



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Disease specificity of anti-tryptophan hydroxylase-1 and anti-AIE-75 autoantibodies in APECED and IPEX syndrome [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	千田, 奈津子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11702号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58884
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Natsuko_Chida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 千田 奈津子

学 位 論 文 題 名

Disease specificity of anti-tryptophan hydroxylase-1 and anti-AIE-75 autoantibodies
in APECED and IPEX syndrome

(APECED と IPEX における抗 TPH-1 抗体と抗 AIE-75 抗体の疾患特異性)

[諸言]

T および B 細胞の多様性獲得により自己反応性細胞も産生されるが、多くは免疫寛容により排除、抑制される。自己免疫調節因子 AIRE は胸腺髄質上皮細胞での組織特異性抗原の発現誘導を介し自己反応性 T 細胞の負の選択に関与する（中枢性免疫寛容）。これを回避し末梢に流出した自己反応性 T 細胞はアナジーないし制御性 T 細胞（Treg）により不活化される。Forkhead box 転写因子 *FOXP3* は Treg の分化・成熟のマスター遺伝子で末梢性免疫寛容に寄与する。これらの免疫寛容メカニズムの破綻は多彩な臓器特異的自己免疫疾患をもたらす。AIRE 遺伝子の変異は APECED（自己免疫性多腺内分泌障害・カンジダ症・外胚葉異形成症）、*FOXP3* 遺伝子の変異は IPEX（X-連鎖免疫調節異常・多腺内分泌障害腸症候群）を来す。

IPEX の主要合併症である自己免疫性腸症では AIE-75（自己免疫腸症関連 75kDa 抗原）や villin に対する抗体が高い感度と特異性を有する。一方、TPH（トリプトファン水酸化酵素）-1 に対する抗体は腸障害を示す APECED 患者の 89%、示さない患者の 34% が持つ。しかし APECED における抗 AIE-75 および抗 villin 抗体、IPEX における抗 TPH-1 抗体の報告はない。本研究では APECED と IPEX における TPH-1、AIE-75、villin に対する自己抗体を検討した。

[方法]

血清：血清は遺伝学的に診断された IPEX 症候群 7 名（日本人 6 名、アメリカ人 1 名）および APECED 23 名（イタリア人 20 名、日本人 2 名、アメリカ人 1 名）より得た。APECED のイタリア人患者の 10 名は免疫沈降法（IP）にて抗 TPH-1 抗体陽性（IP-positive）、10 名は陰性（IP-negative）で、他の 3 名は未測定（IP-NT）だった。

抗原の作成：TPH-1（NM_004179）のコード領域全長 cDNA を、λgt11 ヒト十二指腸

cDNA ライブラリ (BD) をテンプレートとして PCR で増幅、TA cloning を行った。配列の確認後インサートを GST 融合蛋白発現ベクター pGEX4T-2 に in-frame でサブクローニングした。このプラスミドで形質転換した大腸菌 BL-21 に IPTG 存在下で融合蛋白 GST-TPH を発現させ glutathione-sepharose ビーズで精製した。リコンビナント AIE-75 と GST-Villin は既報の方法で作製した。

免疫ブロット (IB) 法：リコンビナント抗原を SDS-PAGE で泳動後 PVDF 膜に電氣的に転写し、1000 倍希釈マウスモノクローナル抗 TPH-1 抗体、1000 倍希釈ヤギ抗 GST 抗体、80-5120 倍希釈ヒト血清と 4℃ で 16 時間反応させた。ヒト血清は過剰量の GST 発現大腸菌抽出物を含む TBST (Tris-buffered saline containing 0.1% tween-20) で希釈し、非特異的反応をブロックした。5000 倍希釈 HRP-ヤギ抗ヒト IgG 抗体、2000 倍希釈 HRP-ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、2000 倍希釈 HRP-ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を 2 次抗体とし室温で 1 時間反応させた。50 mM Tris-HCl pH 7.4 で 3 回洗浄後、Ni イオン存在下で 3,3'-diaminobenzidine で検出した。

統計解析は、スピアマンの順位相関係数を用いた。

[結果]

融合タンパクは抗 GST および抗 TPH-1 抗体と反応した。

IP-NT1 名は GST-TPH と反応し、GST 単独とは反応しなかった。IP-positive の APECED 中 8 名は GST-TPH と反応し、IP-negative 10 名と IP-NT 2 名は反応しなかった。既知の IP 法での抗 TPH-1 抗体の結合 index と IB 法のタイターの間に相関関係はなかった。IPEX 7 名は GST-TPH と反応しなかった。

抗 AIE-75 抗体は IPEX 5 名で検出され、APECED ではされなかった。抗 villin 抗体は IPEX 4 名、APECED 3 名で検出された。

[考察]

IPEX の血清が AIE-75 と反応し TPH-1 と反応せず、APECED の血清が TPH-1 と反応し AIE-75 と反応しなかったことから、抗 TPH-1 および抗 AIE-75 抗体が各々 APECED と IPEX に特異的で診断的価値があることが確認された。一方抗 villin 抗体は APECED 3 名で検出され、その特異性は低かった。

抗 TPH-1 抗体は IP-positive の APECED 2 名で検出されず、IB 法でのタイターと IP 法での結合 index に相関はなかった。よって、立体構造を認識する抗体とペプチド配列に対する抗体が存在し、その比率が患者間で異なると考えられた。

APECED と IPEX では好発臓器に違いがあるが、本研究は同臓器 (十二指腸) でも対応自己抗原が異なることを明らかにした。AIE-75 は十二指腸上皮の刷子縁に広範に発現し、TPH-1 はエンテロクロマフィン細胞に局限し発現している。IPEX における腸炎は十二指腸・小腸の広範な絨毛萎縮と細胞浸潤を伴うが、抗 TPH-1 抗体陽性の APECED の腸管ではエンテロクロマフィン細胞の脱落と軽度の炎症細胞浸潤が見られる。こうした病変部位と自己抗原の分布の一致は、両疾患の消化管病変における抗原特異的組織傷害を示唆する。

検討した抗原はいずれも細胞質蛋白で、自己抗体が直接結合し発症に関与するとは考えにくい。実際 AIE-75 や villin を発現する腎尿細管は IPEX で必ずしも障害されず、更に抗

TPH-1 抗体は腸症状のない APECED の 1/3 で陽性である。また自己抗体との反応性により同定された自己抗原の多くは *in vitro* で T 細胞を刺激する。よって両疾患において抗原特異的 T 細胞が組織破壊に重要と考えられる。その際自己抗体や自己反応性 B 細胞は組織障害で漏出した抗原に結合し、FcγR 陽性抗原提示細胞や B 細胞自身による抗原提示を介して自己免疫反応を増幅していると考えられる。T-B 相互作用の場である末梢リンパ組織にて Treg は自己反応性 B 細胞を抑制することから、Treg の機能不全は自己反応性 B 細胞の集積を来すと考えられる。

TPH-1 および AIE-75 に対する自己抗体の疾患特異性は、2 つの自己抗原が各々中枢性・末梢性免疫寛容に強く依存している可能性を示唆する。また Treg の分化における AIRE の役割については議論があるが、APECED と比較し IPEX がより早期に発症し重症であることから、その役割はあっても部分的と考えられる。

[結論]

AIE-75 や TPH-1 に対する自己抗体は IPEX と APECED に特異性が高く鑑別診断に有用である。また AIE-75 と TPH-1 に対する免疫寛容は各々末梢性と中枢性寛容に強く依存している可能性がある。