。ウイルス感染および癌化の過程で自己のMHCクラスIの発現量が低下すると、NK細胞が活性化する [24]。このように、MHCクラスIの発現量の低下をNK細胞が認識し、その活性を制御する機構は、「ミッシングセルフ仮説」として説明されている [31]。

1-4. キラー細胞免疫グロブリン様受容体ファミリーについて

キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (**K**iller-cell **I**mmunoglobulin-like **R**eceptor; KIR) ファミリーおよびそれに関連した HLA クラス I リガンドは、NK 細胞による免疫応答の制御に極めて重要である [32]。KIR ファミリーには活性型受容体 (*KIR3DS1*, *2DS1–5*)、抑制型受容体 (*KIR3DL1–3*, *2DL1–3*, *2DL5*)、活性型と抑制型の両方の性質を持つ受容体 (*KIR2DL4*) をそれぞれコードする 14 個の遺伝子、および活性のない偽遺伝子 (*KIR2DP1*, *3DP1*) が、これまでに見つかった [33]。

抑制型の KIR 受容体は、それぞれ異なる HLA クラス I 分子を認識し、NK 細胞の傷害活性を抑制するシグナルを出す [33]。KIR2DL1 は 80 番目にリジン残基を持つ HLA-C アロタイプ (HLA-C2) を、KIR2DL2, 3 は 80 番目にアスパラギン残基を持つ HLA-C アロタイプ (HLA-C1) を、それぞれ認識する。KIR3DL1 は、77–83 番目のアミノ酸配列に Bw4 の血清学的な抗原決定基を持つ HLA-A, B アロタイプに結合する [33, 34]。また、KIR3DL2 は限られた特異性を持ち、エプスタイン・バーウイルス

ス由来の特定のペプチドと HLA-A3 あるいは HLA-A11 との複合体を認識することが、これまでに明らかになっている [34]。

活性型 KIR (KIR3DS1, 2DS1-5) のリガンドは未だ明らかになっていない。KIR3DS1 は Bw4 との結合性がみられていないが [35]、細胞外免疫グロブリンドメインにおける KIR3DL1 とのアミノ酸配列の相同性が約 95%であるため、HLA-Bw4 と弱く結合する可能性がある [36]。同様に、KIR2DS1 (KIR2DL1 の相同体) および KIR2DS2 (KIR2DL2 の相同体) は、HLA-C2 および HLA-C1 に、それぞれ弱い結合性を示すと考えられている [37, 38]。

1-5. NK細胞と自己免疫疾患との関連

自己免疫疾患は標的臓器からの自己抗原の放出、免疫細胞の標的組織へのホーミング、および組織の破壊などといった段階を経て発症するが、NK 細胞はその全ての段階に関与し得る [39, 40]。様々な自己免疫疾患患者において、NK 細胞の頻度および機能の異常が観察され、SLE 患者、強皮症患者、およびシェーグレン症候群患者で、NK 細胞の減少あるいは機能の低下が報告されている [41-43]。SLE 患者では NK 細胞の減少および活性の低下に伴ってインターフェロン γ (IFN $\cdot\gamma$) が増加し、病態の悪化に関与することが示されている [44, 45]。また、SLE のモデルマウスとして、*lpr* 遺伝子ホモ接合型マウスを用いた研究では、NK 細胞を除去することで病態が悪化し、反対に、NK 細胞を注入することで病態が改善された [46]。これらの結果から、NK 細胞は SLE などの自己免疫疾患の病態に対して抑制的に働くことが考えられる。一方で、重症筋無力症のモデルマウスを用いた実験では、NK 細胞を除去することで病態が抑えられることが報告されている [47]。また、関節リウマチ (RA) 患者では、炎症

の起こっている関節組織で、NK 細胞の IFN- γ 産生能が血中の NK 細胞よりも高くなっていることが報告されている [48, 49]。このように、NK 細胞が病態の悪化に関与することが示唆されている自己免疫疾患の例も存在するなど、NK 細胞の病態への作用機序は疾患によってそれぞれ異なっている。

NK 細胞の免疫調節機構の破綻は、傷害活性抑制型シグナルの阻害、および NK 細胞による過剰なサイトカインの産生によって引き起こされる。NK 細胞の傷害活性抑制型シグナルが阻害される要因として、活性型シグナルが抑制型シグナルよりも優勢になること、あるいは自己抗体が NK 細胞に結合することが考えられる。NK 細胞が産生するサイトカインとしては、IFN- γ 、TNF- α 、およびインターロイキン 10 (IL-10) などが挙げられ、これらのサイトカインが他の免疫細胞を活性化することで、細胞傷害あるいは炎症が誘発される [50]。

これまでの臨床研究から、NK 細胞の頻度あるいは活性と疾患との相関はみられているが、NK 細胞がどのように自己免疫疾患を引き起こすのか、などといった詳細な機序は未だ明らかになっていない。

1-6. KIRファミリーと自己免疫疾患との関連

NK細胞で主に発現する抑制型および活性型KIRは、MHCクラスI分子を認識する、相同性の高い受容体ファミリーに属する。MHCクラスI分子と結合する、活性型および抑制型NK細胞受容体をコードする遺伝子およびアレルの多様性によって、個人間の差異が生じる [50, 51]。そのため、*KIR/MHC* クラスIの遺伝的背景が自己免疫疾患の発症および重症化にどのような影響をもたらすかに関する研究が多数行われている [50]。

皮膚の水疱を特徴とする落葉状天疱瘡では、活性型および抑制型*KIR*の遺伝子頻度を解析した結果から、抑制型*KIR*の頻度の高さと病態との関与が報告されている [52]。また、顕微鏡的多発血管炎の日本人患者の遺伝子解析から、NK細胞の活性を最も抑制する*KIR3DL1*と*HLA-Bw4*との組み合わせを持った個体で、疾患が好発することが示されている [53, 54]。SLEに関する解析では、活動性のあるSLE患者で*KIR2DL1*の発現が低かった一方、*KIR3DL1*の発現量は健常者と比較して有意な差がなかったという報告がされている [45]。

自己免疫疾患に関与する因子として、*KIR/MHC* クラスIに関する遺伝子背景の他、*KIR*タンパク質に対する自己抗体についても報告されている。自己免疫疾患患者で見つかったリンパ球に対する自己抗体 [55] に着目した研究から、NK細胞で発現する*KIR2DL1*に対する自己抗体をMatsuiらが発見している [56]。*KIR2DL1*に対する自己抗体はSLE患者、RA患者、およびベーチェット病患者の血清中から検出されたが、その陽性率は20–30%と比較的低いものだった [56]。*Bw4*と結合する*KIR3DL1*に対する自己抗体が自己免疫疾患患者の血中に存在しているかは未だ明らかになっていない。

1-7. 本研究の目的および研究意義

自己免疫疾患の代表的疾患であるSLEの診断および病勢予測は、尿検査と血算、および自己抗体の臨床検査により行なわれている。病態との関連性が認められる、利用可能な自己抗体-抗原の組み合わせは、約6種類（抗二本鎖DNA抗体、抗Sm抗体、抗ヌクレオソーム抗体、抗リン脂質抗体、抗ヒストン抗体、抗SSA抗体）である [17, 21]。しかしながら、臨床検査に利用可能な未知の自己抗体は、現在用いられている抗体よ

りも数多く存在すると考えられる。そのため、疾患発症時あるいは寛解期などの病態に関連する自己抗体-抗原の組み合わせを見つけることは、患者病勢を正確に把握する上で重要である。そこで本研究では、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とした。

未知のタンパク質-タンパク質相互作用、とりわけモノクローナル抗体が結合するペプチド配列の解析手法として、**R**andom **P**eptide **D**isplay **L**ibrary (RPDL) 法がLuらによって開発された [57]。RPDL法ではそれぞれ異なるペプチドを大腸菌の膜上に提示させるために、**pFliTrx**プラスミドDNAが組み込まれた大腸菌を用いる (図 1)。ペプチドは大腸菌のべん毛タンパク質 (フラジェリン; **FliC**) およびチオレドキシン (**TrxA**) の 2 つのタンパク質と融合させて、大腸菌の膜上に発現させる。提示されるペプチドライブラリーの種類は 1.77×10^8 種類以上である [57, 58]。所属する研究部によるRPDL法を用いた先行研究結果から (図 2, 3)、SLE患者の血清中に存在する新規自己抗体の抗原タンパク質の候補の 1 つとして、NK細胞に発現する**KIR3DL1** が同定されている。3 名のSLE患者および健常者の血清を用いた先行研究の結果から、SLE患者特異的な自己抗体に対する**KIR3DL1** の抗原決定基として、表 1, 図 3 に示したペプチド配列が得られている。

これまでに、SLE患者の血清中にNK細胞に結合する自己抗体が存在することが示唆されている他 [59]、自己抗体がNK細胞の活性を阻害することが報告されている [60]。また、リンパ球に自己免疫疾患患者の自己抗体が結合することに着目した研究から、**KIR2DL1, 3** に対する自己抗体がSLE患者、RA患者、およびベーチェット病患者の血清中から見つかっているが、その陽性率は比較的低く、20–30%だった [56]。本研究では、**E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay (ELISA) 法を用いた解析から、

発症時の治療前に採血したSLE患者における陽性率が約90%であり、特異性が高い自己抗体として、抗KIR3DL1抗体の存在を明らかにした。今後、SLE患者の自己抗体と最も強く結合するKIR3DL1の抗原決定基を明らかにすることで、より特異性が高く、迅速な病勢の把握が可能な診断マーカーの開発につなげていくことができると考える。

2. 材料と方法

2-1. 患者検体

国立国際医療研究センター病院には、SLE患者は年間約 40 名、RA患者は年間約 100 名が来院している。2009 年 1 月から 2012 年 12 月の間に来院した患者のうち、病院から提供を受けることができた血清の中から、無作為にサンプルを抽出した。過去の自己抗体の検出に関する文献ではN = 10~30 で行なわれていることを参照し [56, 61]、29 名のSLE患者および 11 名のRA患者の血清を解析した。SLEの診断は、米国リウマチ学会の分類基準に基づき行われた [20]。臨床データは病院の医療記録を提供して頂いた。臨床目的で保管していた血清を、研究目的で保管および使用することに関する同意を患者から頂いた後に、血清を用いた解析を行った。ELISA解析を行った後、病院から臨床情報を得た結果、年齢および採血時の状態（治療前/治療中）の 2 つの要素に関しては、抽出したサンプル内で偏りは見られなかった（表 2）。本研究は、国立国際医療研究センター施設倫理審査会（検体利用委員会）で承認された（承認番号：NCGM-G-001292-00）。

2-2. RPDL法によるSLE患者の血清中に存在する未知自己抗体の探索

所属する研究部では、SLE患者の血清中に存在する未知の自己抗体を探索するため、RPDL法を用いた解析を行った（図 1, 2） [57, 58]。FliTrx Random Peptide Library (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を、キットの手順に従い増幅させた。まず、べん毛タンパク質にペプチドが組み込まれたプラスミドを持つ大腸菌を、100 µg/mL のアンピシリンを含むIMC培地（0.2%カサミノ酸、0.5%グルコース、および 1 mM MgCl₂を含む 1 × M9 塩（1 L当たり 6 g Na₂HPO₄、3 g KH₂PO₄、0.5 g NaCl、およ

び 1 g NH₄Cl)) 中、25°C で増殖させた。ペプチドが融合したタンパク質は、100 µg/mL のトリプトファンを含むIMC培地中で発現させた。ブロッキング溶液 (1% スキムミルク、150 mM NaCl、および 1% α-メチル-D-マンノシド) で大腸菌を洗浄後、SLE患者の血清 150 µl と、室温で 1 時間反応させた。SLE患者の血清は、ペプチドが組み込まれていない、FliTrxタンパク質を発現する大腸菌クローンと予め反応させたものを用いた。その後、血清中の免疫グロブリンG (IgG) と反応したペプチドを持つ大腸菌を回収するため、プロテインGセファロースビーズを大腸菌と 1 時間、室温で反応させた。120 × g で遠心後、ビーズを 1% α-メチル-D-マンノシドを含むIMC培地で 5 回洗浄した。大腸菌を回復させるため、100 µg/mL のアンピシリンを含むIMC培地で一晚培養を行った。同じ患者の血清を用いて同様の手順を 5 回繰り返し、患者の血清中に含まれるIgGと結合したペプチドを持つ大腸菌ライブラリーを濃縮した。およそ 1000 個の単一大腸菌クローンを選択し、各クローンからプラスミドDNAを精製 (QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAGEN, CA, USA) した後、シーケンス解析を行った。シーケンス解析の後、各大腸菌クローンの持つペプチド配列を類推し、その配列と相同性を持つタンパク質を検索するため、**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool (BLAST) 解析を行った。3 名のSLE患者および健常者の血清を用いた解析結果から、SLE患者特異的な自己抗体に対する抗原ペプチド配列として、KIR3DL1 に由来する以下のペプチド配列 (KIR3DL1 の抗原決定基) を得た (表 1, 図 3)。

