



## Production of antikeratin autoantibodies by hybrid spleen cells of naive mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩月, 啓氏 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1391">http://hdl.handle.net/10271/1391</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 1 1 4 号	学位授与年月日	平成 3 年 1 2 月 6 日
氏 名	岩 月 啓 氏		
論文題目	Production of antikeratin autoantibodies by hybrid spleen cells of naive mice (未処理マウスの融合脾細胞による抗ケラチン自己抗体の産生)		

医学博士 岩 月 啓 氏  
論文題目

Production of antikeratin autoantibodies by hybrid spleen cells of naive mice  
(未処置マウスの融合脾細胞による抗ケラチン自己抗体の産生)

論文の内容の要旨

1. 研究の目的

表皮の構成成分を抗原とする自己抗体のうち、天疱瘡抗体や類天疱瘡抗体などのように特定の疾患の病因と関連した自己抗体の他に、抗角層抗体と抗表皮細胞質抗体の存在が知られている。両抗体ともほとんどすべての正常人血清中に検出されるが、さまざまな病的状態において抗体価や検出頻度が上昇するとされている。私たちは先の報告で、両抗体の多くが、ケラチン蛋白を抗原とすることを明らかにした。しかし、これらの抗体の産生のメカニズムや、natural autoantibodyとしての性質、また、生物学的および病的意義についてはほとんど知られていなかった。私たちは、マウス脾細胞のハイブリドーマを用いて、抗ケラチン抗体を産生するB細胞クローンが、未処置マウスにも存在し、そのクローンが免疫刺激でどのように変化するかを検索した。

2. 方法と結果

未処置およびケラチン蛋白またはケラチン蛋白以外の抗原で免疫したマウスの脾細胞と、マウスの骨髓腫細胞を融合させてハイブリドーマを作製した。その培養上清中の抗ケラチン抗体をELISA法でスクリーニングし、各グループの抗ケラチン抗体産生クローンの出現頻度を求めた。ELISA法で陽性の上清は、蛍光抗体法とWestern blot法で抗ケラチン抗体であることを確認し、免疫源とした抗原との交差反応性についても調べた。

その結果、無菌的に飼育した未処置マウスでは、抗ケラチン抗体を産生するB細胞クローンが、ハイブリドーマの増殖がみられたウェルの約6-10%に存在することを確認した。さらに、ケラチン蛋白による特異的な免疫をしたマウスでは、抗ケラチン抗体を産生するB細胞クローンを含んだハイブリドーマは約16%まで増加した。ケラチンとは無関係の抗原とadjuvantによる免疫によっても抗体産生クローンは、約17-20%まで増加した。すなわち、特異的な免疫刺激のみならず、非特異的な免疫刺激でも抗ケラチン抗体産生クローンの増殖あるいは活性化が起きることが明らかになった。

産生された抗ケラチン抗体は、IgMに属し、ほとんどが表皮のケラチンとのみ反応し、他の中間径線維と交差反応するものはなかった。表皮における反応様式は、ちょうどヒトの抗表皮細胞質抗体のそれと同一であった。

3. 考察

これらの結果から、生体には主にIgMクラスの抗ケラチン産生クローンが準備されており、自己の表皮細胞が障害を受け、ケラチンが放出されるようなメカニズムや、B細胞のpolyclonalな活性化によって、抗ケラチン抗体の産生が上昇することが示唆された。natural autoantibodyは、ほとんどIgMクラスに属し、個体発生学的に保存された分子を抗原とすることが多いとされているが、抗ケラチン抗体もその一種に属すると考えられる。

抗ケラチン抗体の出現頻度と抗体価は、自己免疫疾患、肝臓疾患、担癌患者や種々の皮膚疾患で上昇すると報告されているが、それらの疾患との因果関係は見出せない。抗ケラチン抗体が問題となるのは、偏平苔癬、エリテマトーデス、熱傷や、ある種の薬疹などでみられるように、表皮細胞が障害を受け、ケラチンが放出される場合であろう。ケラチンは、水に不溶性の蛋白で、しかも、抗原性を持つため、生体内にあっては有害に働く可能性のある異物と考えられる。抗ケラチン抗体は、他の自己抗体と同様に、selfまたはself-mimickingな外因性抗原を不活化するとともに、オプソニン化することによりケラチン蛋白を貪食されやすくし、真に有害な自己免疫反応を予防するためのnatural autoantibodyかもしれない。

