Diazepam-binding inhibitor-related protein 1はPNH血球陽性の再生不良性貧血患者における一つの候補自己抗原である

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 馮, 興民
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/17248

【総説】

第五回　高安賞優秀賞受賞論文

論文　「Diazepam-binding inhibitor-related protein 1: a candidate autoantigen in acquired aplastic anemia patients harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells」
Blood
Vol.104, No. 8, Page 2425-2431　　2004年10月掲載

Diazepam-binding inhibitor-related protein 1はPNH血球陽性の再生不良性貧血患者における一つの候補自己抗原である

馮　興民（Feng Xingmin）

研究の背景

再生不良性貧血は造血幹細胞の持続的な減少のために，汎血球減少と骨髄低形成を呈する症候群である．ほとんどの症例においてATGやCsAなどの免疫抑制療法が奏効することから，造血前駆細胞に対する免疫的な攻撃が存在すると考えられている．しかし，多くの血液学者が長年研究してきたにもかかわらず，その標的となる自己抗原は明らかにされていない．

インスリン依存性糖尿病や多発性筋炎などの臓器特異性自己免疫性疾患において病態を形成しているのは主に自己反応性T細胞と考えられているが，多く場合，T細胞の標的蛋白質に対する自己抗体が同時に検出される．自己抗体の検出は自己抗原の同定と疾患の免疫病態の診断に有用な可能性がある．われわれはHLA-DRB1*1501の保有と発作性夜間血色素尿症（PNH）形質の血球が微増，という免疫病態の二つのマーカーを兼ね備えた再生不良性貧血患者の血清中に，巨核芽球性白血病細胞株UT7に対する抗体が存在することを蛍光顕微鏡で見出した．これらの患者血清中のUT7に対する抗体を検討すれば，再生不良性貧血の自己抗原を同定できるではないかと予想した．

そこで，再生不良性貧血患者の血清を用いて巨核芽球性白血病細胞株UT7由来の蛋白質に対する抗体をスクリーニングしたところ，diazepam-binding inhibitor-related protein 1 (DRS-1)が再生不良性貧血の自己抗原の一つであることが明らかになった．

結　　果

再生不良性貧血患者の血清IgGが認識するcDNAクローンの同定

UT-7細胞株のcDNAライブラリーを作成し，serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX) 法により，HLA-DRB1*1501を持ち，かつPNH細胞が検出された（PNH血球陽性），シクロスポリン依存性に造血能の回復を示す再生不良性貧血患者血清中に存在する抗造血前駆細胞抗体をスクリーニングした．その結果，DRS-1, Homo sapiens KIAA0907 protein, α1HB subunit of voltage-dependent T-type calcium channel, U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35-kDa subunit related-protein 2, hemoglobin γ-1 chain, and lens epithelium-derived growth factor など6個クローンが検出された．別の十人の再生不良性貧血患者の血清を使ってこの6個クローンをスクリーニングしたところ，DRS-1だけは二人の患者血清IgGによって認識された．そこでDRS-1に焦点を絞って以後の検討を行うことにした．

再生不良性貧血患者と骨髄異形成症候群（MDS）患者の血清中のDRS-1抗体検出頻度

組換えDRS-1蛋白を用いてELISAを行ったところ，PNH血球陽性の再生不良性貧血患者71例中27例（38.0%）において，健常人21例の解析で設定された正常域を上回る高濃度の抗体が検出された．一方，PNH血球陰性の再生不良性貧血患者32例では正常域を上回る高レベルの抗体がみられたのは2例（6.3%）のみであった．PNH血球陽性のMDS患者でも13例中5例（38.5%）において，高濃度の抗体が検出された．一方，PNH血球陰性のMDS患者42例では高力価の抗体は一例もみられなかった（図1）．

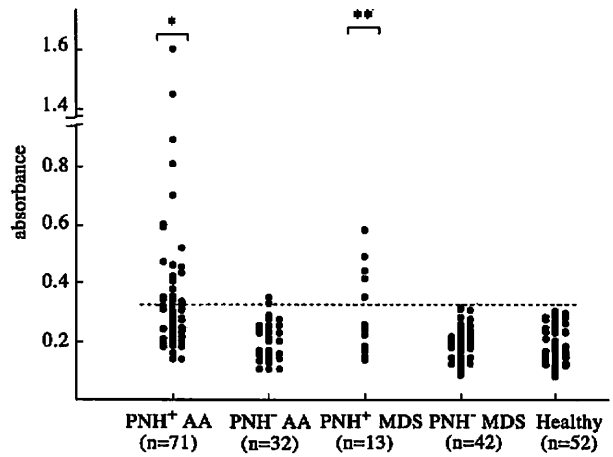

図1．患者血清中のDRS-1抗体価の測定（Blood,Vol.104, 2425-2431, 2004）

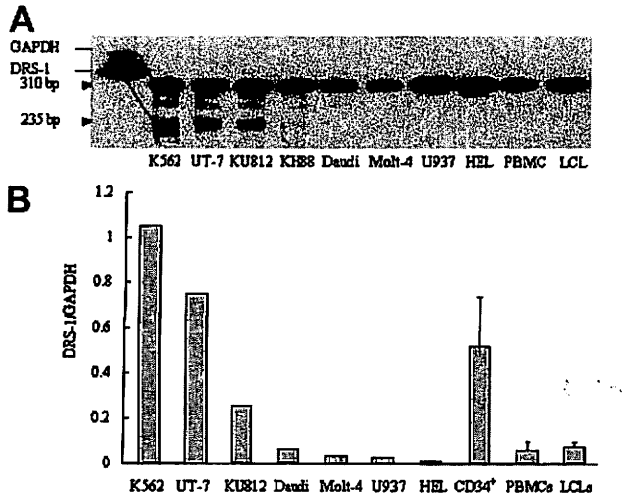

図2. 各種白血病細胞株およびCD34陽性細胞におけるDRS-1遺伝子の発現. A, RNA protection assay; B, Real-time PCRでの結果 (Blood,Vol.104, 2425-2431, 2004)

