

[原著] リンパ球反応性を持つマウスモノクローナル 抗 DNA 抗体の特異性の解析

瀧澤 史 佳*

(平成6年6月24日受付, 平成6年6月27日受理)

要 旨

SLE でみられる抗 DNA 抗体は, DNA, RNA, 磷脂質, プロテオグリカン, 免疫グロブリンや細胞膜などと多彩な交差反応性を持つことが知られているが, その産生機構は未だに明らかとはいえない。本研究者は, 一本鎖 DNA および二本鎖 DNA と交差反応性を有するマウスモノクローナル抗 DNA 抗体 (抗 ss/dsDNA 抗体) が, マウス T 細胞株細胞膜蛋白と特異的に反応することを偶然に見いだした。そこで, モノクローナル抗 DNA 抗体のリンパ球系細胞への結合性をフローサイトメトリーで観察し, また対応抗原の分子量を求めた。

抗 ss/dsDNA 抗体の多くは, マウス T 細胞株, Pre-B 細胞株, B 細胞株, マイトジェン刺激幼若化脾細胞と結合したが, 形質細胞株や非刺激脾細胞に対しては結合活性を示さず, 活性化したリンパ球上に出現する分子へ結合するものと考えられた。抗 ssDNA 抗体は, いずれの細胞に対しても結合活性を示さなかった。この反応は, dsDNA により容量依存性に抑制され, 抗原結合部位を介して特異的に結合しているものと考えられた。また, 細胞もしくは抗体を DNase I で前処置しても結合活性に変化はなかった。Western blotting の結果, 抗 DNA 抗体が結合する EL-4 細胞膜上の対応抗原は 46kD の分子と同定された。

リンパ球表面上の抗原が抗 DNA 抗体産生を誘導したり, 他の原因によって誘導された抗体産生を協調的に刺激するか否かは今後の検討課題であり, 対応抗原のさらに詳細な構造を明らかにすることは, 抗 DNA 抗体の産生機構や病態への関わりについて多くの知見を提供するものと思われる。

Key words: SLE, Anti-DNA antibody, Cross reactivity, Anti-lymphocyte antibody, Monoclonal antibody

略語一覧: SLE: 全身性エリテマトーデス, dsDNA: 二本鎖 DNA, ssDNA: 一本鎖 DNA, NZB/WF1: NZB×NZWF₁, FCS: 牛胎児血清, ConA: Concanavalin A, LPS: Lipopolysaccharide, M-BSA: Methylated bovine serum albumin, PBS: Phosphate buffer saline, EIA: 固相酵素抗体法, Ig: Immunoglobulin, FITC: Fluorescein isothiocyanate, DNase: Deoxyribonuclease, SDS-PAGE: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, Fc: 定常部

I. 緒 言

SLE 患者血清中には様々な自己抗体が出現すること

が知られているが¹⁾, 抗 DNA 抗体はその中でも代表的な自己抗体である²⁾。SLE 患者あるいはモデルマウスの血清中には, 抗原 DNA に対して少なくとも3種類

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Fumiyoshi TAKIZAWA: Identification of Mouse Monoclonal Anti-DNA Antibodies Cross-reactive with Lymphoid Cells.

* 2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine Chiba University, Chiba 260.

Received June 24, 1994, Accepted June 27, 1994.

の特異性の異なる抗 DNA 抗体の存在が知られている³⁾。すなわち、二本鎖 DNA のみに反応する抗体 (抗 dsDNA 抗体)、一本鎖 DNA および二本鎖 DNA に反応する抗体 (抗 ss/dsDNA 抗体)、一本鎖 DNA のみと反応する抗体 (抗 ssDNA 抗体) の 3 種類である。抗 dsDNA 抗体は、抗原である二本鎖 DNA の特有の二重らせん構造に基づく抗原構造に対するものと考えられているが、きわめてまれにしか認められない。抗 ss/dsDNA 抗体は一本鎖および二本鎖 DNA に共通して存在する抗原決定基、すなわち、磷酸-糖骨格に対する抗体であり、抗 ssDNA 抗体は一本鎖 DNA にのみ露出している DNA の塩基部分に対する抗体であるとされている。このうち、抗 ss/dsDNA 抗体は SLE にもっとも特異的であり、その抗体価は疾患の活動性と並行して変動することが知られている。

これまでに DNA を免疫する事により抗 DNA 抗体産生を誘導しようという多くの試みがなされてきたが、それらの結果は DNA の免疫原性はきわめて弱い事を示唆しており⁴⁾、*in vitro* で DNA に結合するにもかかわらず、生体内でも DNA が標的抗原として働いているか否かについては未だに明らかではない⁵⁻⁷⁾。

Kohler および Milstein によって開発された細胞融合法によるモノクローナル抗体作成の技術は、それまでのアフィニティ精製によって得られた抗体では限度があった抗体および抗原の詳細な解析を可能にした⁸⁾。SLE 類似の病態を自然発症する NZB/WF1 マウスや MRL/lpr マウスは抗 DNA 抗体をはじめとする様々な自己抗体を産生する。これらのマウスより得た脾細胞を形質細胞株と細胞融合法によりハイブリドーマを作成することにより、多くのモノクローナル抗 DNA 抗体が報告されてきた。

その結果、抗 DNA 抗体のユニークな特徴として様々な物質に対して多彩な交差反応性を有している事が知られるようになった。これまでに報告されたモノクローナル抗 DNA 抗体が反応する抗原としては、1) 核酸すなわち DNA および RNA⁹⁾、2) カルジオリピン等の磷脂質¹⁰⁾、3) プロテオグリカン¹¹⁾、4) 免疫グロブリン¹²⁾、そして 5) 細胞膜¹³⁾があげられる。このため、DNA 以外の抗原が免疫原となって抗 DNA 抗体産生を引き起こしているのではないかという仮説も提唱されている⁹⁾。

一方、SLE 患者あるいはモデルマウスの血清中には活性化リンパ球に対する抗体が存在し、SLE でみられるリンパ球減少に関与するものと考えられている¹⁴⁾。本研究者は抗リンパ球抗体の特異性の検討の経過中に偶

然、抗 ss/dsDNA 抗体として確立されたマウスモノクローナル抗体がマウス T 細胞株と結合することを見いだした。そこで、種々のマウスリンパ球系細胞を用いて、抗 ss/dsDNA 抗体の持つリンパ球結合活性の特異性につき検討を加えるとともに、その対応抗原を明らかにするために本研究を行った。

