



Oxidative stress mediates cell surface expression of SS=A/Ro antigen on keratinocytes

三枝, 淳

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2599

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002599>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【124】

氏 名・(本 籍) 三枝 淳 (鳥取県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1446号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

**Oxidative stress mediates cell surface expression of SS-A/Ro
antigen on keratinocytes**

(酸化ストレスはケラチノサイトにおける SS-A/Ro 抗原の
細胞表面への発現を誘導する)

審 査 委 員

主査 教授 熊谷 俊一

教授 市橋 正光

教授 南 康博

【緒言】

抗 SS-A/Ro 抗体は全身性エリテマトーデス (SLE) やシェーグレン症候群 (SS) 患者血清中でしばしば検出される自己抗体であり、亜急性皮膚ループス (SCLE) や新生児ループス (NLE) の病態と密接な関連を有することが知られている。その対応抗原である SS-A/Ro 抗原は 52kDa と 60kDa の二つの蛋白から構成されている。

自己免疫疾患の病因は不明であるが、遺伝素因を有する個体に何らかの環境因子が作用して発症すると考えられている。環境因子の一つである紫外線によって自己免疫疾患の皮膚病変が増悪したり、さらには疾患活動性が上昇することはよく経験され、光線過敏症は SLE の診断基準の一つにもなっている。紫外線が生体に及ぼす作用のすべてが明らかにされているわけではないが、紫外線は細胞に酸化ストレスとしてはたらき細胞内で様々な活性酸素を発生させたりアポトーシスを誘導したりすることが報告されている。

紫外線を照射されたケラチノサイトは SS-A/Ro 抗原を細胞表面に表出することが知られている。そのメカニズムはいまだ明らかではないが、この現象は 1) なぜ抗 SS-A/Ro 抗体は自己免疫疾患の皮膚病変と密接な関連があるのか、ということのみならず 2) いかにして核内あるいは細胞質内に存在する自己抗原に対する抗体 (自己抗体) が産生され、病原性を発揮しうるのか、という普遍的な問題に対するひとつの解決の可能性を示している。また近年アポトーシス細胞の surface bleb 内に SS-A/Ro 抗原を含む種々の自己抗原が濃縮されていることが報告され、この SS-A/Ro 表出現象との関連が注目されている。そこで今回我々は、この紫外線による SS-A/Ro 抗原の表出現象における酸化ストレスの関与を明らかにする目的で検討を行い、またこの現象におけるアポトーシスの関与についても検討した。

【実験材料および方法】

1) 抗 SS-A/Ro 抗体の精製

インフォームドコンセントを得た後、抗 52kDa-SS-A/Ro 抗体および抗 60kDa-SS-A/Ro 抗体が単独陽性の SLE 患者血清から IgG 成分を精製して、それぞれ抗 SS-A/Ro52 抗体および抗 SS-A/Ro60 抗体として用いた。コントロールとして抗二本鎖 DNA 抗体を用いた。精製した抗体の monospecificity は western blot 法にて確認した。

2) 細胞培養

正常ヒトケラチノサイトは 10%ウシ胎児血清含有 Keratinocyte Growth Medium で、HaCaT ケラチノサイト細胞株は 10%ウシ胎児血清含有 DMEM で培養した。還元作用のある 2-mercaptoethanol はあらかじめ培養液内から除去した。

3) アポトーシスの検出

細胞のアポトーシスは、Hoechst 33342 染色および TUNEL 法によって検出した。

4) 細胞表面 SS-A/Ro 抗原の解析

ケラチノサイトに UVB を照射した 24 時間後に、抗 SS-A/Ro52 抗体および抗 SS-A/Ro60 抗体を用いて間接蛍光抗体法によって SS-A/Ro 抗原の細胞表面の発現を解析した。酸化剤の場合も、添加培養 24 時間後に SS-A/Ro 抗原の細胞表面の発現を解析した。さらにフローサイトメトリーによる解析も同時に行った。

【結果】

1) 紫外線により細胞表面へ誘導される SS-A/Ro 抗原の解析

UVB により細胞表面へ誘導されたのはすべて 52kDa の SS-A/Ro 抗原 (Ro52) であり、60kDa の SS-A/Ro 抗原 (Ro60) は誘導されなかった。

2) 還元剤 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) による SS-A/Ro 抗原表出の抑制

還元剤 NAC を培養液に加えて検討したところ、UVB による Ro52 の表出は NAC により濃度依存性に抑制され、20 mM では完全に抑制された。

3) 酸化剤 diamide による SS-A/Ro 抗原表出の誘導

チオール基酸化剤 diamide を 24 時間添加培養したところ、UVB 照射時と同様に Ro52 が細胞表面へ誘導された。さらに Ro52 の発現パターン及び Ro52 の発現頻度は diamide と UVB とでほぼ一致していた。