図3. DRS-1タンパクにおける抗DRS-1抗体エピトープの同定 (Blood,Vol.104, 2425-2431, 2004)

造血前駆細胞におけるDRS-1遺伝子の発現

様々の白血病細胞株におけるDRS-1遺伝子の発現をRNA protection assayとreal-time PCRで検査したところ，骨髄系白血病細胞株 (K562, UT-7, KU812, KH88) と健常者由来のCD34陽性細胞ではDRS-1遺伝子が高発現していたが，リンパ球や単球系の細胞株と健常者由来の末梢血単核細胞では発現していなかった (図2).

DRS-1タンパク質の抗体エピトープ (Epitope mapping)

DRS-1のcDNAをDNase Iでランダムに50-150 bpのフラグメントに切断し，pSCREEN T-Vectorに挿入後，大腸菌に種々のDRS-1ペプチドを発現させた．これらをDRS-1抗体陽性患者の血清でスクリーニングしたところ，患者血清中の抗DRS-1抗体はDRS-1タンパク質の三つのペプチドを認識することが明らかになった (図3A). 一つのペプチド (残基173-198) は13例のDRS-1抗体陽性者のうち7例 (53.8%) が認識したことから，抗DRS-1抗体の共通エピトープと考えられた (図3B).

内因性DRS-1タンパクに対するT細胞反応

一般に，ある抗原蛋白に対して抗体産生が起こっている場合，その抗原に対するT細胞応答も同時に起こっていると考えられる．Tepitopeソフトウェアにより推測したHLA-DR15高親和性CD4陽性T細胞エピトープの一つ (残基191-204) は，抗DRS-1抗体のエピトープ (残基173-198) と一部重なっていた．残基191-204のペプチドを用いて，DRS-1抗体陽性再生不良性貧血患者の末梢血単核球を刺激したところ，DRS-1に特異的なCD4陽性細胞が誘導された．このDRS-1特異的CD4陽性T細胞は，DRS-1とHLA-DRB1*1501を導入したL細胞に対して増殖反応 (図4A) と傷害活性を示した (図4B).

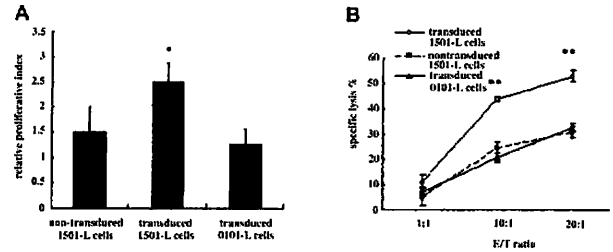

図4. DRS-1特異的T細胞の増殖反応と傷害活性 (Blood, Vol. 104, 2425-2431, 2004)

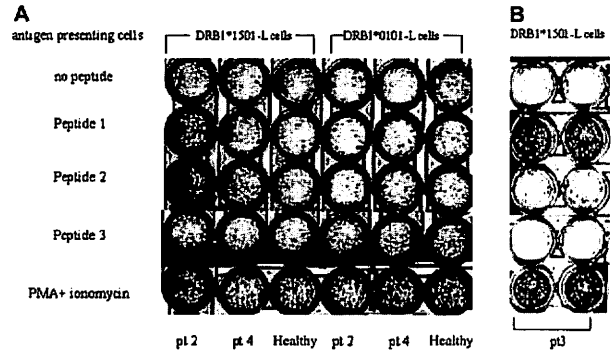

図5. DRS-1特異T細胞前駆細胞の頻度 (Blood,Vol.104, 2425-2431, 2004)

DRS-1抗体陽性患者の末梢血中に存在するDRS-1ペプチド特異的T細胞前駆細胞の頻度

ELISPOT法用いて，二人のDRS-1抗体陽性患者(pt2とpt3)の末梢血リンパ球を，HLA-DR15に親和性の高いCD4陽性T細胞エピトープ候補ペプチド (アミノ残基 191-204と351-364) で刺激したところ，INF-γを産生する細胞はDRS-1抗体陰性患者(pt4)や健常人より明らかに多かった．この効果はHLA-DRB1*1501導入L細胞を抗原提示細胞として用いた場合にのみ観察された (図5).

ま と め

DRS-1抗体はPNH血球陽性の再生不良性貧血患者血清中に高頻度に検出された．DRS-1は，再生不良性貧血の疾患感受性遺伝子HLA-DR15によって提示されるペプチドを内在しており，そのDR15結合ペプチドに特異的なCD4陽性T細胞前駆細胞の頻度は，HLA-DR15陽性で，高力価の抗DRS-1抗体を持つ再生不良性貧血患者において健常者より明らかに増加していた．したがってDRS-1は再生不良性貧血における自己抗原の一つであり，骨髄不全の病態形成に関与している可能性があると考えられる．

Profile

2003年3月　金沢大学医学部保健学科博士前期課程終了
2006年6月　金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学博士課程終了
2006年10月から　米国NIH (国立衛生研究所) にてポスドク
現在のテーマは再生不良性貧血の免疫病態の解明
E-mail：fengx2@nhlbi.nih.gov