II. 実験方法

1) 動物

MRL/lpr マウスは、千葉大学医学部動物舎にて飼育されている我々のコロニーより得た。Balb/c マウスは静岡動物より、C57BL/6 マウスは日本チャールズリバーよりそれぞれ購入した。すべての実験を通して実験動物の取り扱いには千葉大学医学部附属動物実験施設の「動物実験に関する指針」に従った。

2) 細胞株

T 細胞株 EL-4 および C6VLB¹⁵⁾ は埼玉医大総合医療センター長澤龍司博士より、Pre-B 細胞株 4-6-6¹⁶⁾ および B 細胞株 DW34¹⁷⁾ は国立予防衛生研究所竹森利忠博士より、それぞれ供与を受けた。形質細胞株は P3U1 を用いた¹⁸⁾。

3) マイトジェン刺激幼若化リンパ球

Balb/c マウスより得た脾細胞を 10% 牛胎児血清 (FCS) 加 RPMI1640 に浮遊し ($1 \times 10^6/\text{ml}$)、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Concanavalin A (Con A) または $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Lipopolysaccharide (LPS) とともに 5% CO_2 , 37°C で 48 時間培養後使用した。

4) 核酸

dsDNA および ssDNA は牛胸腺 DNA (PL Biochemicals, Milwaukee, WI, USA) より Koike 等の方法⁹⁾により調整した。

5) EL-4 細胞膜蛋白の調製

マウス T 細胞株 EL-4 を大量に培養し、800g で 10 分間遠心後上清を捨て 10ml の細胞に対して 1 mM MgCl_2 , $2.5 \text{ mg}/\text{ml}$ デオキシコール酸ナトリウム, $1 \text{ mM } \rho\text{-amidinophenyl methanesulfonyl fluoride hydrochloride}$ を含む Veronal buffer 30ml に溶解した。溶解液を 4°C 5 時間攪拌後 10,000g で 1 時間遠心し、上清を 4°C の 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) で 48 時間透析後さらに 105,000g で 1 時間遠心した。この上清を分注し、 -70°C で使用時まで保存した。

6) 抗 DNA 抗体測定法

DNA に対する抗体価は、Koike 等の方法⁹⁾に従い固相酵素抗体法 (EIA 法) により測定した。96 穴マイクロタイタープレート (Dynatech Laboratories, Alexan-

dria, Virginia, USA) の各 well に50 μ l の0.1%メチル化 Bovine serum albumin (M-BSA) を室温で1時間置き、M-BSA 溶液を捨て10mM EDTA を含む0.01 M PBS, pH 7.4に希釈した DNA 溶液 (10 μ g/ml) を50 μ l ずつ各 well に加え室温に1時間置いた。抗体のプレートへの非特異的結合を阻止するために、PBS で3回洗浄後200 μ l の10% FCS を含む PBS を各 well に加え2時間室温に置いた。0.05% Tween20 を含む PBS (PBS-Tween) で5回洗浄後、50 μ l の検体を各 well に加え再び室温に1時間置いた。次いで、PBS-Tween で10回洗浄後、50 μ l のアルカリフォスファターゼ (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) 標識ウサギ抗マウス IgG (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA) を各 well に加え1時間室温に置いた後洗浄し、100 μ l の基質液 (p-nitrophenyl phosphate (Sigma Chemical Co.) in 10mM diethanolamine buffer, pH 9.0) で発色させ、Microelisa Auto Reader (MR580) (Dynatech Laboratories) で吸光度 (405nm) を測定した。

7) 抗リンパ球抗体測定法

リンパ球に対する抗体価は、上述の EIA 法に変更を加えて測定した。すなわち、EL-4 細胞膜蛋白溶液 (50 μ g/ml in PBS) をマイクロタイタープレートの各 well に50 μ l ずつ加え室温で1時間置き、洗浄後10% FCS を含む PBS 200 μ l で非特異結合を阻止したのち、上述の抗 DNA 抗体測定法と同様の方法で測定した。

8) マウスハイブリドーマおよびモノクローナル抗体
マウスモノクローナル抗 DNA 抗体、抗リンパ球抗体は Koike 等により報告されたもの^{8,9,19)}を使用した。10% FCS 加 RPMI1640 にてハイブリドーマを培養後、上清を保存し実験に使用した。一部ヌードマウスの腹腔にハイブリドーマを接種して得た腹水を使用した。用いたモノクローナル抗体のクローン名、サブクラス、特異性は表1の通りである。

9) フローサイトメトリー

モノクローナル抗体 (ハイブリドーマ培養上清) 50 μ l を 1×10^6 の標的細胞と 4°C 1時間解凍後3回洗浄し、次いで Fluoresceine isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG 50 μ l (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) と反応 (4°C, 1時間) 後3回洗浄し250 μ l に調製し、FACSIV® (Beckton Dickinson) によりフローサイトメトリー解析を行った。すべての抗体は Airfuge® (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) により100,000g で30分間遠心後、上清を使用した。

表 1. マウスモノクローナル抗体のサブクラスおよび特異性

Clone	subclass	Specificity to	
		ssDNA	dsDNA
BWH13H1	IgG2a	+	+
1B10F4	IgG2a	+	+
2H7(1)E5	IgG2a	+	+
2H7(2)B10	IgG2a	+	+
3A9(1)D8	IgG2a	+	+
8D10(2)A9	IgG1	+	+
3A3A2	IgG2b	+	+
1D3D2	IgG2a	+	+
3C11G8	IgG2a	+	+
1H1D1D11(1)D7	IgG2a	+	+
2B1(1)D9	IgG2a	+	—
MH12G5	IgG2a	+	—
3A3A6	IgG2a	+	—
3A3(Anti-lymphocyte)	IgG2a	—	—

10) EL-4 細胞株の DNase I 処理

2 ml の EL-4 細胞 (5×10^6 /ml) を Bovine pancreas deoxyribonuclease I (DNase I) (Sigma Chemical Co.) 250 μ g/ml (最終濃度) とともに10mM MgCl₂ を含む PBS (pH 7.2) で37°C, 60分反応させた。0.1M EDTA を含む0.5ml PBS を加えて反応を終了させた。DNase I の活性は、並行してマイクロタイタープレートに固相化した DNA に対して反応させ、抗 DNA 抗体の結合が消失する事で確認した。

