氏　　名	おくむら　まいこ 奥村　麻衣子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	富医薬博甲第 245 号
学位授与年月日	平成 29 年 9 月 28 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教育部名	富山大学大学院医学薬学教育部　博士課程 生命・臨床医学　専攻
学位論文題目	Production of autoantibodies reactive to PEP08, a peptide containing an epitope of the Ro52/TRIM21 autoantibody, is clinically related to the morbidity and severity of interstitial lung diseases in connective tissue diseases （Ro52 エピトープ PEP08 に対する抗体産生と膠原病関連間質性肺炎の発症率および重症度の関連について）

論文審査委員

（主査）	教　授	中辻　裕司
（副査）	教　授	笹原　正清
（副査）	教　授	山本　善裕
（副査）	教　授	林　　龍二
（指導教員）	教　授	戸邉　一之

論 文 内 容 の 要 旨

［研究目的］

Ro52 タンパクは E3 ユビキチンリガーゼとして炎症の調節に関与する細胞質内タンパクである。TRIM ファミリー内に属するため TRIM21 とも呼ばれている。Ro52 タンパクは E3 ユビキチンリガーゼの活性を調節する N 末端 RING ドメイン、オリゴマー化に関与する B-box ドメイン、Coiled-Coil (C-C)ドメイン、ウイルス除去等に関わる PRYSPRY の４つのドメイン構造からなる。

Ro52/TRIM21 タンパクに対する自己抗体（Ro52 自己抗体）は、全身性エリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群(SS)などの様々な膠原病患者の血清中に認められ、これらの疾患の発症と関連すると言われている。特に近年、間質性肺炎を合併する膠原病患者においてこ Ro52 自己抗体が認められ、臨床的な統計では強皮症(SSc)や混合性結合織病(MCTS)に合併する間質性肺炎の発症率や重症度に関連するという報告もある。これまでに Ro52 自己抗体と全身性エリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群(SS)などの膠原病との関連についての研究がいくつかなされ、エピトープの報告もいくつかあるが、多くはヒト血清中のポリクローナルな Ro52 自己抗体を用いており、その詳細は不明であった。また、マウス由来のモノクローナル Ro52 自己抗体を用いた研究がなされており、SS 患者の児に発症する胎児心ブロック(CHB)について特異的なエピトープが見いだされ CHB 胎児の心筋には Ro52 自己抗体が高発現することが報告されているが、間質性肺炎との関連については研究がなされていない。またヒト由来のモノクローナル抗体を用いた研究はなく、間質性肺炎との分子レベルでの関連は不明である。

今回我々は既に本学免疫学教室で確率されている immunospot array assay on a chip (ISAAC 法)を用いて、当院の間質性肺炎を有する皮膚筋炎患者からモノクローナルヒト Ro52 自己抗体を単離し、より詳細な Ro52 自己抗体と間質性肺炎との関連を調べることを目的とした。

［方法］

223 名の膠原病患者の血清中の Ro52 自己抗体価を調べ、抗体価の高い劇症型間質性肺炎患者 4 名を選択した。4 名の患者の末梢血単核球かから単一Ｂ細胞操作技術（ISAAC）を用いて、複数の Ro52 モノクローナル抗体(Ro52-mAb)を得た。これらの Ro52-mAb を用いて、Ro52 の各ドメインのフラグメントリコンビナントタンパク質と Coiled-Coil(C-C)ドメインの合成ペプチドライブラリーを作成

して、R052 自己抗体のエピトープ PEP08 を決定した。次に PEP08 ペプチドに結合する R052 自己抗体産生と間質性肺炎の発症率と重症度の関連について調べた。

［結果］

当院の 223 名の膠原病患者から、血清中の Ro52 自己抗体価が高くかつ重症の間質性肺炎を合併する 4 名の患者を選び、それらの末梢血リンパ球から ISAAC 法を用いて計 12 種のモノクローナル Ro52 自己抗体を単離した。まず、この抗体を用いて膠原病関連間質性肺炎患者の肺組織を免疫染色したところ、浸潤細胞や一部の肺胞上皮細胞の細胞質内に Ro52/TRIM21 が高発現していることが示された。次に、これらの抗体を用いてウエスタンブロット法を行いほとんどの抗体が C-C ドメインに結合することを見いだした。さらに C-C ドメイン内の結合部位を調べるため C-C ドメインのペプチドライブラリを作成し、ELISA 法にてこれらの抗体のエピトープ(PEP08)を同定した。さらに、223 名の患者について、このエピトープに結合する血中の自己抗体の有無によって間質性肺炎の発症率と重症度を比較し、抗 Ro52/TRIM21 抗体は間質性肺炎の発症率(OR=3.84, p=0.0002)と重症度(OR=2.91, p=0.0073)に相関があることを見いだした。