KIR3DL1 の抗原決定基 (アミノ酸 (aa) の一文字略号で表記した):

GGQD (aa 24–27), GQDKPFLS (aa 25–32), WPSAVVPR (aa 34–41), LRCHYR (aa 47–52), TCRGS (aa 94–98), GSHPHSP (aa 97–103), HSPTG (aa 101–105), GERVI (aa 137–141), MLALAG (aa 186–191), SSRSSY (aa 245–250), SSRSSYDMYHLR

(aa 245–257), HERRLPAVR (aa 262–270), RRLPAV (aa 264–269), RKVNR (aa 270–274), PYEWS (aa 301–305), DPLLVS (aa 309–314), LLFFLLH (aa 355–361), TANSEDSDEQD (aa 382–392), SQRPKTPPTDTIL (aa 415–427)。

2-3. リコンビナントタンパク質の発現および精製

*EGFP*および*KIR3DL1-EGFP*のcDNAを、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム（以下、コムギ胚芽システム）用ベクターであるpEUプラスミドDNAにクローニングした（図 4）。ストレプトアビジンのビオチン結合部位に対して結合能を持つ 8 aa (WSHPQFEK) からなるstrep-tag配列を、各cDNAのC-末端に挿入した。これらのタンパク質発現プラスミドDNAを用いて、過去に報告されている方法に従い [62]、コムギ胚芽システムでタンパク質を発現させた（図 5）。発現させた溶液をstrep-tactin精製レジン (IBA GmbH, Goettingen, Germany) に結合させ、strep-tagのついたリコンビナントEGFP-strep-tag (rEGFP) およびリコンビナントKIR3DL1-EGFP-strep-tag (rKIR3DL1-EGFP) を、デスチオビオチンを含む溶出液を用いて競合阻害で溶出した。各リコンビナントタンパク質の溶出は、**Coomassie Brilliant Blue (CBB)** 染色およびWestern blot解析で確認した（図 6）。Western blot解析における1次抗体として、ウサギ抗GFP抗体 (Medical & Biological Laboratories, Aichi, Japan) およびウサギ抗KIR3DL1抗体 (Proteintech, IL, USA) を用いた。各リコンビナントタンパク質はトリス緩衝生理食塩水 (TBS) で透析を行った後に、ELISA解析の実験に用いた。

2-4. ELISA法によるSLE患者の血清中に存在する抗KIR3DL1自己抗体の検出

各血清のKIR3DL1 に対する結合性はELISA法によって解析した (図 7)。ストレプトアビジンをコートした 96 ウェルプレートの各ウェルに、精製したrKIR3DL1-EGFP またはrEGFPを 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、4°Cで一晩反応させた。0.1% Tween 20 を含むTBS (TBS-T; 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) でウェルを 5 回洗浄した後、5%スキムミルクを含むTBS-Tを用いて、室温で 1 時間ウェルをブロッキングした。血清はTBS-Tで 1000 倍希釈してウェルに添加し、室温で 1 時間反応させた。その後、ウェルをTBS-Tで 5 回洗浄した後、西洋わさびペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgG抗体 (Jackson Immuno Research, PA, USA) をTBS-T で 2000 倍希釈してウェルに添加し、室温で 30 分反応させた。ウェルをTBS-Tで 5 回洗浄した後、TMB基質液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA) を作用させた。呈色反応を 1N HClで終了させ、450 nmにおける吸光度を測定した。rKIR3DL1-EGFPをコートして得られたOD値から、rEGFPをコートして得られたOD値を引いた値をELISA scoreとして算出した。陽性および陰性を決定するためのカットオフ値は、健常者のELISA scoreの (平均値 + 3 \times 標準偏差) より算出し、ELISA score > 0.084 の血清サンプルを陽性とした。

2-5. KIR3DL1 の抗原決定基を含むペプチドを用いたELISA吸収実験

ELISA解析で強い抗KIR3DL1 自己抗体活性を示した 2 名のSLE患者の血清を、TBS-Tを用いて 1000 倍希釈し、10 aaからなるKIR3DL1 の抗原決定基を含むペプチド (Medical & Biological Laboratories, Aichi, Japan) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 37°Cで 30 分間インキュベートした。「材料と方法 2-4.」で示した方法に従い、ELISA解析を行った。ペプチドによる吸収を行って得られたELISA scoreが、吸収を行わずに得られたELISA

scoreに対して減少した割合 (%) を、各ペプチドのELISA score吸収効率として算出した。各ペプチドのELISA score吸収効率は、3回の独立した実験で得られた吸収効率の(平均値 + 標準偏差)で算出した。用いたペプチド配列を表3に示した。

2-6. 統計解析

独立した3回以上の試行で得られたデータに対して統計処理を行った。有意差検定は、Mann-Whitney *U*-testを用いた。 $P < 0.05$ を統計的に有意であるとみなした。

3. 結果

3-1. RPDL法によるSLE患者の血清中に存在する新規自己抗体の同定

これまでに、所属する研究部がRPDL法を用いてスクリーニングを行った先行研究結果から、3名のSLE患者全てに頻繁に現れ、健常者で現れなかった免疫関連タンパク質の候補としてKIR3DL1、CD109などが得られている。本研究では、KIRファミリーであるKIR2DL1, 3に対する自己抗体が、約20–30%の陽性率でSLE患者の血清中に存在するというMatsuiらの研究結果から [56]、KIR3DL1に着目した。

KIRファミリーは免疫グロブリン様の細胞質ドメイン (D0, D1, D2) を持ち、KIR3DL1はD0, D1, D2ドメインを、KIR2DL1, 3はD1, D2ドメインをそれぞれ持つ [63]。これまでに、Sharmaらにより、コンピューター解析からBw4との結合に関与することが示唆されたKIR3DL1のアミノ酸が同定されている。そのアミノ酸を置換したKIR3DL1の変異体とBw4との相互作用の解析から、Bw4との結合に関与するKIR3DL1のアミノ酸が報告されている。さらに彼らは、KIR3DL1/KIR3DS1の自然変異で変異体を用いた抗KIR3DL1抗体との相互作用の解析から、抗KIR3DL1抗体との結合に関与するKIR3DL1のアミノ酸についても報告している [64]。RPDL法で同定されたKIR3DL1の抗原決定基は、KIR2DL1, 3が持つアミノ酸配列と同一である可能性が考えられる。とりわけ、Bw4あるいは抗KIR3DL1抗体との結合に関与するアミノ酸を含む抗原決定基が、KIR3DL1特異的な配列であることを確かめる必要がある。そこで、KIR3DL1の抗原決定基とKIR2DL1, 3のアミノ酸配列との同一性を確認するため、BLASTによる解析を行った。その結果、KIR3DL1の抗原決定基のうち、Bw4との結合に関与するアミノ酸 [64] は、同一性検索の結果から対応するKIR2DL1, 3のアミノ酸とは一致しなかった (表1, 図8, 9)。また、KIR3DL2, 3に関しても、同

様の相同性解析結果が得られた (図 10)。KIR3DL1 の相同体である KIR3DS1 についても、BLASTを用いた相同性解析を行った結果、KIR3DL1 と KIR3DS1 は 95%と高い相同性がみられた (図 11)。表 4 に示したように、今回RPDL法で見つかった KIR3DL1 の抗原決定基の中で、Bw4 との結合に関与するアミノ酸および抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸を含む配列である”ML*/**A*LAG”は、KIR3DS1 では”MRALAG”という配列であった (太字下線: 相同性解析の結果一致しなかったアミノ酸, *: Bw4 との結合に関与するアミノ酸, **: 抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸)。以上のことから、SLE患者の血清に含まれる自己抗体がKIR3DL1 特異的な配列を認識し、RPDL法を用いたスクリーニングによって同定されたことが示唆された。

本研究では、KIR3DL1 に Strep-tag を付加して (rKIR3DL1)、Strep-tag/Strep-tactinシステムで精製したタンパク質を抗原とするELISA解析の系を確立させた (図 7)。しかし、KIR3DL1 は不溶性の性質が強いため [64]、不溶性タンパク質の合成に適しているコムギ胚芽合成システム (図 5) [65] を用いても、可溶化率は約 9% だった (図 12)。この課題は、KIR3DL1 にEGFPを融合させたrKIR3DL1-EGFPを用い (図 4, 6)、KIR3DL1 の不溶性の性質を緩和することで解消できた。そこで本研究では、rKIR3DL1-EGFPをELISAプレートにコートして得られたOD値から、rEGFP をコートして得られたOD値を差し引くことで各血清サンプルのELISA scoreを求め、各血清のKIR3DL1 特異的な結合を解析した。

3-2. SLE患者および非SLE患者の血清を用いた抗KIR3DL1 自己抗体活性の解析

無作為に選んだ 29 名の SLE 患者、11 名の RA 患者、および 17 名の健常者の血清サンプルを用いて、ELISA 法で各血清の抗 KIR3DL1 自己抗体活性を解析した。rKIR3DL1-EGFP を用いて得られた OD 値から、rEGFP を用いて得られた OD 値を差し引くことで、KIR3DL1 に特異的に結合して得られた OD 値を算出し、各血清サンプルの ELISA score とした。SLE 患者 (N = 29)、RA 患者 (N = 11)、および健常者 (N = 17) の血清中に含まれる抗 KIR3DL1 自己抗体の ELISA score の平均は、それぞれ 0.30 (0.053–1.83)、0.068 (–0.031–0.24)、および 0.024 (–0.0079–0.051) であった (図 13)。SLE 患者の血清を用いた ELISA score は、RA 患者および健常者と比較して統計的有意に高くなった ($P < 0.001$ (SLE 患者 vs RA 患者) および、 $P < 0.0001$ (SLE 患者 vs 健常者))。RA 患者と健常者との間では ELISA score に関する統計的有意差は見られなかった ($P = 0.23$)。さらに、表 2 に示した SLE 患者の採血時の状態に基づき、「発症時あるいは再燃時/治療前」および「治療中/部分寛解」で ELISA 解析の結果を比較した場合、治療前の SLE 患者と治療中の SLE 患者、および治療中の SLE 患者と健常者との間で統計的有意差がみられた (図 14; $P < 0.05$ (治療前の SLE 患者 vs 治療中の SLE 患者) および、 $P < 0.001$ (治療中の SLE 患者 vs 健常者))。

各血清の KIR3DL1 に対する抗体活性の陽性および陰性を決定するため、カットオフ値を健常者の ELISA score の (平均値 + 3 × 標準偏差) より算出し、ELISA score > 0.084 の血清サンプルを陽性とした。その結果、29 名中 24 名 (82.8%) の SLE 患者が KIR3DL1 に対する自己抗体が陽性であり (図 13)、その中で、治療前の SLE 患者 11 名中 10 名 (90.9%) が、治療中の SLE 患者 13 名中 8 名 (61.5%) が、それぞれ陽性だった (図 14)。RA 患者および健常者の陽性率はそれぞれ、27.2% (RA 患者 11 名中 3

名が陽性) および 0% (健常者 17 名全てが陰性) だった (図 13)。

3-3. KIR3DL1 の抗原決定基を含むペプチドを用いた ELISA 吸収実験

SLE患者の血清中に存在する自己抗体がKIR3DL1 の特定の抗原決定基を認識しているかを明らかにするため、ELISA scoreが高かった 2 名のSLE患者の血清 (図 13 中のSLE1およびSLE2) およびKIR3DL1の抗原決定基を含むペプチド (表 3) を用いて、ELISA吸収実験を行った。各ペプチドによるELISA scoreの吸収効率は、「材料と方法 2-5.」で示した方法で算出した。

抗原決定基を含むペプチドとして、本研究ではKIR3DL1 特異的な配列および、Bw4 あるいは抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64] を含む配列に着目した。KIR3DL1 と KIR3DS1 との D2 ドメインにおける相同性が 100% であり (図 11)、また、所属する研究部における予備実験結果から、KIR3DL1 の D0 および D1 ドメインが SLE 患者の自己抗体との結合に重要であることが示唆されている。そこで本研究では、D0 および D1 ドメインにおける抗原決定基に着目して解析を行った。Peptide 1-3 は KIR3DL1 の D0 ドメインに、Peptide 4 は D1 ドメインに、Peptide 5 は D0-D1 ドメインに位置する配列である。また、Peptide 2 および 4 は、Bw4 との結合に関与するアミノ酸を配列中に含み、Peptide 3 および 4 は抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64] を配列中に含む。Peptide 6 は Peptide 4 のスクランブル配列である (表 3)。各ペプチドを用いてELISA吸収実験を行った結果、Bw4 との結合に関与するアミノ酸を含むPeptide 2 および 4 でELISA scoreが吸収される傾向がみられた (図 15)。Peptide 2 および 4 のELISA scoreの吸収効率は、それぞれ約 10-15% および約 10-20% だった。抗KIR3DL1 抗体との相互作用に関与するアミノ酸を含むPeptide 3、および

