学位論文題名

ヒト内在性レトロウイルス ERV3 外被組換え蛋白に
対する単クロン抗体の特異性に関する研究

学位論文内容の要旨

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)とその関連配列はヒトゲノムの約1%を占めるとされ、一部の内在性レトロウイルスは現在でも生体内で何らかの役割を果たす蛋白として発現している可能性が示唆されてきた。一方、マウスにおいては内在性レトロウイルスが直接自己免疫疾患発症に関与しているだけでなく、免疫発生に深く関わる内因性スーパー抗原となっていることなどが明らかとなってきた。本研究では1コピー型ヒト内在性レトロウイルスであるERV3(HERV-R)に注目した。ERV3は外被蛋白をコードする領域(env)内に長い読み取り枠(ORF:open reading frame)をもち、mRNA発現が確認され、cDNA解析からウイルス遺伝子のみならず遺伝子制御に関わる遺伝子と類似性を持つ宿主遺伝子の配列を組み込んだ長いmRNAも報告されている。しかし未だにその蛋白レベルでの発現、機能や疾患との関わりについては不明である。そこでERV3 env領域の組換え蛋白を大腸菌発現システムを用いて作製し、それを免疫源とした単クロン抗体の作製を行い、その抗体を用いた生体内ERV3分子の検索、さらにこの組換え蛋白と自己免疫疾患患者血清の反応性について検索しERV3が自己抗原となり得るかどうかについて検討したのでここに報告する。

ERV3 env領域は長いORFを疎水性部分を除くように組換え、大腸菌発現ベクターpET22bに組み込んだ。宿主大腸菌に形質転換しIPTG(isopropylthio-galactosidase)で誘導後に集菌、ペリプラズム領域蛋白を抽出した。アフィニティカラムクロマトグラフィーで組換え遺伝子の大きさから想定される40kDaおよびそれよりも小さい20kDaの位置に見られる蛋白を精製した。これらの蛋白はIPTG誘導をしない場合には精製されないものであるほか、精製の時間経過により40kDa蛋白の減少、20kDa蛋白の増加が見られ、20kDaの蛋白は40kDaの分解されたものである可能性が考えられた。精製した組換え蛋白100 μ gをマウスに免疫し、同マウスから脾細胞を採取しPEG(polyethylene glycol)を用いて常法に従いミエローマ細胞と細胞融合し培養した。増殖したハイブリドーマの培養上清は固相化した精製組換え蛋白を用いてELISA法により抗体産生の有無の検討を行った。スクリーニングにより組換え蛋白に高反応を示す株をクローニングし、抗ERV3 env単クロン抗体1G7を得た。この抗体の免疫グロブリンサブクラスはIgG1であった。

新鮮手術材料から副腎、副腎腺腫、褐色細胞腫さらに分娩直後の新鮮胎盤組織から全

RNAを回収した。全RNAはERV3 envの1.7kb断片をプローブとしてノザン解析を行った。胎盤で以前から報告されているのと同様に9.0kb, 7.3kb, 3.5kbのmRNAを確認したが、その発現は個体間差が見られた。一方、正常副腎、原発性アルドステロン症患者の副腎皮質腺腫では胎盤特異的とされている7.3kb以外の9.0kb, 3.5kbのmRNAを確認したが、褐色細胞腫ではノザン解析レベルでの明らかな発現は検出されなかった。上記で得たものと同じ検体から可溶性蛋白分画を抽出し、一次抗体として精製単クローン抗体(1G7)を用いてウエスタン解析を行った。免疫源とした組換え蛋白に対しては40kDa, 20kDaの両方にその反応が確認され、20kDaの産物は40kDaの特異的分解産物である可能性が支持された。一方、組織から抽出した可溶性蛋白では高発現胎盤、副腎、副腎腺腫に180kDa, 170kDaの2つのバンドを確認したが、mRNA発現の確認されなかった褐色細胞腫には明らかなバンドは検出されず、ERV3が生体内で蛋白として発現している可能性が示唆された。得られた180kDaおよび170kDaの蛋白はERV3 env遺伝子のORFから考えられる62kDaに対して大きなサイズであった。しかし、同ORF配列内に8箇所の糖鎖結合配列が存在し、糖鎖の結合により分子サイズが大きくなっている可能性や二量体、三量体の形成の可能性、他の分子との結合あるいは9.0kbの大きなmRNAの存在よりシス型の結合蛋白を認識している可能性もあり今後の検討課題である。