［総括］

膠原病における PEP08 に反応する Ro52 自己抗体の産生を調べることで間質性肺炎の発症率と重症度を予見することが可能である。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

「目的」

抗 Ro52/TRIM21 自己抗体（以下抗 Ro52 抗体）は間質性肺炎を発症する膠原病患者の血清に高頻度に検出される。本研究は、Ro52 自己抗体のエピトープを決定し、そのエピトープに結合する自己抗体産生と間質性肺炎の発症率と重症度の関連を明らかにすることを目的とする。

「方法」

1. 対象患者

富山大学附属病院第一内科を受診した膠原病および膠原病関連間質性肺炎患者のうち抗 Ro52 抗体を測定した 223 人。間質性肺炎は日本呼吸器学会のガイドラインに従い診断した。尚、本研究は倫理委員会の承認の下遂行された。

2. 抗体産生細胞(ASCs)の同定、抗体 cDNA の増幅および抗体精製

抗 Ro52 抗体陽性皮膚筋炎-間質性肺炎（DM-ILD）患者末梢血より immunospot array assay on a chip（ISAAC)法により Ro52 特異的抗体産生細胞を同定、回収した。V_H、V_L配列を発現ベクターに挿入し抗 Ro52 抗体を精製した。同抗体で DM-ILD 患者の肺組織染色をし、また抗原である Ro52 の C-C ドメインの計 21 種類のペプチドライブラリーを合成しエピトープを探索した。

3. 間質性肺炎の発症率、重症度を、エピトープを同定した抗体 PEP08 抗体の観点から解析した。

［結果と考察］

1 モノクローナル抗 Ro52 抗体の単離

223 人の患者中 95 人が抗 Ro52 抗体陽性であり、内 62 人（65%）が間質性肺炎を合併していた。この内４人の重症間質性肺炎を有する DM-ILD 患者末梢血から ISAAC 法を用いて、106 個の抗 Ro52 抗体産生細胞（ASCs）を検出し、最終的に 12 種のモノクローナル抗体を得た。

2 抗 Ro52 抗体による間質性肺炎患者肺組織の免疫組織染色

膠原病を合併した重症間質性肺炎を有する患者２名の肺組織に対し、得られた抗体が患者肺組織と結合することを免疫組織学的に示した。

3 エピトープマッピング

Ro52 の各ドメインのフラグメントリコンビナントタンパク質を合成し､12 種の抗体のうち 11 種は、C-C ドメインに特異的に結合することを示した。本ドメインのペプチドライブラリーを合成し、内 2 つの抗体（Ab55-37、Ab150-61）が PEP08 と特異的に結合することを確認した。

4 PEP08 抗体の産生と間質性肺炎の発症率および重症度との関連

47 人の抗 PEP08 抗体陽性群と 176 人の陰性群で間質性肺炎の発症率及び重症度について比較検討した。発症率は、抗 PEP08 抗体陽性群では 77%（36/47）、陰性群では 46%（81/176）でありオッズ比 3.84（p=0.0002）と高値を示した。さらに間質性肺炎の重症度指標の一つである KL-6 陽性率にて両群で比較したところ、抗 PEP08 抗体陽性群では 78%（31/40）が KL-6 陽性、陰性群では 54%（85/157）が KL-6 陰性でありオッズ比が 2.91 と高値を示した（p= 0.0073）。これらの結果から、抗 PEP08 抗体陽性患者は抗 PEP08 抗体陰性患者に比べて、間質性肺炎の発症率及び重症度が高いことが示された。

［総括］

本研究で奥村麻衣子氏は、膠原病患者の血清中に認められる Ro52 自己抗体のモノクローナル抗体を作成し、エピトープを決定した。さらにそのエピトープに結合する自己抗体産生と間質性肺炎の発症率と重症度に有意な相関があることを初めて明らかにしたことから、新規性が高い研究である。また奥村氏の精製した PEP08 に反応する Ro52 自己抗体の産生を調べることで膠原病における間質性肺炎の発症率と重症度を予見することが可能となり、医学における学術的重要性は高く、臨床検査のバイオマーカーとしての臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査委員会は本論文を博士（医学）の学位に十分値するものと判定した。