他のペプチドでは、ELISA scoreの吸収効率は10%未満だった (図 15)。

4. 考察

4-1. SLE患者の血清中に存在する抗KIR3DL1自己抗体について

本研究では、約80%のSLE患者(29名中24名)の血清中にKIR3DL1に対する抗体活性を示す自己抗体が存在することを明らかにした(図13)。とりわけ、疾患発症時で治療前のSLE患者(表2)では、抗KIR3DL1自己抗体の陽性率が約90%(11名中10名)だった(図14)。一方、治療中のSLE患者、RA患者、および健常者の自己抗体の陽性率はそれぞれ約60%(13名中8名)、約25%(11名中3名)、および0%(17名中0名)だった(図13, 14)。これらのことから、KIR3DL1に対する自己抗体の活性が疾患特異的であり、疾患発症時および治療中に関するSLE患者の状態を反映していることが示唆された。SLEの疾患活動性の指標として、SLEDAI (SLE Disease Activity Index) [66] が一般に用いられている。本研究のこれまでの解析結果から、疾患発症時および治療中に関するSLE患者の状態と抗KIR3DL1自己抗体の陽性率との関連が見られたものの、採血時におけるSLEDAIとELISA scoreとの相関は見られなかった(N=9; 図16)。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したいと考える。

これまでに、SLE患者の血清中にKIR2DL1, 3に対する自己抗体が、約20-30%の陽性率で存在することが報告されている [56]。本研究で同定したSLE患者の血清中に存在する抗KIR3DL1自己抗体は、既に報告されている抗KIR2DL1, 2自己抗体と比べて高い陽性率を示した。現在、臨床で使用されているSLE患者の抗体陽性率は、抗二本鎖DNA抗体で70-98%、抗Sm抗体で20-40%、抗ヌクレオソーム抗体で61-85%、抗リン脂質抗体で30-40%、抗ヒストン抗体で70%(薬物誘発SLEでは96-100%)、抗

SSA抗体で 30% (新生児ループスでは 90%) であると報告されている [21]。このことから、SLE患者、とりわけ疾患発症時のSLE患者の抗KIR3DL1 抗体陽性率は、既存の診断マーカーと同程度であり、抗KIR3DL1 抗体の検出は、疾患発症時におけるSLEの新規診断マーカーとして応用することが可能であると考えられる。また、これまで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 [45, 53–54, 67, 68]、抗KIR3DL1 自己抗体の存在は、本研究で初めて明らかとなった。

今後、本研究と同じELISA解析システムおよびSLE患者の血清を用いて、KIR2DL1, 3 を含めた他のKIRファミリーに対する自己抗体活性を比較することで、自己抗体のKIR3DL1 に対する特異性に関する考察を行っていきたい。また、統計解析結果の正確性に関する指標である検出力に基づき、適正なサンプル数で解析を行う必要がある。図 13 および 14 に示したELISA解析で行った統計処理での検出力は、「SLE患者 vs 健常者」および「治療中のSLE患者 vs 健常者」では約 90%だった。一方、「SLE患者 vs RA患者」および、「治療前のSLE患者 vs 治療中のSLE患者」では約 60%と検出力が低かった。これらの統計解析結果の信頼性を上げるため、今後サンプル数を増やして (RA患者: N = 26, 治療前/治療中のSLE患者: N = 19) 解析を行う必要がある。

4-2. SLE患者の血清中に存在する自己抗体のKIR3DL1 結合部位について

KIRファミリーは細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、および 2 つあるいは 3 つの免疫グロブリン様の細胞質ドメイン (D0, D1, D2) を持つといった、共通の構造的特徴を持つ。KIR3DL1 はD0, D1, D2 ドメインを、KIR2DL1, 3 はD1, D2 ドメインをそれぞれ持ち、これらのドメインはリガンド特異性およびシグナル伝達に関する機能的役割を有する [63]。BLASTを用いた相同性解析の結果、ELISA吸収実験で用いた

KIR3DL1 の抗原決定基のうち、Bw4 および抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64] は、KIR2DL1, 3 の配列中には見られなかった (表 1, 図 8, 9)。また、KIR3DL1 と KIR2DL1, 3 および KIR3DS1 との D2 ドメインの相同性は極めて高かった (KIR3DL1 vs KIR2DL1: 88%, KIR3DL1 vs KIR2DL3: 88%, KIR3DL1 vs KIR3DS1: 100%)。そこで本研究では、KIR3DL1 特異的な配列を持つ D0, D1 ドメイン中の抗原決定基に着目し、表 3 で示した各ペプチドを用いて ELISA の吸収実験を行った。その結果、Bw4 および抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64] を含む Peptide 4 で ELISA score の吸収が約 10–20% みられた (図 15)。Bw4 との結合に関与することのみが報告されている Peptide 2 でも、約 10–15% ELISA score が吸収された。しかしながら、抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64] を含む Peptide 3、および他のペプチドでは ELISA score の吸収がほとんどみられなかった (図 15)。

BLAST を用いた相同性解析の結果、KIR3DL1 の相同体である KIR3DS1 は 95% という高い相同性を示した (図 11)。しかしながら、Peptide 4 の配列に含まれ、Bw4 および抗KIR3DL1 抗体との結合に関与する重要なアミノ酸である”MLA”配列中のロイシン (L187) は、KIR3DS1 ではアルギニンであった (表 4, 図 11)。L187 をアルギニンに変異させた場合 (L187R)、KIR3DL1 の抗KIR3DL1 抗体との結合が約 60% 減少し、Bw4 との結合性も見られなくなることが報告されている [64]。また、相同性解析の結果、KIR3DL1 の L187 は KIR2DL1 および 3 ではともにグルタミンであり (表 1, 図 8, 9)、KIR2DL および KIR3DL を含めた KIR ファミリーの中で特異的なアミノ酸残基であることも認められた。さらに、Peptide 4 のスクランブル配列である Peptide 6 では ELISA score の吸収がみられなかった (図 15)。これらのことから、KIR3DL1

のD0およびD1ドメインにおける、Bw4および抗KIR3DL1抗体との結合に関するL187 [64]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。

これまでに、KIR3DL1のD0ドメインのアミノ酸を、KIR3DS1特異的なアミノ酸に置換した変異体ではBw4との結合性が著しく減少すること [69]、および、D0ドメインとD1およびD2ドメインとの相互作用がBw4との結合に必要であること [64]が報告されている。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患者の病勢との関連が認められる利用可能な自己抗体-抗原の組み合わせは、約6種類に限られている [17, 21]。病態に関連し、特異性の高い抗体-抗原の組み合わせを見つけることは、患者病勢の把握および正確な診断につながると考える。所属する研究部の先行研究結果および本研究の結果から、RPDL法で複数の患者選択的に現れるタンパク質を検索する方法が、新規自己抗体の同定に有効であることが示唆された。今後、SLE患者の血清と強く結合するKIR3DL1の抗原決定基をより詳細に検討し、最も強くELISA scoreが吸収される抗原決定基を同定することで、特異性が高く、SLEの診断および迅速な病勢の把握が可能な診断マーカーの開発につながると考える。

4-3. SLE患者の血清中に存在する自己抗体がKIR3DL1+NK細胞の細胞傷害活性に与える影響について

NK細胞に発現するKIR3DL1は抑制型の受容体であり、HLA-A24を含めたBw4の血清学的な抗原決定基を持つHLA-A, Bアロタイプを発現する標的細胞を認識する。

その場合、KIR3DL1+NK細胞の活性化型受容体に対するリガンドが標的細胞に存在していても、**S**r**c** **h**o**m**o**l**o**g**y **r**e**g**i**o****n** **2** (SH2) domain-containing **p**h**o****s**p**h**a**t****a****s****e** **1** (SHP-1) のような抑制シグナルが活性化シグナルを阻害すると、NK細胞は標的細胞を傷害しない (図 17A) [33, 34, 64]。また、KIR3DL1 のL187 がアルギニンであるKIR3DS1はBw4 との結合性が見られなかったこと [35]、KIR3DL1 のL187R変異によって、A24 との結合性が消失することが報告されている [64]。そのため、本研究で得られた結果から、SLE患者の血中に存在する自己抗体がKIR3DL1 と結合した場合、KIR3DL1 とBw4 との正常な結合が阻害され、活性化シグナルを抑制するシグナルが機能しなくなることで、NK細胞がBw4 を発現する標的細胞を傷害する可能性が考えられる (図 17B)。

これまでに、SLE患者の血清中にNK細胞と結合する自己抗体が存在し [59]、NK細胞の活性を阻害することが報告されている [60]。また、NK細胞による過剰な細胞傷害活性により自己抗原が増加することで、B細胞の免疫グロブリンの産生および自己免疫反応を促進させるといった機序が示唆されている [49, 70]。これらのことから、抗KIR3DL1 自己抗体がNK細胞の活性にどのような影響を与えるかを解析することは重要である。今後、KIR3DL1 を発現するNK細胞 (CD56⁺, CD3⁻, KIR3DL1⁺) をPBMCからFACSソーティングで取得し、SLE患者の血清から精製したIgGがNK細胞の機能を阻害するかについて解析を行いたい。具体的には、Bw4 を発現する標的細胞を **C**a**r**b**o****x****y****f**l**u****e****s****c****e****i****n** **s**u**c****c****i****n****i****m****i****d****y****l** **e****s****t****e****r** (CFSE; 緑色色素)、死細胞を **7****-****A****m****i****n****o****-****A****c****t****i****n****o****m****y****c****i****n** **D** (7AAD; 赤色色素) でそれぞれ染色し [71]、FACS解析で標的細胞中の死細胞の割合を解析したいと考えている。NK細胞におけるKIR3DL1 の発現量は健常者で 25-40%、活動性のないSLE患者で 20-40%、活動性のあるSLE患者で

15-40%であり、各群で統計的有意差がみられなかったことが、これまでに報告されている [45]。今後、KIR3DL1 に対する自己抗体の存在がNK細胞の機能に与える影響を解析する上で、抗KIR3DL1 自己抗体のELISA scoreとKIR3DL1 の発現量との相関を解析しながら考察する必要がある。

これまでにSLE患者、RA患者、およびベーチェット病患者の血清中に存在する抗KIR2DL1, 3 自己抗体を同定したMatsuiらの研究では、NK細胞の活性に影響を与える自己抗体が患者の血液中に複数存在し得ることから、抗KIR2DL1, 3 自己抗体がNK細胞の活性に与える影響を正確に観察することはできなかつたと報告している [56]。しかしながら、自己免疫疾患患者の血中に存在する自己抗体が、KIR3DL1 を含めたKIRファミリーを発現するNK細胞の機能に及ぼす影響を今後明らかにしていくことで、SLEを始めとした自己免疫疾患の病態と自己抗体との関連の解明につながると考える。

5. 謝辞

研究者としての心得や研究のご助言を頂きました筑波大学連携大学院 人間総合科学研究科 狩野繁之 教授(国立国際医療研究センター研究所 熱帯医学・マラリア研究部 部長) に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたりご指導ご鞭撻頂きました国立国際医療研究センター研究所 難治性疾患研究部 石坂幸人 部長に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、様々なご協力、ご助言を頂きました国立国際医療研究センター病院 第一膠原病内科 三森明夫 医長に深く感謝いたします。

博士課程の研究において終始様々なご助言を頂きました国立国際医療研究センター研究所 難治性疾患研究部 および 熱帯医学・マラリア研究部の皆様方に心より感謝致します。

最後に、生活面で援助頂きました家族に深く感謝致します。

6. 図表の説明

表 1: RPD法で得られたKIR3DL1 の抗原決定基のアミノ酸配列とKIR2DL1, 3 との相同性解析の結果を示した。相同性解析はBLASTで行い、同一とされたアミノ酸を太字および下線で示した。*: Bw4 との結合に関与するアミノ酸, **: 抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64]。

表 2: 本研究のELISA解析で用いたSLE患者の性別、ELISA score、採血時の状態、および年齢を示した。

表 3: 本研究のELISA吸収実験に用いたKIR3DL1 由来のペプチド配列を示した。*: Bw4 との結合に関与するアミノ酸, **: 抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64]。

表 4: RPD法で得られたKIR3DL1 の抗原決定基のアミノ酸配列とKIR3DS1 との相同性解析結果を示した。相同性解析はBLASTで行い、同一とされたアミノ酸を太字および下線で示した。*: Bw4 との結合に関与するアミノ酸, **: 抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64]。

図 1: RPD法で用いたpFliTrxプラスミドDNAの概略図

RPD法で用いたpFliTrxプラスミドDNAの概略図を示した。pFliTrxのマルチクローニングサイトには、チオレドキシンの活性部位で発現するペプチドが挿入されている。チオレドキシンは通常、大腸菌の細胞膜上に発現していない。そのため、チオレドキ

シンとペプチドとの融合タンパク質をコードするDNAは、細胞外に露出するフラジェリン（べん毛タンパク質）の非必須ドメインに組み込まれている。フラジェリン-チオレドキシシン-ペプチドが融合したタンパク質の発現が誘導された場合、大腸菌の膜上にペプチドを提示するべん毛繊維が発現する。

