

氏名	服部 高子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博乙第 3509 号
学位授与の日付	平成12年9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	軟骨由来の慢性関節リウマチ関連抗原RA-A47に関する研究
論文審査委員	教授 山本 照子 教授 福井一博 教授 滝川正春

学位論文内容の要旨

(目的) 慢性関節リウマチ(RA)における自己抗体産生機構には、関節部に外的刺激が加わり、軟骨細胞や周辺組織から炎症性サイトカインが放出され、その刺激によりマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)などの蛋白分解酵素が放出され、軟骨細胞の破壊がおり、放出された軟骨細胞破壊成分に対する抗体が産生される経路と、まず軟骨細胞の高分子成分を認識する抗体が何らかの要因で産生され、軟骨細胞が破壊される経路が想定される。すでに油谷らはヒト軟骨細胞様細胞株(HCS-2/8)の細胞膜成分からRA患者血清が高頻度に認識する抗原3種(105kDa, 68kDa, 47kDa)を検出しており、これらのうち105 kDa, 68 kDaの抗原については疾患の進行にしたがい認識度が上昇するが、47 kDaの抗原については疾患の程度に関係なく、健常者と比較して有意に高い認識度を示すことを明らかにしている。したがって47kDaの抗原に対する抗体価は疾患の早期に上昇すると考えられる。そこで本研究ではこの47kDaの抗原に注目し、軟骨細胞膜からの単離を試み、その構造解析を行った。さらに機能を解析し、その病理的意義を検討した。

(方法) 47kDa蛋白の精製: コンフルエントに達したヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8細胞からスクロース密度勾配超遠心を用いて、細胞膜を回収した。これを界面活性剤溶液で溶解後、連続分取型SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で溶出し、47 kDa付近の画分を回収し、さらに逆相HPLCカラムに注入し、30~60% アセトニトリルグラディエントにより分画した。280nmの吸収ピーク毎に画分を回収し、SDS-PAGEおよび患者血清を用いたイムノプロットにより陽性蛋白の存在および純度を確認し、そのうち1種の蛋白をRA-A47と命名した。精製RA-A47蛋白のN-末端配列は自動アミノ酸配列解析装置を用いて解析した。

ノーザンブロット解析: HCS-2/8細胞から抽出した全RNA 20 μ gを電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写した。*ra-a47*プローブは全RNAから既知のN-末端配列を基に設計した縮合プライマーセットを用いて増幅し、サブクローニングすることにより作製した。

免疫沈降およびゼラチンへの結合: HCS-2/8を 35 S]メチオニンで1時間ラベルし、1%ノニドット-40を含む溶解緩衝液で細胞を可溶化した。不溶蛋白を除去した後、RA患者血清で認識される蛋白を13,000xg, 10分間の遠心で回収し、さらに沈降画分を懸濁後、ゼラチンセファロースに結合する蛋白を230 xg, 1分の遠心で分離した。ビーズに結合した蛋白はSDSで可溶化後、SDS-PAGEし、オートラジオグラフィで検出した。

ra-a47 遺伝子の単離: *colligin*, *colligin-2*遺伝子の両方を増幅するプライマーセットを用いてPCRを行い、サブクローニング後、塩基配列を決定した。

colligin および*colligin-2*のReverse transcriptase(RT)-PCR解析: RT-PCR解析にはDNA分解酵素およびプロテイナーゼK処理した全RNA 1 μ gをRTの際のテンプレートとして用いた。

抗体吸収実験: 抗HSP47抗体をHCS-2/8細胞に吸着させ、残余の抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(結果) 1) RA-A47蛋白のHCS-2/8細胞からの単離とN-末端配列解析:連続分取型SDS-PAGE, 逆相HPLCの結果, RA患者血清との反応性を持つ2種の蛋白(P5およびP6)が回収された。これらは単一成分で, さらにどちらも抗HSP47抗体との反応性を有していた。P5とP6蛋白のアミノ酸配列解析の結果, P5に関してはN-末端21個のアミノ酸配列がヒト熱ショック蛋白(HSP)47遺伝子として報告されている *colligin* 遺伝子から類推されるアミノ酸配列と81%, また, *colligin* 遺伝子のホモログとして報告されている *colligin-2* 遺伝子から類推されるアミノ酸配列と100%一致しており, このP5蛋白をRA-A47と命名した。また, P6蛋白については配列を決定することができなかった。

2) *ra-a47*mRNAのノーザンブロット解析: HCS-2/8の全RNAを用いたノーザンブロット解析で, *ra-a47* mRNAは*colligin-2*, *colligin*とほぼ同じ2.0 kbであることが判った。また, *ra-a47* mRNAは42℃の培養で熱誘導を受け, さらに1~10 ng/mlのトランスフォーミング成長因子(TGF)- β 存在下の培養で発現量が増加した。なお, この時II型コラーゲン(*COL2A1*) mRNAの発現量も増加した。