11) モノクローナル抗 DNA 抗体および EL-4 細胞膜蛋白の DNase I 処理

モノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体の腹水を最終濃度 200 μ g/ml の DNase I, 10mM MgCl₂ を含む PBS (pH 7.2) で37°C, 60分反応させた。0.1M EDTA を含む PBS 1/10 溶を加え氷冷にて反応を終了させた。EL-4 細胞膜蛋白についても同様に処理した。

12) EL-4 細胞のマウス皮下への接種

1×10^7 の EL-4 細胞を生後6週の C57BL/6 マウスの皮下組織へ接種した。1週後に頸椎脱臼にて屠殺後、腫瘍組織を摘出、細切しメッシュに通したのち細胞浮遊液を Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemical, Piscataway, NJ, USA) に重層遠心し死細胞を除去後、実験に使用した。

13) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Western blotting

EL-4 細胞膜蛋白は Laemmli の方法²⁰⁾に従い、10%

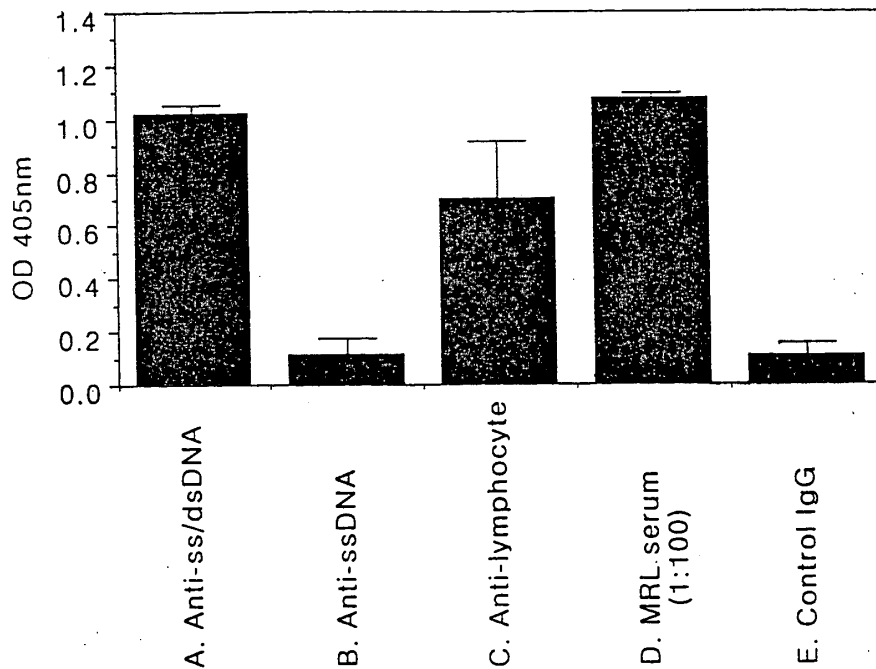


図 1. マウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のマウスT細胞株 EL-4 細胞膜蛋白への結合
マイクロタイタープレートに EL-4 細胞膜蛋白を固相化し、マウスモノクローナル抗体培養上清 (A-C), MRL マウス血清 (1:10) (D), 対照マウス IgG (E) と反応後、アルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗マウス IgG, 基質を順次反応させ発色後、吸光度を405nm で測定した。値は Mean±SD で表現した。

polyacrylamide slab gel に電気泳動した。Protein band はこの gel から Towbin 等の方法²¹⁾に従い、Electro blotting により nitrocellulose 膜へ転写した。Nitrocellulose 膜は幅 5 mm の短冊状に切り、5 %脱脂粉乳を含む PBS に 4°C で一晚反応させ、非特異的結合を阻止した。10% FCS を含むモノクローナル抗体上清または対照マウス IgG (50μg/ml) にそれぞれの短冊を浸し、4°C 3時間反応後、0.05% Tween20 を含む PBS で5回洗浄した。次いで、これらの短冊を 10% FCS 加 PBS に 1:500 で溶解したビオチン標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (Binding Site, Birmingham, UK) で反応後、洗浄した。さらに、Vectastain Avidin Biotin Complex (フナコシ, 東京) に室温で60分反応後、洗浄した。最後に0.5mg/ml 4-chloro-1-naphthol, 0.01% H₂O₂ および17% methanol を含む PBS に浸して発色させた。30分後に流水で洗浄し反応を終了させ、キムタオル® に挟み乾燥させた。

III. 結 果

1) マウスモノクローナル抗 DNA 抗体の抗リンパ球抗体活性-EIA 法

EIA 法で得られたモノクローナル抗体の EL-4 細胞

膜蛋白への結合性を図1に示した。抗 ss/dsDNA 抗体は、抗リンパ球抗体として確立された抗体や MRL マウス血清と同様に EL-4 細胞膜蛋白へ結合する事が示された。抗 ssDNA 抗体はコントロールの IgG と同様の低い吸光度値を示した。

2) マウスモノクローナル抗 DNA 抗体のTおよびB細胞株に対する結合性—フローサイトメトリー

EIA 法の結果より抗 ss/dsDNA 抗体はリンパ球結合性を持つことが示唆されたので、生細胞への結合をフローサイトメトリーにより検討した。

a) マウス抗 ss/dsDNA 抗体の多くがマウスT細胞株 (EL-4, C6VLB) に結合したが、非刺激下の胸腺細胞や脾細胞へは結合を示さなかった。抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) を用いて得られた代表的な結果を図2に示す。

b) これらの抗 ss/dsDNA 抗体は Pre-B 細胞株 (4-9-6) およびB細胞株 (DW34) に対しても結合したが、形質細胞株 (P3U1) には結合しなかった。図3は抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) を用いて得られた代表的な結果を示す。

c) これに対してモノクローナル抗 ssDNA 抗体は、これらの細胞株のいずれにも結合しなかった。図4は抗 ssDNA 抗体 (2B1 (1) D9) を用いて得られた代表的

