論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※　　第　　号

氏　　名　近澤　未歩

論　文　題　目

内因性抗原に対する自然免疫応答に関する研究

論文審査担当者

主査　名古屋大学教授　内田　浩二

委員　名古屋大学教授　松田　幹

委員　名古屋大学助教　柴田　貴広

別紙1−2

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生体は紫外線やストレス、喫煙、飲酒、偏った食事や栄養状態などのストレスを常に受けており、これらのストレスはタンパク質などの生体成分の非酵素的翻訳後修飾の一因となることが知られている。さらに、タンパク質の非酵素的修飾は、組織の機能低下・障害などを引き起こし、加齢や生活習慣病などの疾病の原因にもなりうる。自然免疫系は、生体の初期防御機構であり、病原体など外因性の抗原を認識し、除去することで感染予防に寄与しているが、自己に由来する内因性の分子（内因性抗原）を認識することが明らかとなりつつある。最終糖化産物（AGEs）は、糖とタンパク質の反応により生成する様々な修飾構造を持つタンパク質を指し、糖尿病における血管障害の進行などに関与していることが予想される非酵素的な翻訳後修飾のひとつである。AGEs の自然免疫系による認識においては、その認識メカニズムや生体における意義など未解明な部分が多い。そこで、AGEs の内因性抗原としての作用に着目し、その認識メカニズムなどを明らかにすることを目的に研究を行った。

(1) AGEs に対する自然免疫応答と抗原認識メカニズムの解析

自然抗体による内因性抗原の認識について検討した結果、血清中の IgM 自然抗体による AGEs の認識を確認した。また、マウスに AGEs を免疫することにより、自然抗体産生細胞である B-1 細胞の割合が有意に上昇すること、抗 AGEs IgM 抗体の産生が上昇することが明らかとなった。また、AGEs 免疫マウスよりモノクローナル抗体を作製し、その特異性を解析した結果、抗体のクラスはすべて IgM であり、AGEs のみでなく、DNA やアポトーシス細胞など様々な内因性抗原を認識することが明らかとなった。IgM 抗体により認識される内因性抗原には、電荷の減少という共通点があることから、分子の電荷が抗原性に重要である可能性を予想し、検討を行った。その結果、様々な修飾タンパク質の抗体との交差性と電荷の減少（Native-PAGE での相対的移動度）には相関性があること、また、タンパク質のリジン残基をアセチル化し、リジン残基の正電荷を打ち消したアセチル化タンパク質が抗 AGEs 抗体に認識されることを確認した。このことより、様々な内因性抗原を認識する自然抗体の抗原認識においては、抗原の特定の構造ではなく、分子表面の電荷の減少が重要であることが予想された。以上の結果より、AGEs は内因性抗原のひとつとして自然抗体の抗原となり得ること、AGEs の生体における蓄積が自然免疫系の活性化を引き起こし、内因性抗原の除去促進などの生体防御システムを亢進することが示唆された。

(2) AGEs と相互作用する血清因子の同定と機能性解析

生体内における AGEs 結合タンパク質としてスカベンジャー受容体や自然抗体が知られるが、これら以外にも AGEs を認識し、除去を促進するような分子が生体に存在しているものと予想し、その探索を行った。AGEs 結合磁気ビーズを用い、血清中の

AGEs 結合タンパク質のプルダウンアッセイを行った結果、補体 C1q が同定された。C1q は抗原に結合し、抗原のオプソニン化を介してその除去を促進する自然免疫系の分子である。等温滴定型カロリメトリーにより、C1q と AGEs の相互作用を確認し、さらに、結合には C1q の正電荷を豊富に含む領域と AGEs 表面の負電荷が重要であることがペプチドを用いた競合実験により示唆された。また、C1q によりマクロファージの AGEs 取り込みが促進されることについても確認した。以上の結果より、C1q は AGEs の生体内における蓄積を予防し、糖尿病などの疾病予防や恒常性維持に寄与する分子のひとつであることが示唆された。C1q は自然抗体と同様、DNA やアポトーシス細胞とも結合することが報告されており、陰性電荷を介した様々な内因性抗原の認識や除去の促進は、様々な自然免疫系分子において利用されているメカニズムであることが予想される。

(3) 自己免疫応答阻害因子としての自然抗体の機能性解析

内因性抗原と自己抗体産生の関連性について検討することを目的に、MFG-E8 ノックアウトマウスを用いた研究を行った。MFG-E8 はアポトーシス細胞のマクロファージによる貪食を促進する分子であり、MFG-E8 ノックアウトマウスは SLE 様の自己免疫疾患を呈する。検討の結果、MFG-E8 ノックアウトマウス血清では、IgM 抗体の産生増加が確認され、特に AGEs を認識する IgM 抗体の産生が顕著に増加することが確認された。また、MFG-E8 ノックアウトマウス由来の抗 AGEs IgM モノクローナル抗体は、シークエンスの germline との相同性が非常に高く、また、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を促進する機能を持つことを確認した。以上の結果から、MFG-E8 ノックアウトによりアポトーシス細胞の除去が十分に行えなくなった際、MFG-E8 を介した経路とは別の経路でアポトーシス細胞の貪食を促進するため、内因性抗原を認識する自然抗体の産生が増加することが予想された。

以上、本研究は、AGEs が内因性抗原のひとつとして自然免疫応答を活性化すること、自然免疫応答には抗原の表面電荷が重要であることを明らかにした。また、AGEs と相互作用する血清因子として補体 C1q を同定した。さらに、自己免疫疾患の予防や生体の恒常性維持において、内因性抗原をはじめとする陰性荷電分子による自然免疫系の適切な活性化が重要であることを示した。これらの結果は、加齢や自己免疫疾患などの疾病の予防として、生体の調節機能の適切な活性化が重要であること示唆しており、創薬や機能性食品の開発に貢献することが期待される。

よって、本審査委員会は、本論文の内容が博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと認め、論文審査に合格と判定した。