図 2: RPDL法の手順に関する概略図

RPDL法の手順に関する概略図を示した。ペプチド融合タンパク質を発現した大腸菌を増殖させた後、SLE患者の血清と大腸菌膜上で発現したペプチドとを結合させる。その後、患者の血清に含まれるIgGと結合したペプチド配列を持つ大腸菌を回収するため、プロテインGセファロースビーズを大腸菌と反応させる。およそ 1000 個の単一大腸菌クローンを選択し、各クローンからプラスミドDNAを精製し、シーケンス解析を行う。シーケンス解析の後、各大腸菌クローンの持つペプチド配列を類推し、その配列と相同性を持つタンパク質をBLAST解析で検索する。

図 3: RPDL法でSLE患者の血清中で発見されたKIR3DL1 の抗原決定基のアミノ酸配列

RPDL法でSLE患者の血清中で発見されたKIR3DL1 の抗原決定基のアミノ酸配列（アミノ酸の一文字略号）を示した。緑字: D0 ドメイン、青字: D1 ドメイン、紫字: D2 ドメイン、太字下線: RPDL法で見つかったKIR3DL1 の抗原決定基に含まれるアミノ酸を大文字で示した。*: Bw4 との結合に関与するアミノ酸、**: 抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64]。

図 4: リコンビナントタンパク質をコムギ胚芽システムで発現させるプラスミドDNAの概略図

リコンビナントタンパク質をコムギ胚芽システムで発現させるプラスミドDNAの概略図を示した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム用ベクター (pEU) のマルチクローニングサイト (MCS) に、rKIR3DL1-EGFPおよびrEGFPをコードするDNAを、それぞれ組み込んだ。

図 5: コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムの概略図

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム [62] の概略図を示した。コムギを温和に粉碎し、翻訳阻害因子が含まれる胚乳を除去した粗胚芽を得る。粗胚芽をさらに粉碎し、コムギ胚芽抽出液が得られる。コムギ胚芽抽出液にアミノ酸、ATP、GTP、クレアチンキナーゼを添加し、さらに目的タンパク質のmRNAを添加してインキュベートすることで、目的タンパク質が合成される。

図 6: rEGFPおよびrKIR3DL1-EGFPタンパク質の精製

rEGFPおよびrKIR3DL1-EGFPをコムギ胚芽システムで発現後、Strep-tactinビーズと結合させ、デスチオビオチンを含む溶出液で、各タンパク質を精製した。(A) ポリアクリルアミド電気泳動の後、CBB染色で精製したタンパク質のバンドを確認した。Mr, 分子量マーカー。(B) 精製した各タンパク質が目的のものであるかを確かめるため、Western blot解析を行った。rEGFPタンパク質に対しては抗GFP抗体で、rKIR3DL1-EGFPタンパク質に対しては抗KIR3DL1抗体で、それぞれ検出を行った。F, Flow Through画分; W, Wash画分; B, Beads。

図 7: ELISA解析の概略図

本研究で行ったELISA解析の概略図を示した。ストレプトアビジンをコートしたELISAプレートに、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のrKIR3DL1-EGFPおよびrEGFPタンパク質を添加した。1000倍希釈した患者および健常者の血清を1次抗体として添加した。2次抗体として、2000倍希釈したHRP付き抗ヒトIgG抗体を使用した。発色はTMB基質液で行い、450 nmにおける吸光度を測定した。

図 8: BLASTによるKIR3DL1とKIR2DL1との相同性解析結果

KIR3DL1の配列とKIR2DL1の配列との相同性を解析するため、BLASTを用いた解析を行った。上段の配列: KIR3DL1、中段の配列: 相同性解析の結果一致したアミノ酸、下段の配列: KIR2DL1。(A) KIR3DL1のアミノ酸配列(aa 85–444)とKIR2DL1のアミノ酸配列(aa 6–348)との相同性を解析した結果を示した。(B) KIR3DL1のアミノ酸配列(aa 1–219)とKIR2DL1のアミノ酸配列(aa 1–222)との相同性を解析した結果を示した。

図 9: BLASTによるKIR3DL1とKIR2DL3との相同性解析結果

KIR3DL1の配列とKIR2DL3の配列の相同性を解析するため、BLASTを用いた解析を行った。上段の配列: KIR3DL1、中段の配列: 相同性解析の結果一致したアミノ酸、下段の配列: KIR2DL3。(A) KIR3DL1のアミノ酸配列(aa 119–436)とKIR2DL3のアミノ酸配列(aa 24–341)との相同性を解析した結果を示した。(B) KIR3DL1のアミノ酸配列(aa 1–219)とKIR2DL3のアミノ酸配列(aa 1–222)との相同性を解析

した結果を示した。

図 10: BLASTによるKIR3DL1 とKIR3DL2, 3 との相同性解析結果

KIR3DL1 の配列とKIR3DL2, 3 の配列の相同性を解析するため、BLASTを用いた解析を行った。(A) 上段の配列: KIR3DL1、中段の配列: 相同性解析の結果一致したアミノ酸、下段の配列: KIR3DL2。KIR3DL1 のアミノ酸配列 (aa 24-444) とKIR3DL2 のアミノ酸配列 (aa 1-421) との相同性を解析した結果を示した。(B) 上段の配列: KIR3DL1、中段の配列: 相同性解析の結果一致したアミノ酸、下段の配列: KIR3DL3。KIR3DL1 のアミノ酸配列 (aa 21-425) とKIR3DL3 のアミノ酸配列 (aa 4-391) との相同性を解析した結果を示した。

図 11: BLASTによるKIR3DL1 とKIR3DS1 との相同性解析結果

KIR3DL1 の配列とKIR3DS1 の配列の相同性を解析するため、BLASTを用いた解析を行った。上段の配列: KIR3DL1、中段の配列: 相同性解析の結果一致したアミノ酸、下段の配列: KIR3DS1。KIR3DL1 のアミノ酸配列 (aa 1-371) とKIR3DS1 のアミノ酸配列 (aa 1-371) との相同性を解析した結果を示した。赤枠: KIR3DL1/3DS1 のD2ドメイン。

図 12: KIR3DL1 の可溶化率の解析

KIR3DL1 の可溶化率をCBB染色で解析した。解析は(株)セルフリーサイエンスに委託した。コムギ胚芽システムで合成したタンパク質溶液を $21,600 \times g$ で 10 分間遠心し、上清画分と沈殿画分に分離した。各画分を用いてSDS-PAGEを行い、CBB染色後

のKIR3DL1のバンド強度から可溶化率を解析した。NC, 陰性コントロール; T, 全タンパク質画分; S, 上清画分; P, 沈殿画分。*: KIR3DL1。

図 13: SLE患者、RA患者、および健常者の血清を用いたELISA解析のプロット図

SLE患者 (N = 29)、RA患者 (N = 11)、および健常者 (N = 17) の血清を用いたELISA解析結果を示した。ELISA scoreは (rKIR3DL1-EGFPを用いて得られたOD値) - (rEGFPを用いて得られたOD値) で算出した。各サンプルの値は3回の独立した実験で得られたELISA scoreの平均値を示し、各サンプルの値をプロットした図を示した。カットオフ値 (0.084) は、健常者のELISA scoreの (平均値 + 3 × 標準偏差) で算出した。高いELISA scoreを示した2名のSLE患者 (SLE1, 2) の血清を、ELISA吸収実験 (図 15) に用いた。*: $P < 0.001$, **: $P < 0.0001$ 。

図 14: 治療前に採血したSLE患者、治療中に採血したSLE患者、および健常者の血清を用いたELISA解析のプロット図

治療前に採血したSLE患者 (N = 11)、治療中に採血したSLE患者 (N = 13)、および健常者 (N = 17) の血清を用いたELISA解析結果を示した。ELISA scoreは (rKIR3DL1-EGFPを用いて得られたOD値) - (rEGFPを用いて得られたOD値) で算出した。各サンプルの値は3回の独立した実験で得られたELISA scoreの平均値を示し、各サンプルの値をプロットした図を示した。カットオフ値 (0.084) は、健常者のELISA scoreの (平均値 + 3 × 標準偏差) で算出した。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$ 。

図 15: KIR3DL1の抗原決定基を含むペプチドを用いたELISA吸収実験

表 3 で示したKIR3DL1 の抗原決定基を含むペプチドおよび、高い抗KIR3DL1 自己抗体活性を示した 2 名のSLE患者 (SLE1, 2) の血清 (図 13) を用いて、ELISA吸収実験を行った。TBS-Tを用いて 1000 倍希釈した血清を、10 アミノ酸からなるKIR3DL1 の抗原決定基を含むペプチド 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、37°Cで 30 分間インキュベートした。「材料と方法 2-5.」で示した方法に従い、ELISA解析を行った。ペプチドによる吸収を行って得られたELISA scoreが、吸収を行わずに得られたELISA scoreに対して減少した割合をELISA score吸収効率 (%) として示した。値は独立した 3 回の実験で得られたELISA score吸収効率の平均値 + 標準偏差を示した。*: Bw4 との結合に関与するアミノ酸、**: 抗KIR3DL1 抗体との結合に関与するアミノ酸 [64]。

図 16: SLE患者のSLEDAI (採血時) と抗KIR3DL1 自己抗体のELISA scoreとの相関
SLE1, SLE2 を含むSLE患者のSLEDAI (採血時) と、抗KIR3DL1 自己抗体のELISA scoreとの相関図を示した。 R^2 : decision coefficient。

図 17: SLE患者の血清中に含まれる抗KIR3DL1 自己抗体がNK細胞の機能に与える影響

(A) NK細胞の膜上に発現するKIR3DL1 は抑制型の受容体である。標的細胞の細胞膜にBw4 が発現している場合、KIR3DL1+NK細胞の活性化型受容体に対するリガンドが標的細胞に存在していても、抑制型受容体のシグナルが活性化シグナルを阻害し、NK細胞は標的細胞を傷害しない。(B) KIR3DL1 にSLE患者の自己抗体が結合した場合、KIR3DL1 によるBw4 の認識が阻害され、NK細胞が標的細胞を傷害する可能性が考えられる。

7. 参考文献

1. Jäger A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol* 2010, **72**:173–184.
2. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 2014, **13**:668–677.
3. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001, **344**:655–664.
4. Coleman MA, Steptoe RJ. Induction of antigen-specific tolerance through hematopoietic stem cell-mediated gene therapy: the future for therapy of autoimmune disease? *Autoimmune Rev* 2012, **12**:195–203.
5. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *Am J Pathol* 2008, **173**:600–609.
6. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2007, **28**:1–6.
7. Gough SCL, Simmonds MJ. The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Curr Genomics* 2007, **8**:453–465.
8. Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol* 2005, **14**: 175–182.
9. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001, **345**:340–350.
10. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P *et al.* Defining

the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000024.

11. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004, **34**:501–537.

12. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ *et al*. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003, **349**:1526–1533.

13. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum* 2007, **56**:2092–2094.

14. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010, **39**:257–268.

15. Jakes RW, Bae SC, Louthrenoo W, Mok CC, Navarra SV *et al*. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012, **64**:159–168.

16. Nikpour M, Bridge JA, Richter S. A systematic review of prevalence, disease characteristics and management of systemic lupus erythematosus in Australia: identifying areas of unmet need. *Int Med J* 2014, **44**:1170–1179.

17. Petri M. Clinical research in systemic lupus erythematosus: immediate relevance to clinical practice. *Int J Rheum Dis* 2011, **14**:1–5.
18. Gilboe IM, Kvien TK, Husby G. Disease course in systemic lupus erythematosus: changes in health status, disease activity, and organ damage after 2 years. *J Rheumatol* 2001, **28**:266–274.
19. Nikpur M, Urowitz MB, Ibanez D, Gladman DD. Frequency and determinants of flare and persistently active disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009, **61**:1152–1158.
20. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982, **25**:1271–1277.
21. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of lupus erythematosus: correlation between immunopathological features and clinical aspects. *Autoimmune Dis* 2014, **2014**:321359.
22. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989, **47**:187–376.
23. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999, **17**:189–220.
24. Sawicki MW, Dimasi N, Natarajan K, Wang J, Margulies DH *et al*. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunol Rev* 2001, **181**:52–65.
25. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:225–274.

26. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 2009, **54**:15–39.
27. Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BFM, Fremont DH, Yokoyama WM. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat Immunol* 2003, **4**:801–807.
28. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K *et al.* Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2006, **203**:289–295.
29. Gründemann C, Bauer M, Schweier O, von Oppen N, Lässig U *et al.* Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1. *J Immunol* 2006, **176**:1311–1315.
30. Lebbink RJ, de Ruiter T, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM *et al.* Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med* 2006, **203**:1419–1425.
31. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990, **11**:237–244.
32. Parham P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 2005, **42**:459–462.
33. Bonagura VR, Du Z, Ashouri E, Luo L, Hatam LJ *et al.* Activating KIR receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol* 2010, **71**:212.
34. Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N *et al.* Cutting

edge: allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* 2007, **178**:33–37.

