

氏名	丹羽 幹夫		
学位の種類	博士( 生物科学 )		
学位記番号	博甲 第 8573 号		
学位授与年月日	平成 30年 3月 23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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Isolation of Novel Autoantigens by Lambda Phage Surface Display  (ファージディスプレイ法による自己免疫疾患の自己抗原の探索)		
主査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学教授	博士( 農学 )	三浦 謙治
副査	筑波大学教授	博士( 理学 )	和田 洋
副査	筑波大学教授	博士( 理学 )	中田 和人

## 論 文 の 要 旨

膠原病などの全身性自己免疫疾患では、自己成分に対する抗体（＝自己抗体）の出現が重要な特徴の一つである。自己抗体の対応抗原の多くは、核や細胞質のタンパク質であり、診断マーカーとして広く用いられている。細胞内自己抗原は、免疫沈降法や発現スクリーニング法で見いだされるが、どちらの方法も非常に労力がかかり、多数のスクリーニング実施は難しく、自己抗原を得ることは困難であった。

1985年に開発されたファージディスプレイ法は、大腸菌に感染する繊維状ファージの表面に、外来タンパク質を発現（提示）させ、自己抗体との結合とファージ粒子の増殖を繰り返すことにより、目的とする自己抗原発現ファージを特異的に増幅させる。提示タンパク質の配列情報は、ファージ中のDNAを解析することで容易に解読できるという利点を有する。しかし、繊維状ファージの“形成”が大腸菌の内膜と外膜の間でおこるため、外来タンパク質は大腸菌の内膜を通過しなければならず、膜透過性の低い分子は提示されないため、現在までに細胞内自己抗原をファージディスプレイ法により見出した例はない。この欠点を改善するために、1994年に開発された新しいファージディスプレイ法では、 $\lambda$ ファージの表面に外来タンパク質を発現させる。ファージの“形成”が大腸菌の細胞質でおこるため、外

来タンパク質が内膜を通過する必要がなく、分泌タンパク質と細胞内タンパク質に関わらずファージ表面に“正しいフォールディング”を維持したまま発現できることで、繊維状ファージディスプレイ系の欠点を克服している。本研究で著者は、最初にシェーグレン症候群をターゲットとして、 $\lambda$  ファージディスプレイ法で細胞内自己抗原を選別できるかを実証し、次に関節リウマチをターゲットとして新規自己抗原探索を行った。

第1章では、自己抗原を探索する戦略とシェーグレン症候群 (SjS) に対する自己抗原探索について述べられている。自己抗原を探索する戦略は以下のとおりである。1) ヒト培養細胞からの cDNA ライブラリーの作製。2) 患者血清中の自己抗体を用い、cDNA ライブラリーから自己抗原を発現しているファージの選別。3) 選別したファージから DNA を抽出し、塩基配列を決定し、遺伝子を検索。4) 選別した自己抗原発現ファージとの反応性を測定して、疾患特異的な自己抗原が得られているかを判断。著者はこの戦略を用いて、SjS に対する自己抗原を探索し、7つの既知タンパク質を選別した。これらはいずれも細胞内タンパク質であり、4つは SjS の自己抗原として既知であった。その中の SS-B/La 抗原は診断基準にも用いられる自己抗原のエピトープ (抗体との結合領域) と重なっており、 $\lambda$  ファージディスプレイ法の有効性を裏付けるものであった。残りの3つは新規の自己抗原であり、その中の SMN は抗核抗体産生の機序に関与していると推察された。

第2章では、関節リウマチ (RA) に対する自己抗原探索について述べられている。その結果、14個のタンパク質とペプチドが選別された。これらのうち7個は RA の既知自己抗原であり、4個はその他の既知自己抗原であった。残りの3個は、これまでに何れの自己免疫疾患でも報告のない新規自己抗原であった。この新規自己抗原について、各種血清との反応性を測定した結果、RA に特異的であることが判明した。その中で、IGFBP-4 は骨細胞の増殖促進の役割を持つことから、抗 IGFBP-4 自己抗体が RA の病態形成や進行に関与していることが推察された。この知見を手掛かりに更に研究を進めることで、RA 診断や病因の解明につながるものと期待される。

## 審 査 の 要 旨

本研究で、著者はファージディスプレイ法を用いて、SjS と RA をターゲットとした探索を行い、細胞内自己抗原を選別することに成功した。RA に特異的な3つの新規自己抗原も見出すことができ、RA 診断や病因の解明にも道を開いた。これらの研究成果はファージディスプレイ法を用いて新規自己抗原を見出した最初の例であり、高く評価できる。ファージディスプレイ法は、効率的に多数の自己抗原を見出すことが可能なため、バイオマーカーの探索のみならず、いまだ不明な点が多い自己抗体の産生メカニズムやひいては自己免疫疾患の病因と病態の解明などの応用研究にも貢献すると期待される。

平成30年1月30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に論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。