

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続けている。このようなストレスは生体を酸化的環境へと導き、最終的には疾病を引き起こすような様々な影響を与える。そのひとつとして、酸化的環境により生成する非酵素的な翻訳後修飾の生成が挙げられる。非酵素的な翻訳後修飾は、タンパク質などの生体分子において生成した場合、分子の機能低下や組織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となることが予想される。

自然免疫系は自然抗体、スカベンジャー受容体、補体など様々な分子より構成される生体の初期防御機構であり、病原体、ウイルス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。自然免疫系は外因性抗原のみでなく、自己に由来する内因性の分子(内因性抗原)をも認識することが明らかとなり、その機能が注目される。内因性抗原には細胞死により生成するアポトーシス細胞や、細胞死に伴い細胞外に放出される DNA, HMGB-1 などの細胞内成分や炎症性タンパク質に加え、自己分子の修飾により生成する酸化 LDL や酸化修飾タンパク質が含まれる。内因性抗原が過剰に蓄積することにより、自己免疫疾患や生活習慣病の発症につながる可能性があり、内因性抗原を自然免疫系が適切に除去することが疾病予防・恒常性維持に寄与するものと考えられている。

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す。AGEs は生体成分においても特に高血糖時において生成されることが知られ、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。AGEs はスカベンジャー受容体のリガンドであることが知られるが、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。

まず、自然抗体に着目して検討を行った。マウス血清を用いた検討の結果、血中の IgM 自然抗体は AGEs を認識することが明らかとなった。また、マウスに AGEs を免疫し、腹腔内の自然抗体産生細胞である B-1 細胞の割合を測定した結果、AGEs 免疫により B-1 細胞の割合は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 免疫を行った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。AGEs など修飾タンパク質の生成の際、タンパク質の求核性アミノ酸残基が修飾されることでタンパク質の表面電荷は負に傾くことが知られる。また、DNA はホスホジエステル結合を有する強い負電荷分子であること、アポトーシス細胞は酸性リン脂質であるホスファチジルセリンを細胞表面に露出するため、生細胞と比較し電荷が下がることが知られる。このように、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はないかと考え、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が確認された。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示唆された。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。

次に、自己免疫疾患の一種であり、抗 DNA 自己抗体の産生を特徴とする全身性エリテマトーデス（SLE）のモデルマウスである MRL-lpr マウスを用い、自己免疫疾患と自然免疫応答の関与について検討を行った。MRL-lpr マウスにおいて、コントロールマウスと比較したところ、抗 AGEs IgM 抗体の産生が増加していることが確認された。また、MRL-lpr マウスより取得した抗 AGEs モノクローナル抗体は、AGEs 免疫マウスより得た抗体と同様に様々な抗原を認識する多重交差性抗体であり、抗体のシーケンス解析の結果から、抗 AGEs IgM 抗体は自然抗体であることが示唆された。さらに、腹腔の B-1 細胞の割合についても解析したところ、MRL-lpr マウスにおいてコントロールマウスと比較し B-1 細胞の増加が認められた。以上の結果から、自己免疫疾患において、自己免疫応答を抑制するために内因性抗原の蓄積などにより自然免疫応答が活性化し、様々な内因性抗原を認識する抗体の産生が増加することが予想された。

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測し、探索を行った。AGEs 結合ビーズを用い、血清中の AGEs 結合タンパク質のブ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。等温滴定型カロリーメトリーにより、C1q と AGEs は直接相互作用し、さらに C1q の塩基性アミノ酸を豊富に含む領域である C1qA(14-26)を介して相互作用することが明らかとなった。この配列中から塩基性アミノ酸を減少させることで AGEs との結合活性が減弱することから、結合には C1q(14-26)の正電荷と AGEs の負電荷が重要であることが予想された。また、C1q が AGEs に結合することにより AGEs がオプソニン化されること、マクロファージによる AGEs の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 は自然抗体と同様に 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。

さらに、アポトーシス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とマクロファージ

両方に結合し、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 のノックアウトマウスは SLE 様の自己免疫疾患を呈する。MFG-E8 マウスを用いて同様に検討を行ったところ、ノックアウトマウス血清では AGEs を認識する IgM 抗体の産生がコントロールマウスと比較し増加することが確認された。また、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、またアポトーシス細胞と結合することが確認された。さらに、モノクローナル抗体は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ことが確認された。このことより、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、自然抗体の産生が増加することが予想された。

AGEs, DNA, アポトーシス細胞など内因性抗原は生体内において常に生成しているが、内因性抗原の増加によって自然免疫系が活性化され、速やかに除去されることで生体の恒常性維持が成立していることが示唆された。また、内因性抗原に共通する性質である分子表面の陰性電荷が自然免疫系による認識に重要であり、電荷というパターンを認識することで構造の異なる様々な分子の除去が可能になっていることが予想された。