4) 酸化ストレスによる SS-A/Ro 抗原の表出におけるアポトーシスの関与についての検討

細胞表面の SS-A/Ro 抗原の検出と同時に核を Hoechst 33342 にて染色して蛍光顕微鏡で個々の細胞を観察したところ、細胞表面へ SS-A/Ro 抗原を表出している細胞はアポトーシス細胞とは異なっていることが明らかとなった。さらに、Caspase inhibitor である *z*-Val-Ala-Asp fluoromethylketone (*z*VAD-fmk) を培養液に加えて UVB によるケラチノサイトのアポトーシスを抑制しても、SS-A/Ro 抗原の細胞表面への表出は抑制されなかった。

【考察】

還元剤 NAC によって UVB による SS-A/Ro 抗原の細胞表面への表出が抑制され、さらに酸化剤 diamide の添加培養によって SS-A/Ro 抗原が UVB 照射時と同様に細胞表面へ誘導されることから、この現象に酸化ストレスが関与していることが明らかとなった。SS-A/Ro 抗原表出の詳細なメカニズムは明らかではないが、この現象が cyclophosphamide によって完全に抑制されることが報告されている。従って、UVB によって生じた活性酸素が何らかの転写因子を活性化し、それによって合成された蛋白が Ro52 の細胞表面誘導に関与するという仮説も成立する。実際、UVB による NF- κ B や AP-1 の活性化や、さらにはその上流にある MAP kinase の活性化は細胞のレドックス制御と密接に関連している。今回我々によって SS-A/Ro 抗原表出作用が明らかとなった diamide および UVB 刺激は、細胞内の様々

な蛋白の合成を促すことが知られている。また、ある条件下では SS-A/Ro 抗原が細胞内で HSP70 などのストレス反応性蛋白と複合体を形成しているという報告もある。SS-A/Ro 抗原の表出に直接関与している蛋白を見つけることは今後の課題であるが、これらストレス反応性蛋白の多くは分子シャペロンとしての働きを有しており有力な候補の一つと考えられる。

アポトーシスの関与についての検討では、SS-A/Ro 表出細胞とアポトーシス細胞が異なること、およびアポトーシスを抑制しても SS-A/Ro 抗原の表出が抑制されなかったことより、SS-A/Ro 抗原の表出はアポトーシスの経路とは無関係であることを明らかにした。

さらに、UVB により細胞表面へ誘導される SS-A/Ro 抗原は 52kDa の蛋白 (Ro52) のみであることが明らかとなった。SS 患者の病変部位では Ro52 反応性 T 細胞が検出されることが知られており、我々の結果も Ro52 が自己免疫応答のターゲットであることを支持している。SLE や SS 患者で検出される抗 SS-A/Ro 抗体が認識する Ro52 のエピトープは leucine zipper と呼ばれるダイマー形成に関与するモチーフ内に存在するといわれている。従って、酸化ストレスなどの刺激で Ro52 が細胞表面へと移動する際に何らかの機序でダイマー構造が解消され、それぞれの Ro52 蛋白がモノマーとなることにより正常なダイマー構造の場合には分子内部に隠されている leucine zipper 上のエピトープが細胞表面へ発現することも考えられる。

NLE 患者の先天性心ブロック (CHB) は母体の抗 SS-A/Ro 抗体と強く関連していることが知られている。胎児心において Ro52 の alternative transcript である 52β が発現しており、NLE 児の母親の血清が高率 (87%) にこの 52β と反応するという報告もある。紫外線による SS-A/Ro 抗原の細胞表面への誘導現象は NLE の皮疹が出生後に出現することの説明によく用いられてきたが、CHB に関する説明は困難であった。今回の我々の検討から、CHB に関しても、胎生期の心臓の発生過程で刺激伝導系の細胞に何らかの酸化ストレスが加わって SS-A/Ro 抗原 (特に Ro52) が細胞表面に発現し、そこへ経胎盤的に胎児流血中に混入した母体由来の抗 SS-A/Ro 抗体が反応して障害が惹起されるという仮説が考えられる。

UVB 以外に今まで SS-A/Ro 抗原を細胞表面へ誘導すると報告されているエストロゲン、ウイルス、TNF-α など酸化ストレスと深いかわりを有するものであり、酸化ストレスをキーワードとしてこの SS-A/Ro 抗原の細胞表出現象を考えることにより、自己免疫疾患の病因病態の新たな解明につながる事が期待される。以上、酸化ストレスが自己免疫疾患の重要な環境因子の一つとしてその病因病態に関わっていることが示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1447 号	氏名	三枝 淳
論文題目	Oxidative stress mediates cell surface expression of SS-A/Ro antigen on keratinocytes 酸化ストレスはケラチノサイトにおける SS-A/Ro 抗原の細胞表面への発現を誘導する		
審査委員	主 査 熊谷 俊一 副 査 市橋 正久 副 査 南 康博		
審査終了日	平成 14 年 3 月 11 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