3) RA-A47のゼラチンセファロースへの結合: HCS-2/8細胞の1%ノニデット-40で可溶化される画分からRA患者血清で免疫沈降した蛋白のうち, RA-A47はすべてゼラチンセファロースに結合した。

4) *ra-a47* cDNAの単離と塩基配列決定: HCS-2/8から単離されたクローンは全て同一で, *colligin-2* cDNAと3塩基異なるのみだった。この*colligin-2*との相違部分はゲノムDNAでも配列に誤りの無い事が確かめられた。また, ヒト歯根膜線維芽細胞(HPLF)でも同様に*ra-a47* cDNAおよびゲノムDNAを単離したところ, HCS-2/8由来*ra-a47* と1塩基異なるのみで他は全て一致していた。また, *colligin* cDNAは検出されなかった。

5) 腫瘍壊死因子(TNF) α 添加時の*ra-a47* mRNAの発現量の変動: HCS-2/8にTNF α を添加した場合, *ra-a47* mRNAの発現量は減少したが, 一方, *COL2A1* mRNAの発現量は変動しなかった。また, *mmp-9* mRNA, 誘導型一酸化窒素合成酵素(*iNOS*)mRNAの発現が誘導されている事が観察された。

6) TNF α 添加時のRA-A47の細胞内局在の変化: TNF α で処理したHCS-2/8細胞により, 抗ラットHSP47抗体が吸収される事が観察されたことからRA-A47がTNF α の刺激により細胞表面に露出している事が示唆された。

(考察) ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株HCS-2/8より単離した, RAの自己抗体で認識される2種の47kDa蛋白のうち, P5の蛋白(RA-A47と命名)は, そのN-末端21個のアミノ酸配列が*colligin*から類推されるアミノ酸配列と81%, また, *colligin-2*から類推されるアミノ酸配列と100%一致していたこと, 抗HSP47抗体と反応し, ゼラチンと結合したこと, 熱ショックによって発現誘導を受けたこと, TGF- β により*COL2A1* mRNAと同調して発現が増加したことなどから, コラーゲン特異的分子シャペロンであるヒトHSP47に類似した構造と機能を有する蛋白であることが示唆された。また, *colligin*ファミリーに相同性を持つ領域を使ったPCRで単離したクローンは全て同一で, その塩基配列が*colligin-2*とほぼ同一であったことから, *ra-a47*と*colligin-2*遺伝子は同一の遺伝子でRA-A47蛋白は未同定の*colligin-2*の遺伝子産物であることが判明した。さらに, HCS-2/8細胞では, 炎症性サイトカインの刺激によりコラーゲンの発現量に対する*ra-a47*の発現量が相対的に減少したことから, 軟骨細胞中のコラーゲンとコラーゲン特異的分子シャペロンのインバランスが関節炎の際の軟骨破壊に関与していると考えられる。また, このような状況下で細胞内に局在していたRA-A47が細胞表面に露出することが慢性関節リウマチにおける抗原提示の引き金になっているのではないかと推察される。

論文審査結果の要旨

本研究は慢性関節リウマチ（RA）の病因を解明する事を最終目的として、以下の点を明らかにしたものである。

- 1) 患者の血清中に高頻度に存在する47 kDaの特異抗原（RA-A47）をヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8の細胞膜より単離し、N-末端アミノ酸配列を決定した。
- 2) RA-A47をコードする遺伝子をHCS-2/8およびヒト歯根膜線維芽細胞株HPLFより単離し、塩基配列を決定し、RA-A47の全長構造を明らかにした。
- 3) RA-A47はその構造上、および機能上の特性から、コラーゲン特異的分子シャペロンであるヒトHSP47遺伝子として報告されている*colligin-2*遺伝子の産物であった。
- 4) RA患者の滑液中に放出が確認されている炎症性サイトカインをHCS-2/8に添加し、RAの病態を*in vitro*で再現すると、*ra-a47* mRNAの発現量が減少したことから、細胞外へのコラーゲンの分泌が妨げられていると思われた。また一方で炎症性サイトカインのうち、腫瘍壊死因子(TNF α)の添加で、タンパク分解酵素産生誘導が確認され、細胞外基質が積極的に分解されていることがわかった。これらの点から、RAの病態の特徴である関節軟骨破壊の形成が裏付けられた。
- 5) TNF α のHCS-2/8への添加で、本来細胞内に存在するRA-A47が細胞表面および細胞外に放出されていた事から、RAにおけるRA-A47の自己抗原としての認識機構を示唆した。

本研究は、RAの抗原として細胞内に存在する分子シャペロンであるRA-A47を初めて同定しただけでなく、未だ発症機構の不明なRAが、分子シャペロンの発現量低下によって引き起こされるという新しい概念を提唱するものである。よって、本申請論文は、学位論文として価値があるものと認める。