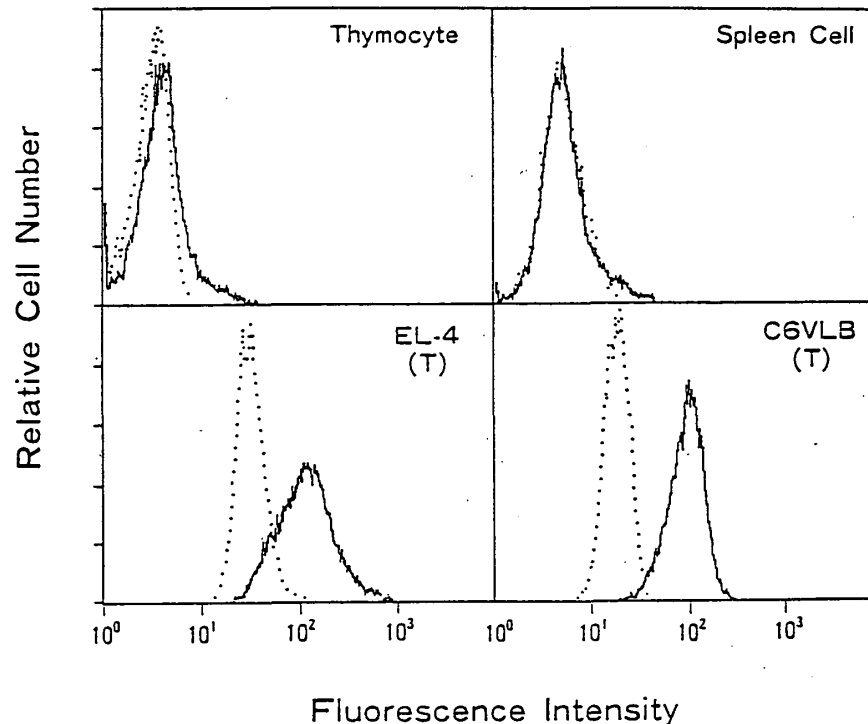


図 2. マウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のマウス胸腺細胞, 脾細胞, T細胞株への結合性
抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) を Balb/c マウス胸腺細胞 (左上), 脾細胞 (右上), T細胞株 EL-4 (左下), C6VLB (右下) と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で発色させた。破線は二次抗体のみで染色したコントロールを示す。

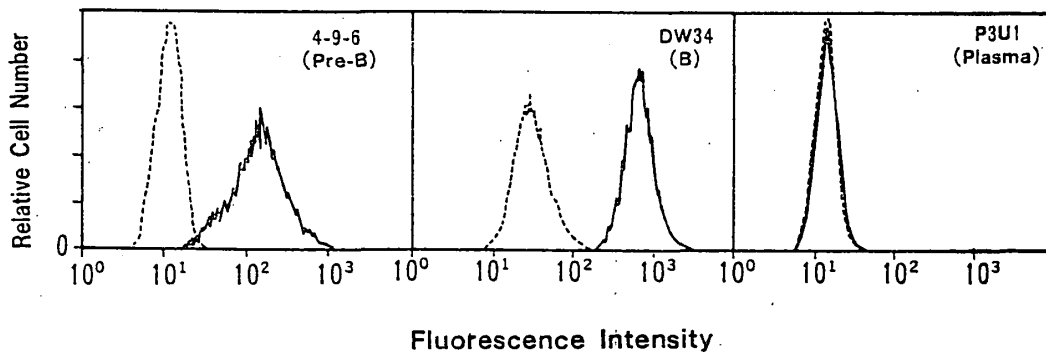


図 3. マウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のマウスB細胞株への結合性
抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) を Pre-B 細胞株 4-9-6 (左), B細胞株 DW34 (中), 形質細胞株 P3U1 (右) と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウスで発色させた。破線は二次抗体のみで染色したコントロールを示す。

な結果を示す。

13株のモノクローナル抗 DNA 抗体のTおよびB細胞株への結合性の結果を表2にまとめた。

3) モノクローナル抗 DNA 抗体のリンパ系細胞への結合に対する dsDNA の阻害効果

モノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のリンパ系細胞への結合の特異性を調べるために dsDNA の阻害効果を

検討した。dsDNA を混和したモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体 (BWH13H1) とT細胞株 (EL-4) を用いた代表的な結果を図5に示す。dsDNA によりこの結合は容量依存性に抑制された。

4) モノクローナル抗 DNA 抗体のマイトジェン刺激幼若化リンパ球に対する結合性

10株のモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のうちT細胞

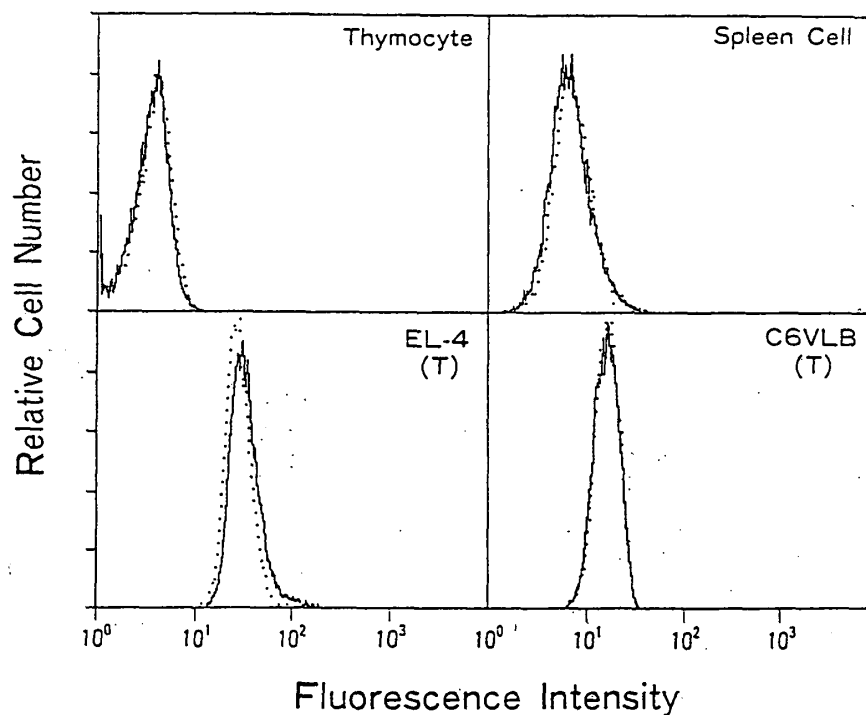


図 4. マウスモノクローナル抗 ssDNA 抗体のマウス胸腺細胞, 脾細胞, T 細胞株への結合性
抗 ssDNA 抗体 (2B1(1)D9) を Balb/c マウス胸腺細胞 (左上), 脾細胞 (右上), T 細胞株 EL-4 (左下), C6VLB (右下) と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で発色させた。破線は二次抗体のみで染色したコントロールを示す。