北海道赤十字血液センターより供与された健常者献血者から分離した血清および北大第2内科より供与された全身性エリテマトーデス(SLE)患者および慢性関節リウマチ(RA)患者からの血清について固相化したERV3 env組換え蛋白を利用したELISA法を用いて反応性を検討した。健常者の吸光度の平均値は0.201, SLE患者で0.319, RA患者で0.152であったが、SLE患者では一部に高い反応性を示す症例が存在し、各群を比較すると健常者やRA患者に比べて弱いながら統計学的な有意差をもってその高反応性が支持された。さらにその反応性は患者血清中のC4レベルと負の相関を、抗DNA抗体の抗体価とは正の相関をとともに有意に認めた。しかし、CH50やIgG値, IgM値, 抗核抗体, 白血球数, 投与ステロイド量などとの相関は見られなかった。

内在性レトロウイルス産物が自己免疫疾患患者の血清中自己抗体の対応抗原となりうるかという疑問に対しては、以前からマウスにおいてその病因の一端を担う例が報告されている。これらモデル動物の例から考えて、ヒトにおいても内在性レトロウイルス産物が自己抗原の一つとして何らかの形で自己免疫疾患の病因に関与している可能性が考えられる。ヒトにおいてはmRNA発現レベルでの検討はいくつか報告されているが明らかな関与を示唆する結果は得られていない。本研究においてSLE患者特に2症例についてその血清中にERV3 env組換え蛋白と高い反応性を示す抗体の存在が確認され、少なくとも一部のSLE患者においてはERV3産物が自己抗原となりうると考えられた。さらにSLE患者全体の反応性が血中のC4レベルと負の相関、抗DNA抗体の抗体価と正の相関を示すことよりSLEの病勢と関連する可能性をも示唆する。もちろん、今後症例数を増やすと共に本研究でSLE患者血清中に見いだされた抗体の真の対応抗原がERV3ウイルス産物なのか検討していく必要があるが、本研究はヒト内在性レトロウイルス産物が自己抗原としてSLEの病態に何らかの形で関与している可能性を示唆するものとしてその意義は深い。

本実験で作製したERV3 env領域を利用した組換え蛋白及び単クローン抗体はERV3が

生体内でどのような発現をし、またどういう機能、役割を果たしているかを解明していく上で大変有用である。さらに今後の自己免疫疾患における内在性レトロウイルスの役割を研究する上での一つの糸口となるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 柿 沼 光 明

学位論文題名

ヒト内在性レトロウイルス ERV3 外被組換え蛋白に 対する単クロン抗体の特異性に関する研究

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)とその関連配列はヒトゲノムの約1%を占めるとされ、一部の内在性レトロウイルスは生体内で何らかの役割を果たす蛋白として発現している可能性が示唆されてきた。一方、マウスにおいては内在性レトロウイルスが直接自己免疫疾患発症に関与しているだけでなく、免疫発生に深く関わる内因性スーパー抗原となっていることなどが明らかとなってきた。本研究では1コピー型ヒト内在性レトロウイルスであるERV3(HERV-R)に注目した。ERV3は外被蛋白領域(env)内に長い読み取り枠(ORF:open reading frame)をもち、mRNA発現が確認されているが未だにその蛋白レベルでの発現、機能や疾患との関わりについては不明である。本研究はERV3 env領域の組換え蛋白を大腸菌発現システムを用いて作製し、それを免疫源とした単クロン抗体の作製を行い、その抗体を用いた生体内ERV3分子の検索、さらにこの組換え蛋白と自己免疫疾患患者血清の反応性について検索したものである。