35. Gillespie GM, Bashirova A, Dong T, McVicar DW, Rowland-Jones SL *et al.* Lack of KIR3DS1 binding to MHC class I Bw4 tetramers in complex with CD8⁺ T cell epitopes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, **23**:451–455.

36. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002, **31**:429–434.

37. Biassoni R, Pessino A, Malaspina A, Cantoni C, Bottino C *et al.* Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* 1997, **27**:3095–3099.

38. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, Saulquin X, Riedmuller J *et al.* Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:13224–13229.

39. Johansson S, Berg L, Hall H, Höglund P. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol* 2005, **26**:613–618.

40. Ye Z, Ma N, Zhao L, Jiang ZY, Jiang YF. Differential expression of natural killer activating and inhibitory receptors in patients with newly diagnosed systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis* 2014, doi: 10.1111/1756-185X.12289.

41. Struyf NJ, Snoeck HW, Bridts CH, Clerck LS, Stevens WJ. Natural killer cell activity in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: stimulation

with interferons and interleukin-2 and correlation with immune complexes. *Ann Rheum Dis* 1990, **49**:690–693.

42. Ricciari V, Spadaro A, Parisi G, Taccari E, Moretti T *et al.* Down-regulation of natural killer cells and of gamma/delta T cells in systemic lupus erythematosus. Does it correlate to autoimmunity and to laboratory indices of disease activity? *Lupus* 2000, **9**:333–337.

43. Ricciari V, Parisi G, Spadaro A, Scrivo R, Barone F *et al.* Reduced circulating natural killer T cells and gamma/delta T cells in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2005, **32**:283–286.

44. Green MR, Kennell AS, Larche MJ, Seifert MH, Isenberg DA *et al.* Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: demonstration of a killing defect in patients. *Clin Exp Immunol* 2005, **141**:165–73.

45. Hervier B, Beziat V, Haroche J, Mathian A, Lebon P *et al.* Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: excess interferon-gamma production in patients with active disease. *Arthritis Rheum* 2011, **63**:1698–1706.

46. Takeda K, Dennert G. The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J Exp Med* 1993, **177**:155–164.

47. Shi FD, Wang H-B, Li H, Hong S, Taniguchi M *et al.* Natural killer cells

determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 2000, **1**:245–251.

48. Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M *et al*. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2009, **19**:245–252.

49. Poggi A, Zocchi MR. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol* 2014, **5**:27.

50. Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2010, **131**:451–458.

51. Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens* 2008, **71**:101–113.

52. Augusto DG, Lobo-Alves SC, Melo MF, Pereira NF, Petzl-Erler ML. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. *PLoS ONE* 2012, **7**:e39991.

53. Tsuchiya N. Genetics of microscopic polyangiitis in the Japanese population. *Ann Vasc Dis* 2012, **5**:289–295.

54. Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H *et al*. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 2006, **54**:992–997.

55. Osman C, Swaak AJ. Lymphocytotoxic autoantibodies in SLE: a review of the literature. *Clin Rheumatol* 1994, **13**:21–27.

56. Matsui T, Otsuka M, Maenaka K, Furukawa H, Yabe T *et al.* Detection of autoantibodies to killer immunoglobulin-like receptors using recombinant fusion proteins for two killer immunoglobulin-like receptors in patients with systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 2001, **44**:384–388.
57. Lu Z, Murray KS, Cleave VV, LaVallie ER, Stahl ML *et al.* Expression of thioredoxin random peptide libraries on the *Escherichia coli* cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions. *Nat Biotechnol* 1995, **13**:366–372.
58. Li W, Lei P, Yu B, Wu S, Peng J *et al.* Screening and identification of a novel target specific for hepatoma cell line HepG2 from the FliTrx bacterial peptide library. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008, **40**:443451.
59. Rook AH, Tsokos GC, Quinnan GV, Balow JE, Ramsey KM *et al.* Cytotoxic antibodies to natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1982, **24**:179–185.
60. Sibbit WL Jr, Froelich CJ, Bankhurst AD. Natural cytotoxicity in systemic lupus erythematosus: mechanisms of suppression by inhibitory serum factors. *Clin Exp Immunol* 1983, **53**:363–370.
61. Hirano N, Butler MO, von Bergwelt-Baildon MS, Maecker B, Schultze JL *et al.* Autoantibodies frequently detected in patients with aplastic anemia. *Blood* 2003, **102**: 4567-4575.
62. Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, Endo Y. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:14652–

14657.

63. Körner C, Altfeld M. Role of KIR3DS1 in human diseases. *Front Immunol* 2012, **3**:326.

64. Sharma D, Bastard K, Guethlein LA, Norman PJ, Yawata N *et al.* Dimorphic motifs in D0 and D1+D2 domains of killer cell Ig-like receptor 3DL1 combine to form receptors with high, moderate, and no avidity for the complex of a peptide derived from HIV and HLA-A*2402. *J Immunol* 2009, **183**:4569–4582.

65. Guild K, Zhang Y, Stacy R, Mundt E, Benbow S *et al.* Wheat germ cell-free expression system as a pathway to improve protein yield and solubility for the SSGCID pipeline. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2011, **67**:1027–1031.

66. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992, **35**:630–640.

67. Prakash S, Alam S, Bharadwaj U, Aggarwal A, Mishra RN *et al.* Associations of killer cell immunoglobulin like receptors with rheumatoid arthritis among North Indian population. *Hum Immunol* 2014, **75**:802–807.

68. Vendelbosch S, Heslinga SC, John M, van Leeuwen K, Geissler J *et al.* Study on the protective effect of the KIR3DL1 gene in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumatol* 2015, **67**:2957–2965.

69. Mulrooney TJ, Zhang AC, Goldgur Y, Boudreau JE, Hsu KC. KIR3DS1-specific D0 domain polymorphisms disrupt KIR3DL1 surface expression and HLA binding.

J Immunol 2015, **195**:1242–1250.

70. Gray JD, Horwitz DA. Activated human NK cells can stimulate resting B cells to secrete immunoglobulin. *J Immunol* 1995, **154**:5656–5664.

71. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 1992, **13**:204–208.

表 1

RPDL法で発見された KIR3DL1エピトープ配列	KIR3DL1に対応する KIR2DL1の配列	KIR3DL1に対応する KIR2DL3の配列	KIR3DL1に対応する ドメイン
GGQD	<u>G</u> VHR	<u>G</u> VHR	
GQDKPFLS	VHR <u>KPS</u> LL	VHR <u>KPS</u> LL	D0
WPSAVVPR*	<u>HPG</u> PLVKS	<u>HPG</u> PLVKS	D0
LRCHYR	<u>LQC</u> WSD	<u>LQC</u> WSD	D0
TCR**GS	LL <u>QGA</u>	<u>RCYGS</u>	D0
HSPTG	<u>HE</u> ---	<u>HSP</u> YQ	D0
GSH**P**HSP	<u>GSVTHSP</u>	<u>GSVTHSP</u>	D0
GERVI	<u>GENVT</u>	<u>EETVI</u>	D1
ML**A*LAG	TQD <u>LAG</u>	<u>MQDLAG</u>	D1
SSRSSY	<u>SSRSSY</u>	<u>SSRSSY</u>	D2
SSRSSYDMYHLSR	<u>SSRSSYDMYHLSR</u>	<u>SSRSSYDMYHLSR</u>	D2
HERRLPAVR	<u>HERRLPA</u> GP	<u>HERRFSA</u> GP	D2
RRLPAV	<u>RRLPA</u> G	<u>RRFSA</u> G	D2
RKVNR	PK <u>VNG</u>	PK <u>VNG</u>	D2
PYE**W**S	<u>PYEWS</u>	<u>PYEWS</u>	D2
DPL**LVS	<u>DPLLVS</u>	<u>DPLLVS</u>	D2
LLFFLLH	<u>LLFFLLH</u>	<u>LLFFLLH</u>	
TANSEDSDEQD	<u>TANSEDSDEQD</u>	<u>TVNREDSDEQD</u>	
SQRPKTPPTDIL	<u>SQRPKTPPTD</u> I I V	<u>SQRPKTPPTD</u> I I V	

*: Bw4との結合に関与するアミノ酸

** : 抗KIR3DL1抗体との結合に関与するアミノ酸

BLASTによる相同性解析の結果、同一とされたアミノ酸を太字および下線で示した。

表 2

本研究のELISA解析で用いたSLE患者の採血時の状態

ID	性別	ELISA score	採血時の状態	年齢
1	女性	0.09	再燃時/治療前	48
2	女性	0.42	発症時/治療前	60
3	女性	0.52	発症時/治療前	28
4	女性	1.83	発症時/治療前	25
5	女性	0.41	発症時/治療前	35
6	女性	0.18	発症時/治療前	44
7	女性	0.07	発症時/治療前	28
8	女性	0.36	発症時/治療前	70
9	男性	0.33	発症時/治療前	67
10	女性	1.36	抗リン脂質抗体による脳梗塞発症時/治療前	42
11	女性	0.19	発症時/治療前	21
12	女性	0.03	治療中	37
13	女性	0.07	治療中	38
14	女性	0.05	治療中/部分寛解	55
15	女性	0.34	治療中/部分寛解	47
16	女性	0.09	治療中/部分寛解	53
17	女性	0.36	治療中/部分寛解	64
18	女性	0.14	治療中/部分寛解	44
19	女性	0.08	治療中/部分寛解	45
20	女性	0.27	治療中/部分寛解	30
21	女性	0.25	治療中/部分寛解	27
22	女性	0.25	治療中/部分寛解	54
23	女性	0.19	治療中/部分寛解	40
24	女性	0.02	治療中	44

表 3

ELISA吸収実験に用いたKIR3DL1由来のペプチド配列

ペプチド名	配列	ドメイン
Peptide 1	AVVPRGGHVT	D0
Peptide 2	LRCHYR [*] HRFN	D0
Peptide 3	TCR ^{**} GSH ^{**} P ^{**} HSP	D0
Peptide 4	ML ^{**} AL [*] AGTYRC	D1
Peptide 5	VTGNHRKPSL	D0-D1
Peptide 6	MYATGARLCL	Peptide 4のスクランブル配列

*: Bw4との結合に関与するアミノ酸

** : 抗KIR3DL1抗体との結合に関与するアミノ酸

表 4

RPDL法で発見された KIR3DL1エピトープ配列	KIR3DL1に対応する KIR3DS1の配列	KIR3DL1に対応する ドメイン
GGQD	<u>GGQD</u>	
GQDKPFLS	<u>GQDNPFLS</u>	D0
WPSAVVPR*	<u>WPSAVVPR</u>	D0
LRCHYR	<u>LRCHYR</u>	D0
TCR**GS	<u>TCRGS</u>	D0
HSPTG	<u>HSPTG</u>	D0
GSH**P**HSP	<u>GSHPHSP</u>	D0
GERVI	<u>GERVI</u>	D1
ML**A*LAG	<u>MRALAG</u>	D1
SSRSSY	<u>SSRSSY</u>	D2
SSRSSYDMYHLR	<u>SSRSSYDMYHLR</u>	D2
HERRLPAVR	<u>HERRLPAVR</u>	D2
RRLPAV	<u>RRLPAV</u>	D2
RKVNR	<u>RKVNR</u>	D2
PYE**W**S	<u>PYEWS</u>	D2
DPL**LVS	<u>DPLLVS</u>	D2
LLFFLLH	<u>LLFFLLH</u>	
TANSEDSDEQD	-	
SQRPKTPPTDIL	-	