表 2. マウスモノクローナル抗 DNA 抗体の T および B 細胞株への結合性—フローサイトメリー

Clone	Specificity	T cell		B Cell		
		EL-4	C6VLB	Pre-B	B	Plasma
				4-9-6	DW34	P3U1
BWH13H1	SS/dsDNA	+	+	+	+	-
1B10F4		-	-	-	-	-
2H7(1)E5		+	+	+	+	-
2H7(2)B10		+	±	+	+	-
3A9(1)D8		+	±	+	+	-
8D10(2)A9		+	+	+	+	-
3A3A2		+	+	+	+	-
1D3D2		+	-	+	+	-
3C11G8		-	-	-	-	-
1H1D1D11(1)D7		-	-	-	-	-
2B1(1)D9	ssDNA	-	-	-	-	-
MH12G5		-	-	-	-	-
3A3A6		-	-	-	-	-

胞株および B 細胞系細胞株へ結合した 7 株が Con A または LPS で刺激した脾細胞のいずれにも結合した (図 6)。これに対して, 3 株のモノクローナル抗 ssDNA

抗体は, いずれもこれらの幼若化リンパ球に結合性を示さなかった (図省略)。

5) モノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のマウス T 細

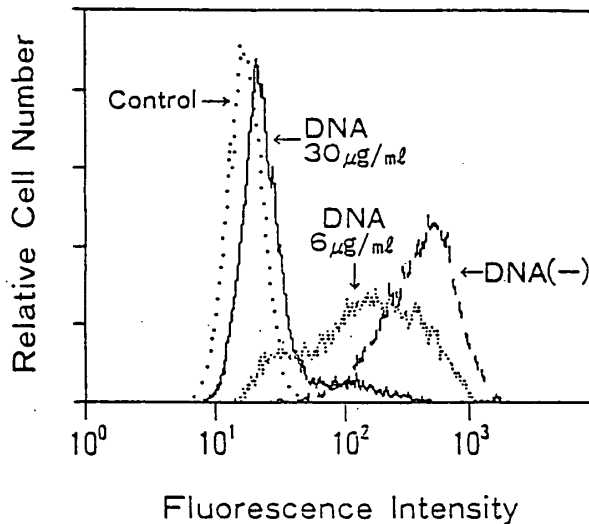


図 5. マウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のマウス T 細胞株への結合性-dsDNA による競合阻害
最終濃度 0, 6, 30 $\mu\text{g/ml}$ の dsDNA を混和させた抗 ss/dsDNA 抗体 (BWH13H1) を T 細胞株 EL-4 と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で発色させた。コントロールは二次抗体のみで染色した。

細胞株への結合性—細胞または抗体を DNase I 処理した時の効果

a) これら T 細胞株および B 細胞系細胞株に対するモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体の反応性が, 細胞表面上に存在する DNA もしくは DNA 受容体に結合した DNA に対する反応である可能性がある。そこで, 細胞表面を DNase I で処理した前後での T 細胞株に対するこのモノクローナル抗 DNA 抗体の反応性を検討した。細胞を DNase I 処理してもモノクローナル抗 ss/

dsDNA 抗体の T 細胞株に対する反応性には変化は認められなかった (図 7 A, B)。

b) また, 2) では DNA と抗 DNA 抗体を混合し免疫複合体を作成すると細胞への結合は抑制されたが, DNA-抗 DNA 抗体複合物が細胞へ結合している可能性をさらに否定するためにモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体を DNase I で処理し, T 細胞株に対する結合性の変化を検討した。図 7 C, D に示したようにこの抗体を DNase I で処理しても T 細胞株に対する反応性には変化は認められなかった。

6) マウス皮下接種 T 細胞腫瘍へのモノクローナル抗 DNA 抗体の結合性

上述した抗 ss/dsDNA 抗体が結合する標的細胞はすべて培養細胞である。この現象が *in vitro* の条件でのみ起こっている可能性があるため, *in vivo* で发育した T 細胞腫瘍へのこの抗体の結合性を調べた。図 8 に示すように, C57BL/6 マウスの皮下へ接種された T 細胞腫瘍 EL-4 に対しても抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) の結合が認められ, この結合は培養条件下にのみ見られるものではないことが明らかとなった。

7) モノクローナル抗 DNA 抗体が認識する EL-4 細胞上の膜抗原の Western blotting による解析

モノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体の結合する EL-4 細胞表面上の対応抗原を決定するために, DNase I 処理および非処理の EL-4 細胞膜蛋白を SDS-PAGE で泳動後ニトロセルロース膜へ転写し, 2 種類のモノクローナル抗 DNA 抗体と反応させた。抗 DNA 抗体を用いた Lane では, DNase I 処理の有無にかかわらずいずれも 46kD の Band が認められた (図 9)。

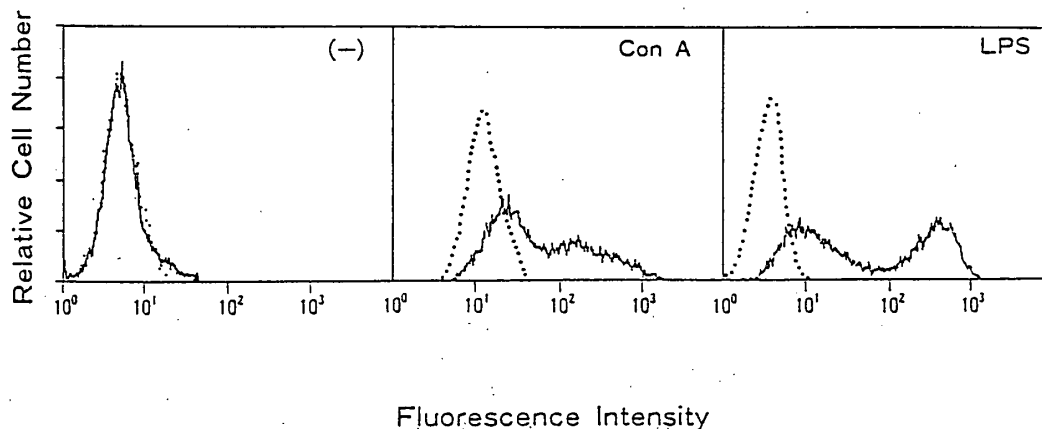


図 6. マウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のマウス mitogen 刺激幼若化リンパ球への結合性
抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) を, 5 $\mu\text{g/ml}$ の ConA または 50 $\mu\text{g/ml}$ の LPS とともに 48 時間培養した Balb/c マウスの脾細胞と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で発色させた。破線は二次抗体のみで染色したコントロールを示す。

