

主論文の要旨

**Identification of the novel autoantigen candidate
Rab GDP dissociation inhibitor alpha in isolated
adrenocorticotropin deficiency**

〔 ACTH 単独欠損症における新規自己抗原候補蛋白 Rab GDP
解離抑制因子 α の同定 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：大磯 ユタカ 教授)

清田 篤志

【緒言】

Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 単独欠損症 (isolated adrenocorticotropin deficiency, IAD) は下垂体前葉ホルモンのうち ACTH のみ分泌が障害され、二次性副腎皮質機能低下症を呈する疾患である。IAD の発症機序は明らかでないが、抗下垂体抗体がしばしば出現する事や、慢性甲状腺炎、特発性副甲状腺機能低下症、1 型糖尿病などの自己免疫疾患との合併が比較的高い事から自己免疫機序が想定されている。しかしながら、自己抗原は不明である。そこで本研究では、プロテオーム解析を IAD の抗原候補蛋白を同定し、その自己抗体の有用性について検討した。

【方法】

雄 Sprague-Dawley ラットから下垂体前葉を摘出し、超遠心法で可溶性分画と不溶性分画に分離して SDS-PAGE を行い、IAD 患者血清と健常者の血清を用いウェスタンブロットを施行した。IAD 患者で特異的に認められるバンドを切り出し in-gel digestion を施行し、liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)法で蛋白を同定した。同定された自己抗原候補のリコンビナント全長ヒト蛋白を作成し、血清とのウェスタンブロットを行い、血清中の抗体を確認した。抗原候補蛋白の下垂体前葉での発現は、ラット下垂体抽出物と候補蛋白の抗体とのウェスタンブロット、および下垂体組織切片の蛍光免疫染色で検討した。

【結果】

2 名の IAD 患者血清 (IAD patient1,2) を用いたウェスタンブロットで、ラット下垂体前葉の不溶性分画では 51kDa の位置に、可溶性分画では 75kDa の位置にバンドが認められたが、健常者の血清では認めなかった (Fig.1)。これら 2 つのバンドを質量分析で解析した結果より Rab GDI alpha と serotransferrin が同定された。HEK-293FT 細胞で、Rab GDI alpha と serotransferrin のリコンビナント全長ヒト蛋白の発現をウェスタンブロットで確認した (Fig. 2)。Rab GDI alpha リコンビナント蛋白と IAD 患者血清 (IAD patient1,2) とのウェスタンブロットで反応が認められたが、健常者血清では反応が認められず、質量分析の結果と一致した (Fig. 3)。serotransferrin リコンビナント蛋白は IAD 患者血清、健常人血清いずれにも反応しなかった (data not shown)。更に検討すると IAD 患者血清の全 5 例中 3 例 (60%) で抗 Rab GDI alpha 抗体が陽性だったが、健常者血清 5 例ではいずれも陰性であり、IAD 患者の抗 Rab GDI alpha 抗体の感度は 60% であった。また、陽性例は、いずれも発症から採取まで 1 年以内のサンプルであった (Table 1)。ラット下垂体抽出物を用いたウェスタンブロットで Rab GDI alpha は下垂体前葉に発現する事を確認した (Fig. 4A)。またラット下垂体組織切片を用いた蛍光免疫染色では Rab GDI alpha は下垂体前葉で主に発現し、ACTH 陽性細胞と部分的に共局在を認めた (Fig. 4B-I)。

【考察】

今回の研究で、我々は IAD の下垂体前葉自己抗原候補 Rab GDI alpha を同定した。我々の検索した限りでは、初の IAD 自己抗原候補である。

Rab GDI は Rab から GDP の解離を抑制する因子として同定され、GDP/GTP 交換反応を調節する蛋白である。また Rab GDI は Rab 蛋白の細胞膜への運搬と細胞質へのリサイクルを媒介すると報告されている。Rab GDI alpha mRNA はラット脳で豊富に発現し、神経細胞で分泌顆粒の放出に関わる Rab3A のリサイクルを行い、分泌顆粒の局在を調節する役割を担っているとされる。Rab GDI alpha は下垂体前葉で発現しており部分的に corticotroph と共局在していた事より、抗 Rab GDI alpha 抗体は ACTH 分泌顆粒の trafficking を抑制するか、もしくは抗体依存性細胞障害により corticotroph の選択的破壊を引き起こす自己免疫発症機序が想定された。また Rab GDI alpha が下垂体前葉において ACTH 産生細胞だけでなく他の細胞でも発現している事から、他の前葉ホルモン欠損症における Rab GDI alpha の関与も示唆された。

IAD は下垂体の自己免疫疾患であるリンパ球性下垂体前葉炎 (Lymphocytic Adenohypophysitis, LAH) との関連が想定されており、IAD と LAH では一部共通した発症機序が想定されている。LAH では自己抗原候補蛋白として GH (Growth Hormone)、alpha enolase、などが報告されているが、抗 Rab GDI alpha 抗体の報告はない。抗 Rab GDI alpha 抗体が LAH や他の下垂体前葉ホルモン単独欠損症に関与しているかどうかは、IAD と、LAH など他の単独ホルモン欠損症との分子発症機序の類似点と相違点を明らかにするという意味で興味深い。

今後 IAD 症例での更なる症例の評価だけでなく、下垂体機能低下症を起こす腫瘍などの他の下垂体疾患や、他の自己免疫疾患症例でも抗 Rab-GDI alpha 抗体の感度、特異度を評価するとともに、Rab GDI alpha の病態への関与を検討して行きたい。

【結語】

Rab GDI alpha は IAD の自己抗原候補であり、抗 Rab GDI alpha 抗体は IAD 患者の血清中に多く存在することが示唆された。