*: Bw4との結合に関与するアミノ酸

** : 抗KIR3DL1抗体との結合に関与するアミノ酸

BLASTによる相同性解析の結果、同一とされたアミノ酸を太字および下線で示した。

図 1

RPDL法で用いたpFliTrxプラスミドDNAの概略図

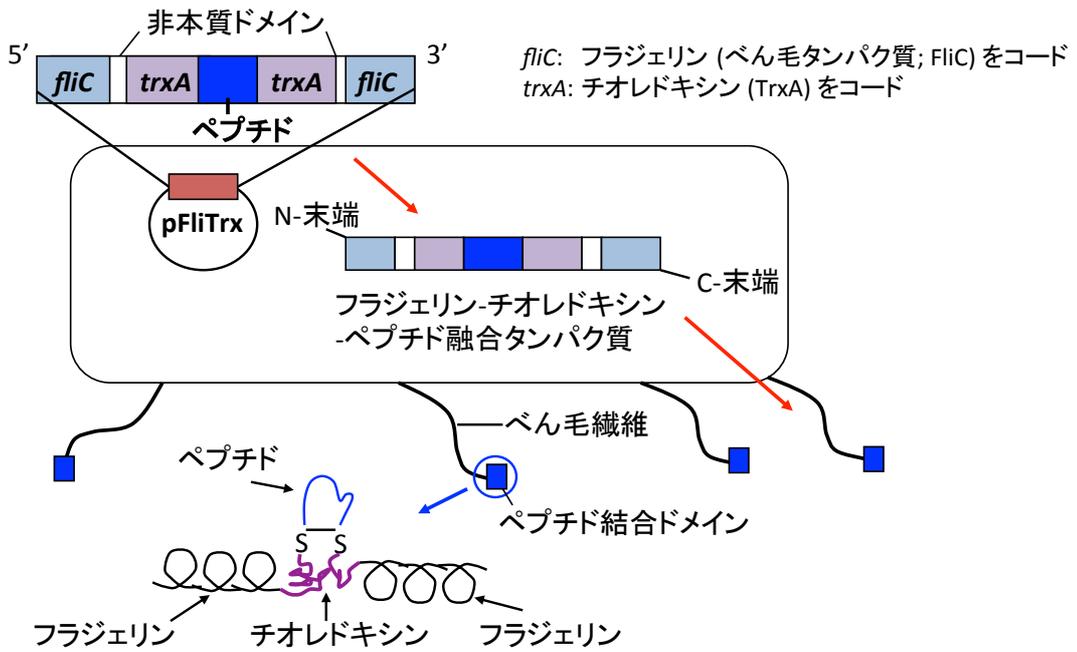
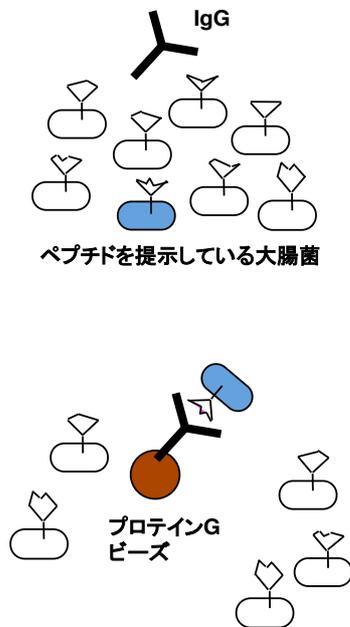


図 2



SLE患者の血清に含まれるIgGを大腸菌と結合



- ・大腸菌をプロテインGセファロースビーズと反応
- ・SLE患者の血清に含まれるIgGと結合した大腸菌を回収



- ・大腸菌からプラスミドDNAを精製し、シーケンス解析によって、アミノ酸配列を類推
- ・BLAST解析によりペプチド配列と相同性をもつタンパク質を検索

図 3

SLE患者の血清中で発見された KIR3DL1の抗原決定基の配列

KIR3DL1のアミノ酸配列

mllmvsvmacvgfflvqragphvGGQD
D0 KPFLSaWPSAVVPRgghvtLRCHYR*hrfnfmlykedrihvpihfgrlfqesfnmspvttahagn
yTCR**GSH**P**HSPTGwsapsnpvvi mvtgnh
D1 rkpsllahpgplvksGERVIIqcwsdimfehfflhkegiskdpsrlvgqihdgvskanfsigpmML*/**
A*LAGtyrcygsvthtpyqlsapsdpldi vvtgpy
D2 ekpslsaqqgpkvqagesvtlscSSRS*S*YDMYHLSReggaHERRLPAVRKVNRTfqadfp
athgtyrcfgsfrhsPYEW**SdpsDPL**
LVSvtgnpssswpsptepssksnprhlhiligtsvviilfilLLFLLHlwcsnknaavmdqepagnrI
ANSEDSDEQDpeevtyaqldhcvftqrkitrpSQRPKTPPTDILytelpnakprskvscp

*: Bw4との結合に関与するアミノ酸

** : 抗KIR3DL1抗体との結合に関与するアミノ酸

太字下線 (大文字): RPD法で見つかったKIR3DL1の抗原決定基に含まれるアミノ酸



※D0, D1, D2: KIR3DL1におけるドメイン名

図 4

リコンビナントタンパク質の発現用プラスミドDNAの構築

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成
システム用ベクター (pEU)

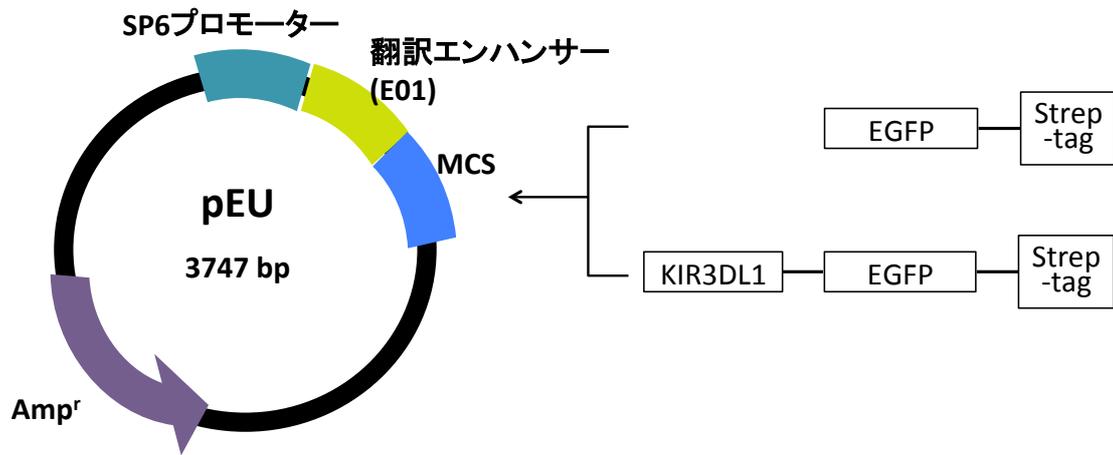


図 5

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム

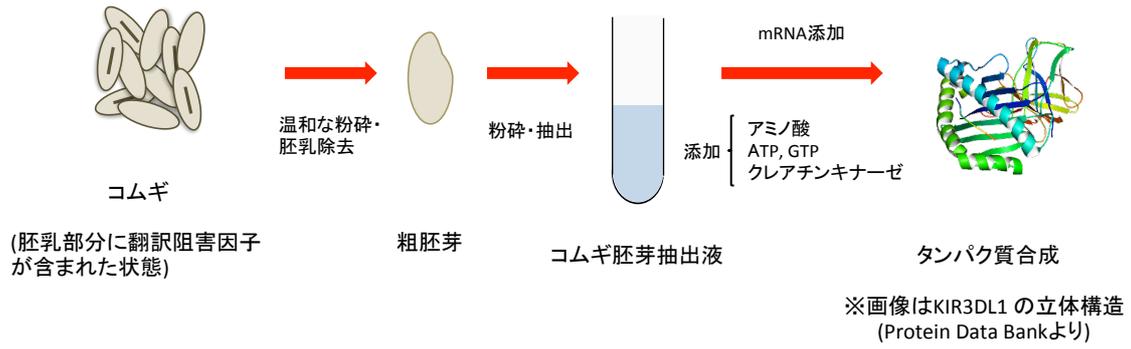
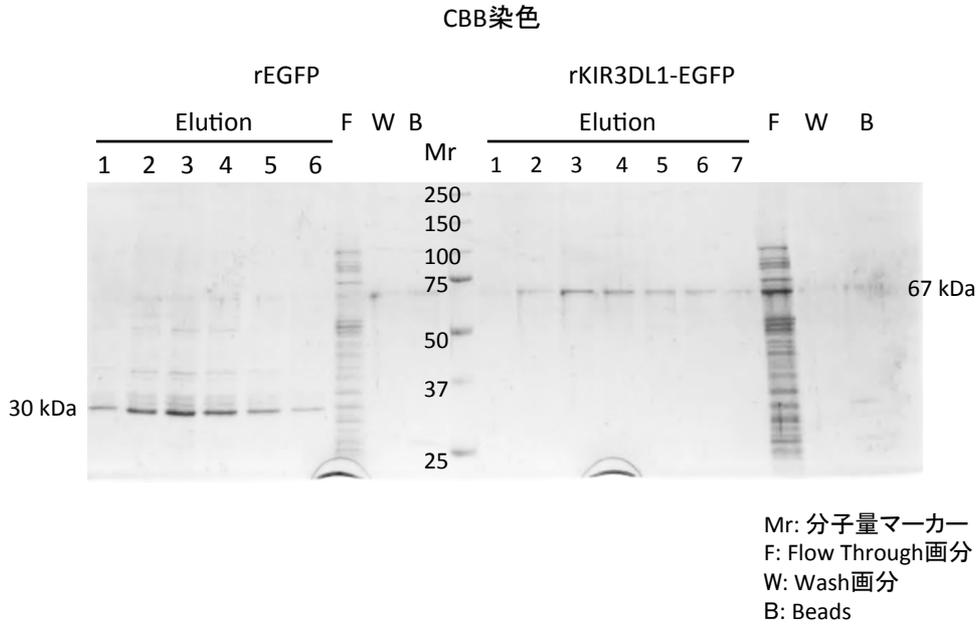


図 6

(A)



(B)

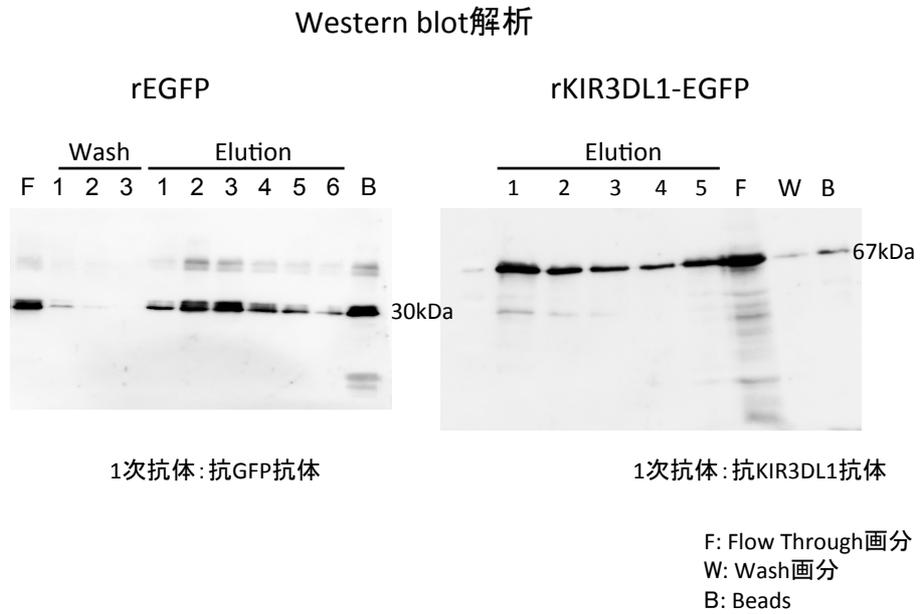


図 7

ELISA解析

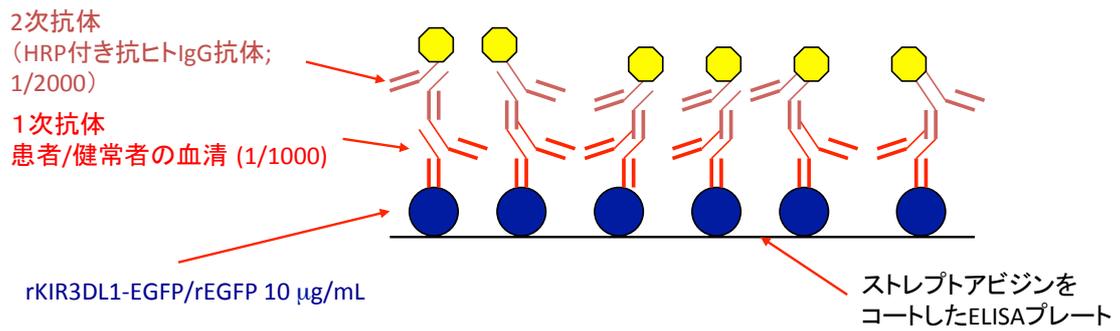


図 8

KIR3DL1配列とKIR2DL1配列との相同性解析

(A)

Range 1: 6 to 348

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
543 bits(1400)	0.0	Compositional matrix adjust.	283/360(79%)	303/360(84%)	17/360(4%)
Query 85	VTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPSNPVVIMVTGNHRKPSLLAHPGFLVKSGERVILQC				144
Sbjct 6	V+ A G + +G+ PH G HRRKPSLLAHPGFLVKS E VILQC VSMACVGFLLQGAWPHE-----GVHRRKPSLLAHPGFLVKS EETVILQC				49
Query 145	WSDIMFEHFFLHKEGISKDPSRLVQIHDGVSKANFSIGPMLLACTYRCYGSVTHTPY				204
Sbjct 50	WSD+MFEHF LH+EG+ D RL+G+ HDGVSKANFSI M LAGTYRCYGSVTH+PY WSDVMFEHFFLHREGMFNDTLRLIGEHHHDGVSKANFSISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPY				109
Query 205	QLSAPSDPLDIVVTGPYKPSLSAQPGPKVQAGEVTLSCSSRSSYDMYHLSREGGAHER				264
Sbjct 110	Q+SAPSDPLDIV+ G YEKPSLSAQPGP V AGE+VTLSCSSRSSYDMYHLSREG AHER QVSAPSDPLDIVIIGLYEKPSLSAQPGPTVLAGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGAHER				169
Query 265	RLPAVRKVNRTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRHSPYEWSDPDLVSVTGNPSSSWP				324
Sbjct 170	RLPA KVN TFQADFPLGPATHGGTYRCFGS SPYEWSDPDLVSVTGNPSS+SWP RLPAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFHDSPEYWSKSSDPLVSVTGNPSSSWP				229
Query 325	SPTEPSSKSGNPRHLHILIGTSVVIIIFILLFFLLHLCWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTAN				384
Sbjct 230	SPTEPSSK+GNPRHLHILIGTSVVIIIL +LLFFLLH WCSNKKNAAVMDQE AGNRTAN SPTEPSSKTGNPRHLHILIGTSVVIIIL-FILLFFLLHRCWCSNKKNAAVMDQESAGNRTAN				288
Query 385	SEDSDEQDPQEVVYIQLDHCVFTQQRKI TRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP				444
Sbjct 289	SEDSDEQDP+EVVY QL+HCVFTQQRKI TRPSQRPKTPPTD I+YTELPNA+ RSKVVSCP SEDSDEQDPQEVVYIQLDHCVFTQQRKI TRPSQRPKTPPTDI IVYTELPNAESRSKVVSCP				348