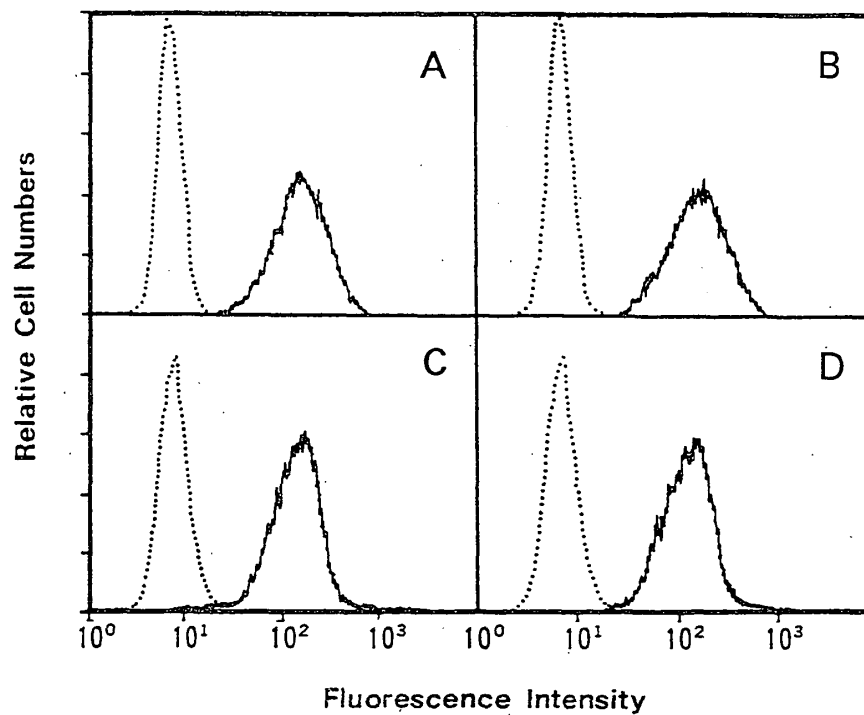


図 7. マウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体のマウスT細胞株への結合性-細胞または抗体を DNase I 処理した時の効果

- a) 抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) を, 無処理の EL-4 (A), または DNase I (最終濃度250 μ g/ml, pH7.0) で処理した EL-4 (B) と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で発色させた。破線は二次抗体のみで染色したコントロールを示す。
- b) 無処理 (C) または DNase I (最終濃度200 μ g/ml, pH7.2) で処理 (D) した抗 ss/dsDNA 抗体 (3A9 (1) D8) を EL-4 と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で発色させた。破線は二次抗体のみで染色したコントロールを示す。

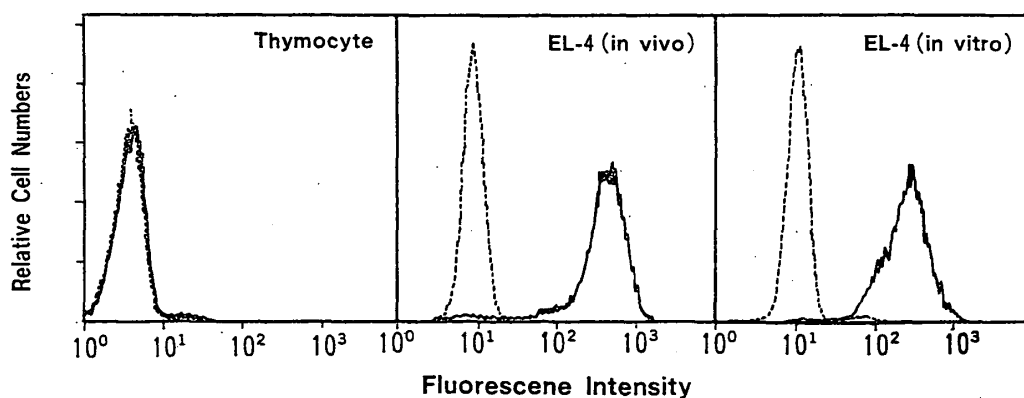


図 8. マウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体の *in vivo* および *in vitro* で発育したマウスT細胞腫への結合性

抗 ss/dsDNA 抗体 (3A3A2) を, 1×10^7 の EL-4 細胞を皮下接種1週後の C57BL/6 マウスより得た胸腺細胞 (左), 皮下腫瘍細胞 (中), 培養 EL-4 (右) と反応後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で発色させた。破線は二次抗体のみで染色したコントロールを示す。

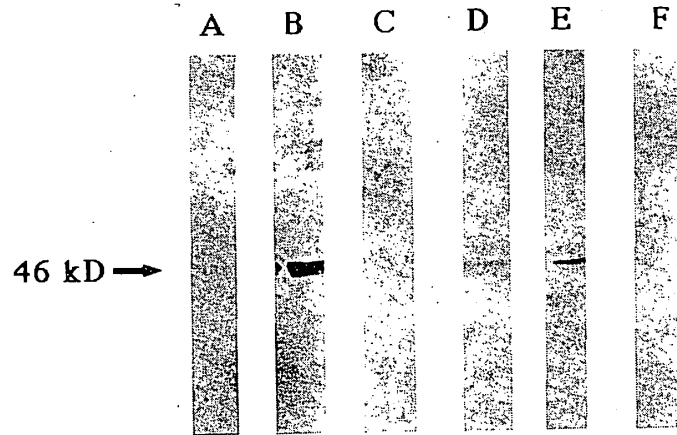


図 9. Western blotting による EL-4 細胞膜上のマウスモノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体の対応抗原

EL-4 細胞膜蛋白 [DNase I 処理 (+) (A-C), (-) (D-F)] を 10% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動後 Nitrocellulose 膜へ転写し、抗 ss/dsDNA 抗体 BWH 13 H 1 (A, D), 3 A 3 A 2 (B, E), 対照マウス IgG (50 μ g/ml) (C, F) に反応後、ビオチン標識ヤギ抗マウス IgG (H+L), Vectastain Avidin Biotin Complex, 基質に順次反応させて発色させた。

IV. 考 察

モノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体は DNA 以外の様々な物質と交差反応性に結合することがこれまでに報告されており^{9-11, 22, 23)}, DNA の免疫原性の低さと合わせて抗 ss/dsDNA 抗体の産生機序解明への道筋を複雑にしている。