## 論文審査の結果の要旨

皮膚科領域の自己免疫病として天疱瘡と類天疱瘡があげられ、これらの疾患の病態と特定の抗原に対する自己抗体(IgG)との関係が近年明らかにされてきている。一方、正常健康者血清中には抗角層抗体(IgG及びIgM)と抗表皮細胞質抗体(IgG及びIgM)の存在が知られ、申請者らは両抗体の多くがケラチン蛋白を抗原としていること、また、さまざまな生体の変化、病的変化(熱傷、偏平苔癬、エリテマトーデス、ある種の薬疹など)によって、これらの抗体価が変動することを観察してきた。

本研究では抗ケラチン抗体産生クローンは既に準備されて、自然自己抗体(natural autoantibody)が産生され、各種の抗原刺激によってその抗体産生が変動するであろうことを究明し、これらの抗体の生物学的、病的意義について考察を加えることを目的とした。この目的のために未処置マウス及び抗原刺激マウスが用いられた。この実験系にハイブリドーマ法が導入され、非常に感度の高いELISA法と蛍光抗体法によって単クローン抗体の検出、さらにWestern blot法によるケラチン蛋白に対する特異性と組織レベルでの特異性の検討がなされ、次のような結果を得た。

1. 10週齢、雄性BALB/c未処置マウスの脾臓B細胞とNS-1ミエローマ細胞とのハイブリドーマが増殖したウェルの約6-10%に抗ケラチン抗体が産生されていた。
2. 同系の未処置マウスをケラチン蛋白にて免疫すると、抗ケラチン抗体陽性ハイブリドーマウェルが約16%に増加し、非特異的抗原であるHTLV-1、ATL細胞、活性化ヒトT細胞とFreund完全アジュバントで免疫した場合は、約17-20%に増加した。また、免疫源として用いた各種ウィルス抗原、ヒトT細胞抗原に対する抗体も産生された。
3. 産生された抗ケラチン抗体はIgMに属し、ほとんどが表皮のケラチンとのみ反応し、他の中間径線維と交差するものは認められなかった。これらの抗体の表皮における反応パターンは、ヒトの抗表皮細胞質抗体のそれと同一であった。

以上の発表に対し審査委員会では次のような質問、討論がなされた。

- 1) 抗ケラチン抗体は皮膚の蛍光抗体染色性により3種類に分けられているが、どのような意味があるのか、
- 2) この抗体でメラノサイト(melanocyte)は染色されるか、
- 3) ケラチン蛋白の種類と抗原決定基について、
- 4) ケラチン蛋白の一次構造と抗原決定基の関係について、
- 5) マウスとヒトで抗ケラチン抗体価は加齢と共に変動するのか、その抗体のクラスは、
- 6) ケラチンは胎生期のどの段階で出現するのか、眼球原基形成の前か後か、マウスでは胸腺形成が胎生14、15日とされているが、抗ケラチン抗体産生細胞は17-18日以降に出現するのか、
- 7) 抗ケラチン抗体産生はT細胞依存性か、
- 8) ビメンチンに対する抗体は産生されないのか、
- 9) 抗ケラチン抗体産生のための感作はどこでおきるのか、T細胞の表皮への浸潤は観察されたか、マクロファージに貪食されている像はみられないか、
- 10) LPSやFreundアジュバンド単独の免疫刺激で抗ケラチン抗体産生クローンの増加はみられるか、

以上の質問に対し、申請者の解答は概ね適切であった。

審議の結果、本審査委員会は本論文が、博士(医学)の学位授与に値する内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 吉 田 孝 人

副査 教授 市 山 新 副査 教授 山 下 昭

副査 助教授 太 田 英 彦 副査 助教授 佐 藤 篤 彦