自己免疫疾患の病因は不明であるが、遺伝素因を有する個体に何らかの環境因子が作用して発症すると考えられている。環境因子の一つである紫外線によって自己免疫疾患の皮膚病変が増悪したり、さらには疾患活動性が上昇することはよく経験される。紫外線は細胞に酸化ストレスとしてはたらき細胞内で様々な活性酸素を発生させたりアポトーシスを誘導したりすることが報告されている。

Ultraviolet-B (UVB) を照射されたケラチノサイトは細胞内 SS-A/Ro 抗原を細胞表面に発現することが知られている。抗 SS-A/Ro 抗体は全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群患者血清中でしばしば検出され、亜急性皮膚ループスや新生児ループス (NLE) の病態と密接な関連を有する自己抗体である。この SS-A/Ro 抗原表出のメカニズムはいまだ明らかではないが、この現象は 1) なぜ抗 SS-A/Ro 抗体は自己免疫疾患の皮膚病変と密接な関連があるのか、ということのみならず 2) いかにして核内あるいは細胞質内に存在する自己抗原に対する抗体 (自己抗体) が産生され病原性を発揮しうなのか、という普遍的な問題に対するひとつの解決の可能性を示している。また近年アポトーシス細胞の surface bleb 内に SS-A/Ro 抗原を含む種々の自己抗原が濃縮されていることが報告され、この SS-A/Ro 抗原表出現象との関連が注目されている。そこで申請者は、この UVB による SS-A/Ro 抗原の表出現象における酸化ストレスの関与について解析し、またこの現象におけるアポトーシスの関与についても検討した。

実験には正常ヒトケラチノサイト及び HaCaT ケラチノサイト細胞株を用いた。細胞表面への SS-A/Ro 抗原の発現は、間接蛍光抗体法及びフローサイトメトリーにて解析した。アポトーシスは、Hoechst 33342 染色及び TUNEL 法により検出した。

まず UVB により細胞表面に発現する SS-A/Ro 抗原について抗 SS-A/Ro52 および Ro60 抗体を用いて解析した。すると、細胞表面に発現しているのはすべて 52kDa の SS-A/Ro 抗原 (Ro52) であり 60kDa の SS-A/Ro 抗原 (Ro60) は発現していないことがわかった。

続いて、還元剤 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) によって UVB による Ro52 表出が濃度依存性に抑制されることから、この現象に酸化ストレスが関与している可能性が示唆され

た。さらに酸化剤 diamide によって UVB 照射時と同様に Ro52 が細胞表面に発現することから、この現象に酸化ストレスが関与していることが明らかとなった。

最後に、Ro52 を表出している細胞はアポトーシス細胞と同一かどうかを明らかにするため、細胞表面の SS-A/Ro 抗原の検出と同時に核を Hoechst 33342 にて染色して観察した。すると、Ro52 表出細胞はアポトーシス細胞とは異なっていた。さらに、Caspase inhibitor である zVAD-fmk によりアポトーシスを抑制しても、Ro52 の表出は抑制されなかった。これらの結果より、SS-A/Ro 抗原の表出はアポトーシスの経路とは無関係であることが明らかとなった。

UVB による SS-A/Ro 抗原表出のメカニズムは明らかではないが、この現象が cyclophosphamide によって抑制されることが報告されている。NF- κ B や AP-1 などの転写因子やその上流にある MAP kinase の活性化は細胞のレドックス制御と密接に関連していることから、UVB によって生じた活性酸素が何らかの転写因子を活性化し、それによって合成された蛋白が Ro52 の表出に関与しているのかもしれない。また、今まで UVB によるこの現象は NLE の皮疹が出生後に出現することの説明によく用いられてきたが、先天性心ブロック (CHB) に関する説明は困難であった。今回の申請者の検討から CHB に関しても、胎生期の心臓の発生過程で刺激伝導系の細胞に何らかの酸化ストレスが加わって SS-A/Ro 抗原 (特に Ro52) が細胞表面に発現し、そこへ母体由来の抗 SS-A/Ro 抗体が反応して障害が惹起されるという仮説も成り立つ。また、アポトーシスの関与についての検討により、SS-A/Ro 抗原の表出はアポトーシスの経路とは異なる経路によることが明らかとなった。

本研究は、自己抗体の病因的意義を考察するモデルと考えられている SS-A/Ro 抗原の細胞表面への表出現象に酸化ストレスが関与していることをはじめて明らかにしたものであり、自己免疫疾患の病因病態における酸化ストレスの役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。