Tron の報告以来¹³⁾, モノクローナル抗 ss/dsDNA 抗体が白血球と結合するという事実はいくつかの研究室から報告されているが、この抗体が結合する細胞の種類は報告者によってまちまちである²⁴⁻²⁷⁾。そこで、本研究ではリンパ球系細胞の分化度に着目し、T, B 細胞株、マイトジェン刺激幼若化リンパ球を用いてモノクローナル抗 DNA 抗体の結合性を検討した。その結果、抗 ss DNA 抗体にはリンパ球結合性はないこと、抗 ss/ds 抗 DNA 抗体は活性化したリンパ球上に出現する分子に結合することが示された。

抗体が細胞と結合する際にその反応が特異的であるか否かということは、しばしば問題となる。特に、抗体の定常部 (Fc 部分) は細胞表面上の Fc 受容体へ結合することができ²⁸⁾, 解釈を誤らせる。この点については、1) T細胞のうち、少なくとも EL-4 は Fc 受容体を持たないこと¹⁵⁾, 2) 競合阻害実験以外の実験では遠心後に抗体を使用しており、Bリンパ球に存在する低親和性 Fc 受容体への結合は起こらないこと、3) Fc 受容体が存在するならば、抗原と抗体を混和することにより形成

された免疫複合体がより強く結合するはずであるが、そのような事実はないこと、などから否定できる。したがって、抗原 DNA が抗 ss/dsDNA 抗体の EL-4 への結合を容量依存的に抑制することから、この抗体は抗原結合部位を介して特異的に細胞に結合しているものと考えられる。

抗 ss/ds DNA 抗体が結合する細胞表面上の対応抗原の性状についても、細胞の種類が異なるためか報告者によってまちまちである。これまでに、細胞表面 DNA^{26, 27)}, 蛋白¹³⁾, DNA-histone 複合体²⁵⁾などが対応抗原として報告されている。この抗体は幅広い交差反応性を持つことから、細胞表面上の対応抗原は一つではないのかも知れない。

本研究では EL-4 細胞膜上の対応抗原は DNase I に抵抗性の 46kD の蛋白であると考えられた。DNA 結合蛋白と結合した DNA が結合している可能性は否定できないが、少なくとも非特異的に細胞に付着した DNA とは考えられない。

抗 ss/dsDNA 抗体の活性化リンパ球への結合が、SLE 患者やモデルマウスの病勢にどのように関与しているのかは興味深い問題である。ヒト末梢血単核球を用いた実験では抗 ss/dsDNA 抗体がリンパ球傷害活性を持つという報告があり²⁷⁾, この抗体が SLE 患者のリンパ球減少症の一因となっている可能性がある。

では、この EL-4 細胞膜上の対応抗原は、抗 ss/ds DNA 抗体産生の引き金となっているのであろうか。こ

れまでに、紫外線、薬物、食物、病原体感染などの環境因子、血液幹細胞の遺伝的異常に基づく自己寛容の破綻とそれに続くB細胞の活性化、抗原刺激によるクローン増殖などがSLEの発症や抗DNA抗体産生の機構として提唱されてきたが、いまだに不明な点が多い²⁹⁾。最近、分子生物学的手法を用いて、抗DNA抗体分子の抗原結合部位の構造から病因へ迫ろうというアプローチが可能になり、多数の報告が出ている³⁰⁻³³⁾。その結果、IgG-抗ss/dsDNA抗体分子超可変部領域の相補性決定部に多数の体細胞突然変異が認められ³⁰⁻³³⁾、ヘルパーT細胞を介した抗原刺激が起こっていることが想定されている³⁴⁾。また、結晶化された抗体分子をX線解析することにより抗原結合部位と対応抗原との立体的な関係も明らかになりつつある³⁵⁾。その免疫原としての抗原が何であるかについてはまだ明らかではないが、リンパ球表面上の抗ss/dsDNA抗体結合抗原が抗DNA抗体産生を誘導したり、あるいは他の原因によって誘導された抗DNA抗体産生を協調的に刺激すると考えること²⁵⁾は魅力のある説であり、今後の検証課題である。本研究で同定された46kDのEL-4細胞膜蛋白を含めて抗ss/dsDNA抗体と結合する細胞膜抗原の構造を詳細に解析することにより、この抗体の産生機構や病態への関わりについて多くの知見を提供するものと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました恩師、千葉大学第二内科学教室吉田 尚教授に深甚の謝意を表します。また、直接ご指導を賜った北海道大学第二内科学教室小池隆夫教授、東邦大学佐倉病院内科富岡玖夫教授、同鏡味勝助手、千葉大学医学部第二内科岩本逸夫講師、貴重な細胞を供与された埼玉医大総合医療センター第四内科長澤龍司講師および国立予防衛生研究所細胞免疫部竹森利忠部長に深く感謝いたします。

本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

Antibodies cross-reactive with ssDNA and dsDNA (anti-ss/dsDNA Abs) have broad specificities, which include DNA, RNA, phospholipids, proteoglycan, cell membranes and immunoglobulins. However, mechanism of anti-ss/dsDNA Ab production is still not clear.

Thirteen mouse monoclonal anti-DNA Abs were tested by flowcytometric analyses to observe their binding activity to murine lymphocytes. Monoclonal anti-ss/dsDNA Abs bound to T cell lines (EL-4, C6VLB), a pre-B cell line (4-9-6),

a B-cell line (DW34) and mitogen activated spleen cells, but not to a plasma cell line (P3U1) and resting spleen cells. In contrast, anti-ssDNA Abs did not bind to either of these cells. The binding of these anti-ss/dsDNA Abs to lymphoid cells was inhibited by dsDNA in a dose dependent manner, which indicates this binding occurs via antigen binding sites. DNase treatment of lymphoid cells or anti-ss/dsDNA Abs did not affect the binding characteristics. Western blotting analyses revealed Molecular weight of the corresponding antigen on EL-4 cell membrane recognized by monoclonal anti-ss/dsDNA Abs as approximately 46 kD. These results suggest that the reactive molecule on the cell surface could be a protein or a DNA-DNA binding protein complex which may promote or drive anti-DNA Ab production in murine and human SLE.