上段: KIR3DL1配列
中段: 一致したアミノ酸
下段: KIR2DL1配列

(B)

Range 2: 1 to 222

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
152 bits(383)	8e-46	Compositional matrix adjust.	91/224(41%)	127/224(56%)	7/224(3%)
Query 1	MLLMVSMACVGFLLVQRAGPHVGGQDKPFLSAWPSAVVPRGGHVTLRCHYRHRFNNFML				60
Sbjct 1	M L+ VSMACVGFLL+Q A PH G KP L A P +V V L+C F +F+L MSLLFVSMACVGFLLQGAWPHEGVHRRKPSLLAHPGFLVKS EETVILQCWSDVMFEHFFLL				60
Query 61	YKEDRIHVPI-----FHGRLFQESFNMSPVTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPSNPVVI				115
Sbjct 61	++E + + H + + +F++S +T AG Y C GS HSP SAPS+P+ I HREGMFNDTLRLIGEHHHDGVSKANFSISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDI				120
Query 116	MVTGNHRKPSLLAHPGFLVKSGERVILQCWSDIMFEHFFLHKEGISKDPSRLVQIHDGV				175
Sbjct 121	++ G + KPSL A PGP V +GE V L C S ++ + L +EG + + G +G VIIGLYEKPSLSAQPGPTVLAGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGAHERRLPAGPKVNGT				180
Query 176	SKANFSIGPMLLACTYRCYGSVTHTPYQLSAPSDPLDIVVTG 219				
Sbjct 181	+A+F +GP GTYRC+GS +PY+ S SDPL + VTG FQADFPLGPA--THGGTYRCFGSFHDSPEYWSKSSDPLVSVTG 222				

図 9

KIR3DL1配列とKIR2DL3配列との相同性解析

(A)

Range 1: 24 to 341

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
534 bits(1376)	0.0	Compositional matrix adjust.	272/318(86%)	288/318(90%)	0/318(0%)
Query 119	GNHRKPSLLAHPGFLVKSGERVILQCWSDIMFEHFFLHKEGISKDPSRLVGQIHDGVSKA				178
Sbjct 24	G HRKPSLLAHPGFLVKS E VILQCWSD+ F+HF LH+EG KD L+G+ HDGVSKA				83
Query 179	NFSIGPMLLAGTYRCYGSVTHTPYQLSAPSDPLDIVVTGPEYKPSLSAQPGPKVQAGE				238
Sbjct 84	NFSIGPMM LAGTYRCYGSVTH+PYQLSAPSDPLDIV+TG YEKPSLSAQPGP V AGE				143
Query 239	SVTLSCSSRSSYDMYHLSREGGAHERRLPVAVRKNRFTQADFFLGPATHGTTYRCFGSFR				298
Sbjct 144	SVTLSCSSRSSYDMYHLSREG AHERR A KVN TQADFFLGPATHGTTYRCFGSFR				203
Query 299	HSPYEWSDPDPLLVSVTGNPSSSWPSPTEPSSKGNPRHLHLIGTSVVIILPILLFF				358
Sbjct 204	DSPYEWSNSDPLLVSVTGNPNSNSWPSPTEPSSSETGNPRHLHLIGTSVVIILPILLFF				263
Query 359	LLHLWCSSNKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEVYTAQLDHCVFTRKIRTPSQRP				418
Sbjct 264	LLHRWCCKNKNAAVMDQEPAGNRTVNREDSDEQDPEVYTAQLNHCVFTRKIRTPSQRP				323
Query 419	KTPPTDTILYTELPNAKP 436				
Sbjct 324	KTPPTD I+YTELPNA+P 341				

上段: KIR3DL1配列
中段: 一致したアミノ酸
下段: KIR2DL3配列

(B)

Range 2: 1 to 222

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
159 bits(403)	1e-48	Compositional matrix adjust.	95/224(42%)	130/224(58%)	7/224(3%)
Query 1	MLLMVVSMAVCVGFLLVQRAGPHVGGQDKPFLSAWPSAVVPRGGHVTLRCHYRHRFNNFML				60
Sbjct 1	M LMVVSM CVGFFL+Q A PH G KP L A P +V V L+C RF +F+L				60
Query 61	YKE----DRIH-VPIFHGRLFQESFNMSPVTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPSNEFVVI				115
Sbjct 61	++E D +H + H + + +F++ P+ AG Y C GS HSP SAPS+P+ I				120
Query 116	MVTGNHRKPSLLAHPGFLVKSGERVILQCWSDIMFEHFFLHKEGISKDPSRLVGQIHDGV				175
Sbjct 121	++TG + KPSL A PGP V +GE V L C S ++ + L +EG + + G +G				180
Query 176	SKANFSIGPMLLAGTYRCYGSVTHTPYQLSAPSDPLDIVVTG 219				
Sbjct 181	+A+F +GP CTYRC+GS +PY+ S SDPL + VTG				

図 10

(A) KIR3DL1配列とKIR3DL2配列との同源性解析

Range 1: 1 to 421

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
717 bits(1852)	0.0	Compositional matrix adjust.	362/421(86%)	383/421(90%)	0/421(0%)
Query 24		GGQDKPFLSAWPSAVVPRGGHVTLRCHYRHRFNNFMYLKEDRIHVPFPHGRLFQESFNMS			83
Sbjct 1		GGQDKPFLSA PS VVPRGGHV L+CHYR FNNFMYLKEDR HVP FHGR+QESF M			60
Query 84		PVTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPSNPVVIMVTGNHRKPSLLAHPGPLVKSGERVILQ			143
Sbjct 61		PVTTAHAGTYRCRGRSRLTGWASAPSNPLVIMVTGNHRKPSLLAHPGPLVKSGETVILQ			120
Query 144		CWSDIMFEHFFLHKEGISKDPSRLVQIHDGVSKANFSIGPMMALAGTYRCYGSVTHTP			203
Sbjct 121		CWSD+MFEHFFLE+EGIS+DPSRLVQIHDGVSKANFSIGP+M LAGTYRCYGSV H+P			180
Query 204		YQLSAPSDPLDIVVTGYPYKPSLSAQPGPKVQAGESVTLSCSSSSYDMYHLSREGGAHE			263
Sbjct 181		YQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSWSSYDIYHLSREGAHE			240
Query 264		RRLPAVRKVNRTFQADFLGPATHGGTYRCFGSFRHSPYEWSDPSDPLLVSVTGNPSSSW			323
Sbjct 241		RRLAVPKVNRTFQADFLGPATHGGTYRCFGSFRALPCVWSNSDPLLVSVTGNPSSSW			300
Query 324		PSPTPSSKSGNPRHLHLIGTSVVIILFILLFLLHLWCSNKNNAAVMDQEPAGNRTA			383
Sbjct 301		PSPTPSSKSG RHLH+LIGTSVVI LFILLFLL+ WCSNKNNAAVMDQEPAG+RT			360
Query 384		NSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDTILYTELPHNAKFRSKVVC			443
Sbjct 361		NRQDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKQISRPSQRPKTPTDTSVYTELPHAEFRSKVVC			420
Query 444		P 444			
Sbjct 421		P 421			

上段: KIR3DL1配列
中段: 一致したアミノ酸
下段: KIR3DL2配列

(B) KIR3DL1配列とKIR3DL3配列との同源性解析

Range 1: 4 to 391

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
607 bits(1564)	0.0	Compositional matrix adjust.	300/405(74%)	327/405(80%)	17/405(4%)
Query 21		PHVGGQDKPFLSAWPSAVVPRGGHVTLRCHYRHRFNNFMYLKEDRIHVPFPHGRLFQESF			80
Sbjct 4		PHVGGQDKPFLSAWP VV G HVTL+C R FN F L KED + VP + R+F+ SF			63
Query 81		NMSPVTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPSNPVVIMVTGNHRKPSLLAHPGPLVKSGERV			140
Sbjct 64		M PVT AHAG Y C SHPHSPTGWSAPSNPVVIMVTG HRKPSLLAHPGPLVKSGE V			123
Query 141		ILQCWSDIMFEHFFLHKEGISKDPSRLVQIHDGVSKANFSIGPMMALAGTYRCYGSVT			200
Sbjct 124		ILQCWSD+ FE F LH+EGI++DP RLVGQ+HD S+ N+S+GPM ALAGTYRC+GSVT			183
Query 201		HTPYQLSAPSDPLDIVVTGYPYKPSLSAQPGPKVQAGESVTLSCSSSSYDMYHLSREGG			260
Sbjct 184		H PY+LSAPSDPLDIVV VVGLYKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSRSLFDIYHLSREAE			243
Query 261		AHERLPAVRKVNRTFQADFLGPATHGGTYRCFGSFRHSPYEWSDPSDPLLVSVTGNPS			320
Sbjct 244		A E RL AV +VN TFQA+FPLGE THGGTYRCFGSFR P+ WSDPSDEL VSVT			299
Query 321		SSWPSPTPSSKSGNPRHLHLIGTSVVIILFILLFLLHLWCSNKNNAAVMDQEPAGN			380
Sbjct 300		GN R+LH+LIGTSVVIIFAILLFFLLHRWCANKNAVMDQEPAGN			346
Query 381		RTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDT 425			
Sbjct 347		RTVNREDSDEQDPEEVTYAQLNHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDT 391			

上段: KIR3DL1配列
中段: 一致したアミノ酸
下段: KIR3DL3配列

図 11

KIR3DL1配列とKIR3DS1配列との相同性解析

Range 1: 1 to 371

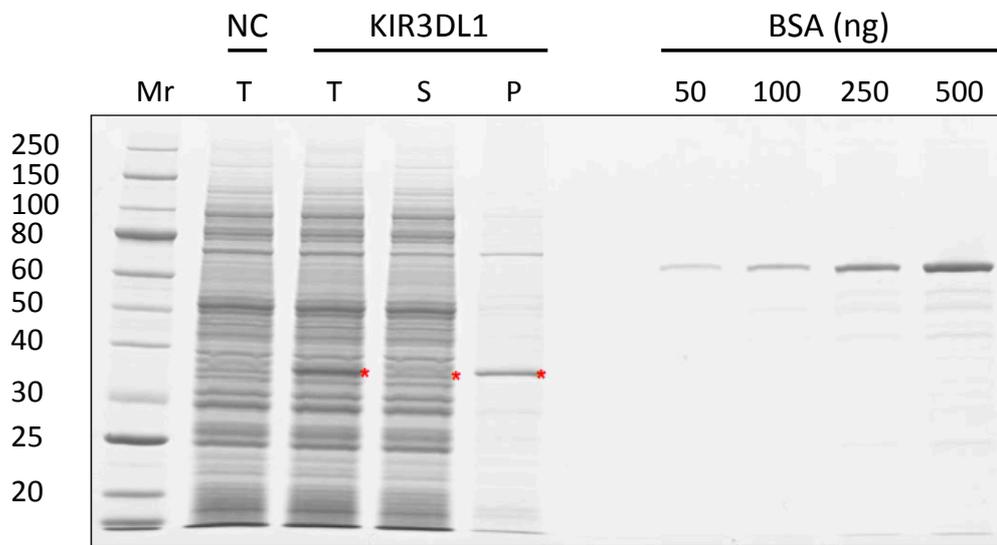
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
726 bits(1873)	0.0	Compositional matrix adjust.	352/371(95%)	356/371(95%)	0/371(0%)
Query 1		MLLMVVSMACVGFLLVQRAGPHVGGQDKPFLSAWPSAVVPRGGHVTLRCHYRHRFNNFML			60
Sbjct 1		MLLMVVSMACVGFLLVQRAGPH+GGQD PFLSAWPSAVVPRGGHVTLRCHYRHRFNNFML			60
Query 61		YKEDRIHVPIFHGRLFQESFNMSPVTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPSNPVVIMVTGN			120
Sbjct 61		YKEDRIHVPIFHGR+EQE FNMSPVTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPSNP+VIMVTGN			120
Query 121		HRKPSLLAHPGFLVKSGERVILQCWSDIMFEHFFLHKEGISKDPSRLVGGIHDGVSKANF			180
Sbjct 121		HRKPSLLAHPGFLVKSGERVILQCWSDIMFEHFFLHKE ISKDPSRLVGGIHDGVSKANF			180
Query 181		SIGPMMLALAGTYRCYGSVTHTPYQLSAPSDPLDIVVTGPEKPSLSAQPGPKVQAGESV			240
Sbjct 181		SIGMMRALAGTYRCYGSVTHTPYQLSAPSDPLDIVVTGPEKPSLSAQPGPKVQAGESV			240
Query 241		TLSCSSRSSYDMYHLSREGGAHERRLPAVRKVNRTFQADFFLGPATHGGTYRCFGSFRHS			300
Sbjct 241		TLSCSSRSSYDMYHLSREGGAHERRLPAVRKVNRTFQADFFLGPATHGGTYRCFGSFRHS			300
Query 301		PYEWSDPSPDPLVSVVTGNPSSSWPSPTEPSSKSGNRLHLILIGTSVVIIILFILLFFLL			360
Sbjct 301		PYEWSDPSPDPLVSVVTGNPSSSWPSPTEPSSKSGN RHLHLILIGTSVV I F +LLFFLL			360
Query 361		HLWCSNKKNA 371			
		H WCSNKK			
Sbjct 361		HRWCSNKKKCC 371			

