

## 2. 公募研究 5) 細菌と宿主の分子相同ペプチドに対する I d i o t y p p e /Anti-Idotype 抗体に基づく病態診断—ベーチェット病をモデルとして

### 背景

ベーチェット病 (Behçet's disease)は口腔粘膜のアフタ性潰瘍、外陰部潰瘍、皮膚症状、眼症状の4つの症状を主症状とする慢性再発性の炎症性疾患である。世界的にみると日本、韓国、中国、中近東、地中海沿岸に多く見られ、その地理的特徴からシルクロード病とも言われている。ベーチェット病の発症にはう蝕に関する細菌やウイルスなどの微生物の関与が想定されており、微生物の感染に対する過剰な免疫反応が関与することが示唆されているが、現在まで原因は明らかとなっていない。

ゲノムワイド関連解析の結果からベーチェット病患者ではHLA B51陽性率が高いことが知られているが、B51陽性者であっても発症は1500人に1人程度であり、またトルコからドイツへの移民の発症率はドイツ人よりも高頻度であるがトルコ定住者よりも低いことから、遺伝的な感受性に加えて環境要因も重要であることが知られている。

### 目的

我々はこれまで口腔細菌と宿主のApolipoprotein Hの間に分子相動性が存在することを見出し、口腔細菌の感染によって作られた抗体がApolipoprotein Hに結合して機能を阻害し、血栓のリスクを上昇させることを報告してきた。特にベーチェット病では*Streptococcus sanguinis*とApolipoprotein Hの相同ペプチドに対する抗体価がベーチェット病患者でのみ上昇していることを見出し、AMEDのシーズAの補助を受けて特許出願を行った。また自己抗体を認識するモノクローナル抗体の作製も行い、自己抗体の測定システムを確立した。

ベーチェット病は未だに発症原因が不明で診断に役立つ免疫・生化学検査は存在しないが、申請者らの自己抗体測定が有用であれば、ベーチェット病の早期発見と治療に貢献する可能性が高い。近年、国内外の研究から1型糖尿病、SLE、シェーグレン症候群、セリアック病などの自己免疫疾患では、自己抗体が単純に上昇しているだけでなく、Idiotype(Id)抗体が自己抗体(Anti-idiotypic: Anti-Id)抗体に結合し、自己抗原との結合を阻害することで病状の悪化を防いでいることが報告されるようになった。例えば1型糖尿病発症者ではGAD65に対する抗体が上昇するが、抗GAD65抗体を阻害するAnti-Id抗体が高値であると1型糖尿病は発症しないことが報告されているこれらを踏まえて自己抗体の測定によるベーチェット病の診断を行うためにはId抗体を測定する必要があるという着想に至った。

### 被験者

Behçet's Disease患者30名、Sarcoidosis患者30名、Vogt-Koyanagi Harada disease患

者 30 名、Acute Anterior Uveitis 5 名、被験者 23 名を対象として検討を行った。

*Streptococcus sanguinis* と Apolipoprotein H の相同ペプチド GLRVYK に対する抗体に結合する抗体 (Id 抗体) の測定

- I. 相同ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体及びモノクローナルを作製した。
- II. 抗体をパパイン消化によって Fab と Fc に分解し、Fc 部分をプロテイン A カラムで吸収して Fab を精製した。
- III. ELISA プレートに Fab 抗体をコートし、BSA でブロッキングを行った。陽性対照としてヒト IgG 抗体を用い、段階希釈してプレートにコートした。
- IV. 被験者血清は 1:100 に希釈して Fab 抗体と反応させた。
- V. 37°C 2 時間反応させた後に PBS-T で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を反応させた。
- VI. 37°C 1 時間反応させた後に PBS-T で洗浄し、TMB と反応させた。
- VII. 室温で 10 分反応させた後 1 N 塩酸で反応を停止し、OD550nm で吸光度を測定した。段階希釈した陽性対照の濃度と OD 値の関係について 4 parameter で近似曲線を作成し、被験者血清の OD 値を近似曲線に当てはめて得られた抗体濃度をもって被験者血清の抗体価とした。

#### データ解析

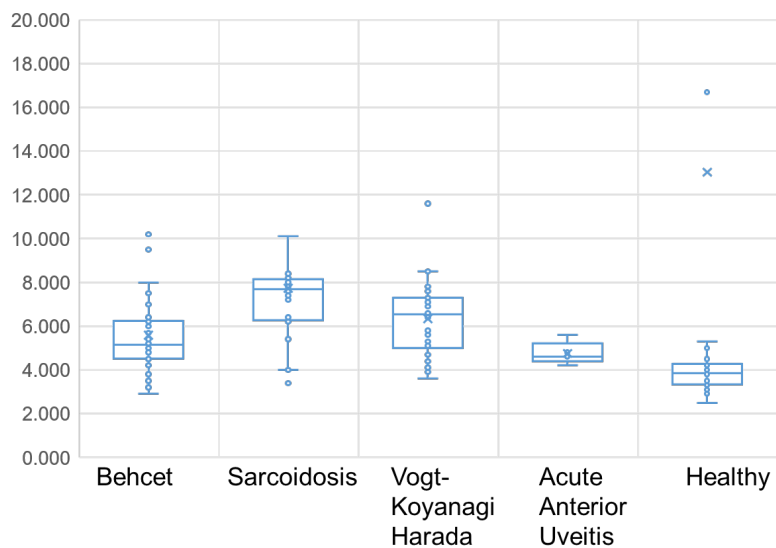
細菌と宿主の分子相同ペプチドに対する Idiotypic/Anti-Idiotypic 抗体の測定値と眼科的所見、歯科所見を合わせて統計学的解析を行い、抗体価の臨床診断への可能性について検討した。

#### 結果及び考察

Id/Anti-Id は基礎免疫学の分野では Jerne がネットワーク説を提唱してからパスツール研究所を中心に研究が行われたものの、1990 年代に入ってから Th1/Th2/Treg といった、免疫応答に関する現在の理解の枠組みから外れているために次第に関心が薄れ、免疫学の教科書からも記載が減少していった。しかし B 細胞由来の白血病に対して抗 Id 抗体を応用する研究など、臨床免疫の研究領域では継続して報告がなされ、さらに 2000 年代に入ってからトランスジェニックマウスを用いた研究でネットワーク説に対する分子生物学的な説明が加えられるようになってから再び注目されている。本研究ではベーチェット病患者において健常者よりも有意に Anti-Idiotypic 抗体が上昇していたが、同様の傾向はサルコイドーシスや原田病でも認められた。またモノクローナル抗体とポリクローナル抗体で異なる傾向がみられたことから、複数の idiotypic が関与している可能性も示唆された。ベーチェット病は現在まで原因不明の疾患であるが、本研究で Id/Anti-Id の役割が明らかとなれば、ベーチェット病をモデルとして自己免疫疾患共通のメカニズムを解明できる可能性があり、

臨床免疫学に大きな波及効果が期待される。

### IgG antibody against rabbit polyclonal anti-GLRVYK idiotype antibody



### IgG antibody against monoclonal anti-GLRVYK idiotype antibody