ERV3 env領域の長いORFのうち疎水性部分を除いた約1kbを大腸菌発現ベクターpET22bに組み込んだ。宿主大腸菌に形質転換しIPTGで導入遺伝子の発現を誘導後に集菌、ペリプラズム領域蛋白を抽出した。アフィニティカラムクロマトグラフィーで精製すると組換え遺伝子の大きさから想定される40kDaおよびそれよりも小さい20kDaの蛋白を精製することができた。これらの蛋白はIPTG誘導をしない場合には精製されないものであるほか、精製の時間経過により40kDa蛋白の減少、20kDa蛋白の増加が見られ、20kDaの蛋白は40kDaの分解されたものであると考えられた。精製した組換え蛋白をマウスに免疫し、その後脾細胞を採取しPEGを用いて常法に従いミエローマ細胞と細胞融合し培養した。増殖したハイブリドーマの培養上清は固相化した精製組換え蛋白を用いてELISA法によりスクリーニングし、組換え

蛋白に高反応を示す株1G7を得た。この抗体の免疫グロブリンサブクラスはIgG1であった。

新鮮手術材料から副腎、副腎腺腫、褐色細胞腫さらに新鮮胎盤組織からRNAを回収し、ERV3 envの1.7kb断片をプローブとしてノザン解析を行った。胎盤で9.0kb、7.3kb、3.5kbのmRNAを、正常副腎、副腎皮質腺腫では9.0kb、3.5kbのmRNAを確認したが、褐色細胞腫では明らかな発現は検出されなかった。上記で得たものと同じ検体から可溶化蛋白分画を抽出し一次抗体として精製単クローン抗体(1G7)を用いてウエスタン解析を行った。免疫源とした組換え蛋白に対しては40kDa、20kDaの両方にその反応が確認され、20kDaの産物は40kDaの特異的分解産物である可能性が支持された。一方、組織から抽出した可溶化蛋白では胎盤、副腎、副腎腺腫に180kDa、170kDaの2つのバンドを確認したが、褐色細胞腫には明らかなバンドは検出されなかった。得られた180kDaおよび170kDaの蛋白はERV3 env遺伝子のORFから考えられる62kDaに対して大きなサイズであり、今後の検討課題であるがERV3が生体内で蛋白として発現している可能性が示唆された。

健常者から分離した血清および全身性エリテマトーデス(SLE)患者および慢性関節リウマチ(RA)患者からの血清について固相化したERV3組換え蛋白を利用したELISA法を用いて反応性を検討した。SLE群では一部に高い反応性を示す症例が存在し、健常群やRA群に比べて統計学的有意差をもってその高反応性が支持され、少なくとも一部のSLE患者においてはERV3産物が自己抗原となりうると考えられた。さらにその反応性は患者血清中のC4レベルと負の相関を、抗DNA抗体の抗体価とは正の相関をとともに有意に認めSLEの病勢と関連する可能性も示唆した。

口頭発表において、免疫科学研究所の柿沼教授より内在性レトロウイルスの一般的特徴、ERV3のヒトゲノムにおける存在様式、加齢によるERV3蛋白発現の相違等について、小池教授よりERV3蛋白の構造、組換え蛋白をターゲットとしたELISA法による血清中抗体の測定の方法論等に関して質問があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

ヒト内在性レトロウイルスERV3の蛋白としての発現に関して、あるいはヒト内在性レトロウイルス蛋白と自己免疫疾患に関する報告はなく、作製したERV3 env領域を利用した組換え蛋白及び単クローン抗体はERV3が生体内でどのような発現をし、またどういう機能、役割を果たしているかを解明していく上で意義は大きい。以上より本論文は博士(医学)の学位授与に値するものと判定する。