上段: KIR3DL1配列
中段: 一致したアミノ酸
下段: KIR3DS1配列

: D2ドメイン

図 12

CBB染色



NC: 陰性コントロール
T: 全タンパク質画分
S: 上清画分
P: 沈殿画分
*: KIR3DL1

図 13

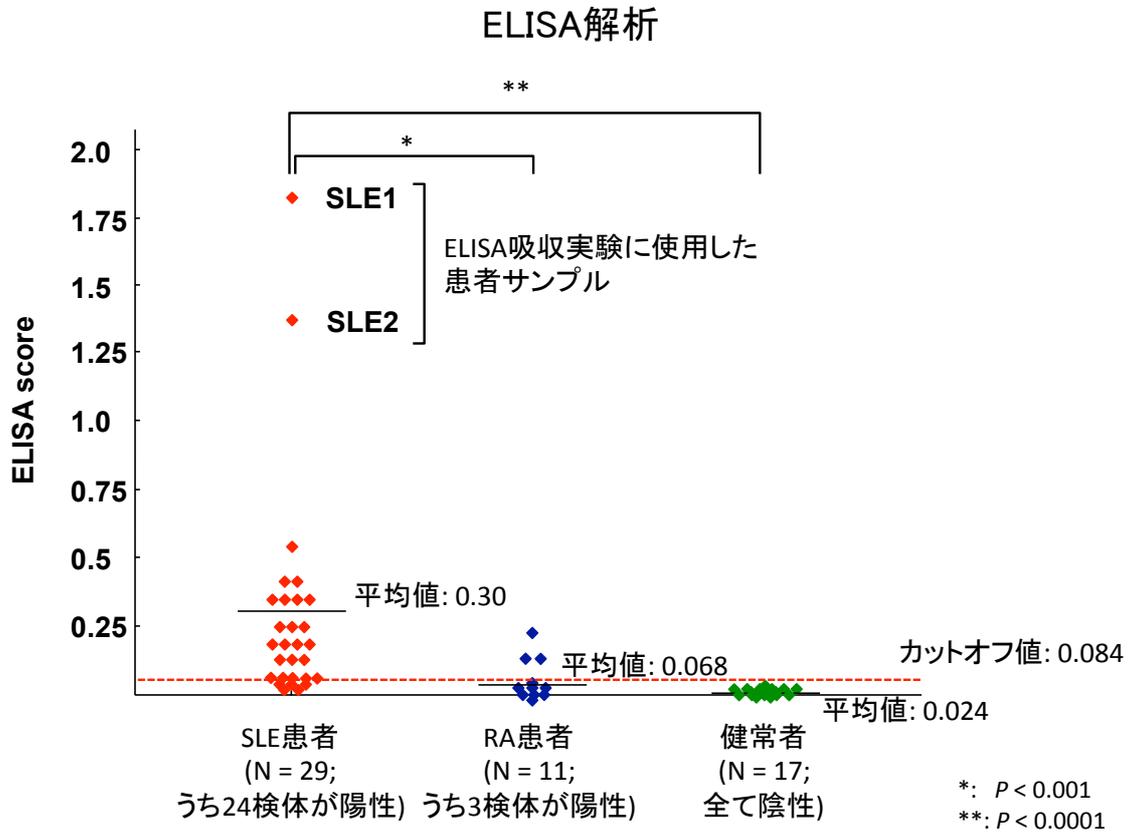


図 14

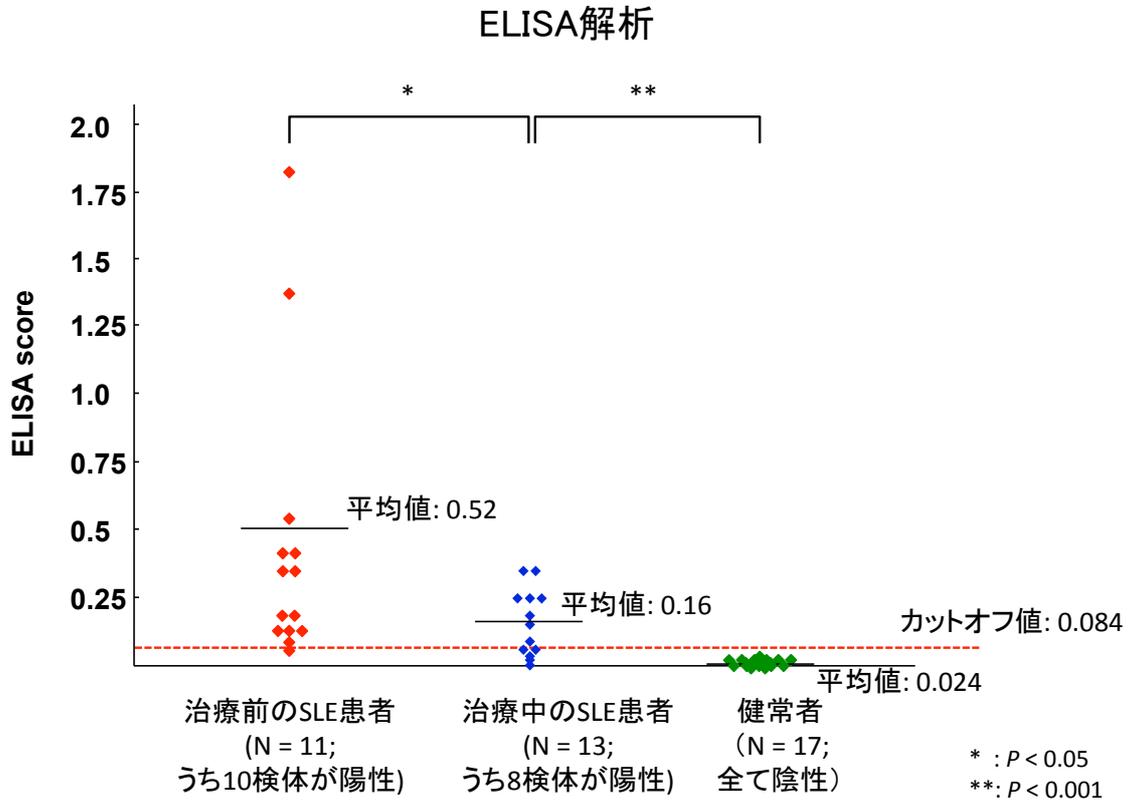
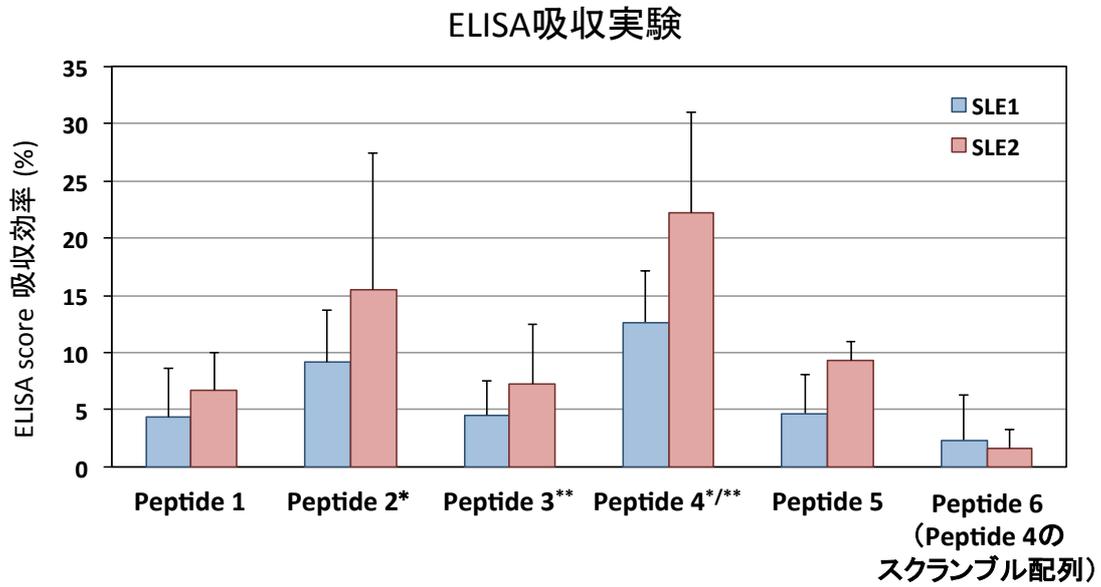


図 15



値はN = 3の平均値 + 標準偏差を示した

*: Bw4との結合に関与するアミノ酸を含むペプチド

** : 抗KIR3DL1抗体との結合に関与するアミノ酸を含むペプチド

図 16

SLE患者のSLEDAI (採血時) と抗KIR3DL1自己抗体のELISA scoreとの相関

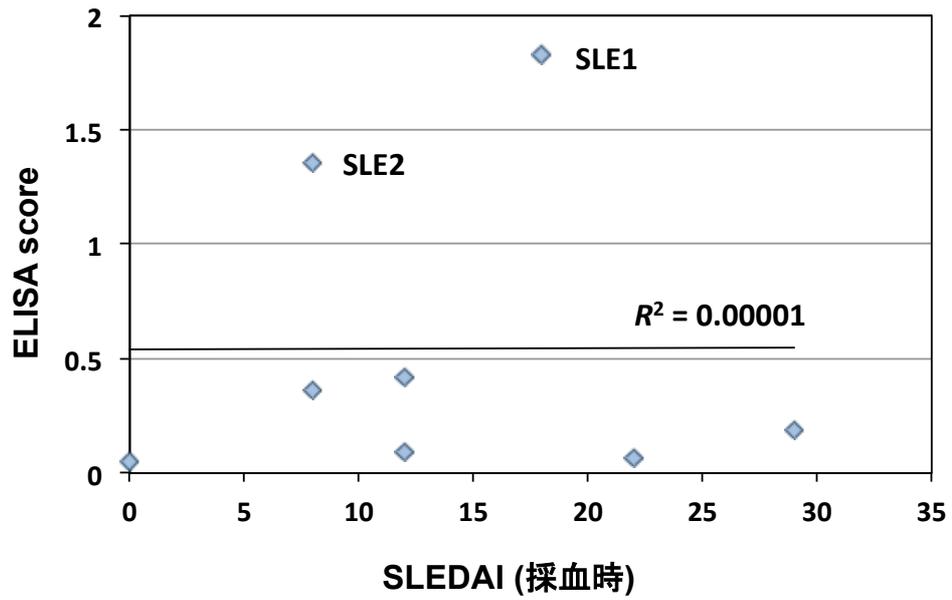
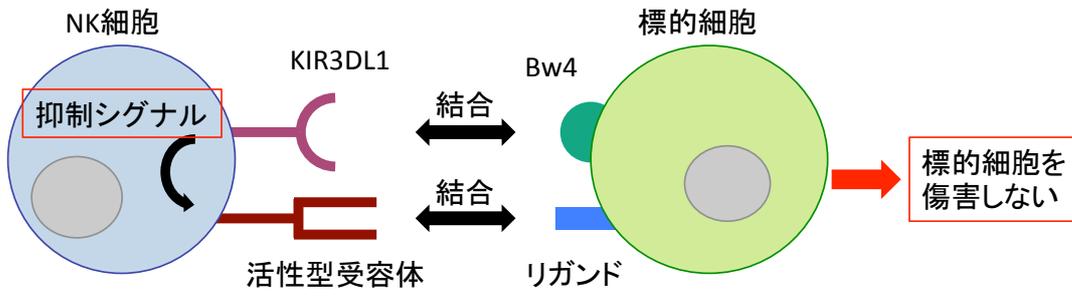


図 17

(A)



(B)