文 献

- 1) McCurdy DK, Bick M, Gatti RA and Naeim F: Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Dis Marker* 10: 37-49, 1992.
- 2) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N and Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277, 1982.
- 3) Arana R and Seligmann M.: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 46: 1867-1882, 1967.
- 4) Madaio MP, Hodder S, Schwartz RS and Stollar BD: Responsiveness of autoimmune and normal mice to nucleic acid antigens. *J Immunol* 132: 872-876, 1984.
- 5) Stollar BD: On the nature, origin and clinical significance of anti-DNA autoantibodies. *Scand J Rheumatol Suppl* 56: 22-31, 1985.
- 6) Schwartz RS and Stollar BD: Origins of anti-DNA autoantibodies. *J Clin Invest* 75: 321-327, 1985.
- 7) Dziarski R: Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction? *Immunol Today* 9: 340-342, 1988.
- 8) Kohler G and Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.
- 9) Koike T, Nagasawa R, Nagata N and Shirai T: Specificity of mouse hybridoma antibodies to DNA. *Immunol Lett* 4: 93-97, 1982.

- 10) Koike T, Maruyama N, Funaki H, Tomioka H and Yoshida S: Specificity of mouse hybridoma antibodies to DNA. II. Phospholipid reactivity and biological false positive serological test for syphilis. *Clin Exp Immunol* 57: 345-350, 1984.
- 11) Faaber P, Capel PJA, Rijke GPM, Vierwinden G, Van de Putte LBA and Koene RAP: Cross-reactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans. *Clin Exp Immunol* 55: 502-508, 1984.
- 12) Hannestad K and Stollar BD: Certain rheumatoid factors react with nucleosomes. *Nature* 275: 671-672, 1978.
- 13) Tron F, Jacob L and Bach JF: Binding of a murine monoclonal anti-DNA antibody to Raji cells. Implications for the interpretation of the Raji cell assay for immune complexes. *Eur J Immunol* 14: 283-286, 1984.
- 14) Kagami M, Koike T, Takabayashi K, Tomioka H and Yoshida S: Antibody to activated lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14: 907-912, 1987.
- 15) Nagasawa R, Gross J, Kanagawa O, Townsend K, Lanier LL, Chiller J and Allison JP: Identification of a novel T cell surface disulfide-bonded dimer distinct from the alpha/beta antigen receptor. *J Immunol* 138: 815-824, 1987.
- 16) Takemori T, Miyazoe I, Shirasawa T, Taniguchi M and Graf T: A temperature-sensitive mutant of Abelson murine leukemia virus confers inducibility of IgM expression to transformed lymphoid cells. *EMBO J* 6: 951-956, 1987.
- 17) Sakata T, Iwagami S, Tsuruta Y, Teraoka H, Tatsumi Y, Kita Y, Nishikawa S, Takai Y and Fujiwara H: Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol* 48: 205-212, 1990.
- 18) Kearney JF: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* 123: 1548-1550, 1979.
- 19) Koike T, Maruyama N, Tomioka H and Yoshida S: Specificity of mouse hybridoma antibodies to DNA. III. Antigenic determinants of nucleic acids recognized by poly(dG) specific monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 60: 323-328, 1985.
- 20) Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 21) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979.
- 22) Andrzejewski CJ, Stollar BD, Lalor TM and Schwartz RS: Hybridoma autoantibodies to DNA. *J Immunol* 124: 1499-1502, 1980.
- 23) Rubin RL, Balderas RS, Tan EM, Dixon FJ and Theofilopoulos AN: Multiple autoantigen binding capabilities of mouse monoclonal antibodies selected for rheumatoid factor activity. *J Exp Med* 159: 1429-1440, 1984.
- 24) Shoenfeld Y, Smorodinsky NI, Lavie G, Hazaz B, Joshua H and Pinkhas J: Human lupus monoclonal autoantibodies bind to Raji cells. *Immunol Lett* 11: 121-126, 1985.
- 25) Holers VM and Kotzin BL: Human peripheral blood monocytes display surface antigens recognized by monoclonal antinuclear antibodies. *J Clin Invest* 76: 991-998, 1985.
- 26) Bennett RM, Davis J and Merritt M: Anti-DNA antibodies react with DNA expressed on the surface of monocytes and B lymphocytes. *J Rheumatol* 13: 679-685, 1986.
- 27) Okudaira K, Yoshizawa H and Williams R: Monoclonal murine anti-DNA antibody interacts with living mononuclear cells. *Arthritis Rheum* 30: 669-678, 1987.
- 28) Ravetch JV and Kinet J-P: Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9: 457-492, 1991.
- 29) Steinberg AD, Gourley MF, Klinman DM, Tsokos GC, Scott DE and Krieg AM: NIH conference. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 115: 548-559, 1991.
- 30) Hoch S and Schwaber J: Identification and sequence of the VH gene elements encoding a human anti-DNA antibody. *J Immunol* 139: 1689-1693, 1987.
- 31) Shlomchik MJ, Aucoin AH, Pisetsky DS and Weigert MG: Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9150-9154, 1987.
- 32) Eilat D: The role of germline gene expression and somatic mutation in the generation of autoantibodies to DNA. *Mol Immunol* 27: 203-210, 1990.
- 33) Hirose S, Wakiya M, Kawano NY, Yi J, Sanokawa R, Taki S, Shimamura T, Kishimoto T, Tsurui H, Nishimura H and Shi-

- rai T: Somatic diversification and affinity maturation of IgM and IgG anti-DNA antibodies in murine lupus. Eur J Immunol 23: 2813-2820, 1993.
- 34) Manser T, Wysocki LS, Gridley T, Near RI and Geffer ML: Molecule evolution of

the immune response. Immunol 6: 94-101, 1985.

- 35) Krishnan MR and Marion TN: Structural similarity of antibody variable regions from immune and autoimmune anti-DNA antibodies. J Immunol 150: 4948-4957, 1993.



■ 効能・効果

- 高血圧症
- 腎実質性高血圧症

禁忌(次の患者には投与しないこと)

- 1) 本剤に対し、過敏症の既往歴のある患者
- 2) 他のアンジオテンシン変換酵素阻害剤による血管浮腫の既往歴のある患者
- 3) デキストラン硫酸セルロースを用いたLDLアフェレーシス施行中の患者
- 4) アクリロニトリルメタリルスルホン酸ナトリウム膜(AN69®)を用いた血液透析施行中の患者
- 5) 妊婦又は妊娠している可能性のある婦人
(「妊婦・授乳婦への投与」の項より要約)

※用法・用量、使用上の注意の詳細等は、製品添付文書をご覧ください。



〈資料請求先〉

田辺製薬株式会社
大阪市中央区道修町3丁目2番10号

アンジオテンシン変換選択性阻害剤 薬価基準収載 **2.5 5 10**

タナトリル錠
Tanatriil® (一般名: 塩酸イミダプリル)