

氏名・(本籍) 紺谷桂一(石川県)
学位の種類 博士(医学)
学位記番号 博士大103号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日 平成4年3月23日
学位論文題目 A major antigenic protein associated with autoimmune gastritis in neonatally thymectomized mice
(新生仔期胸腺摘除マウスに発症した自己免疫性胃炎に關与する抗原蛋白)

審査委員 主査教授 細田四郎
副査教授 小玉正智
副査教授 森 渥視

論 文 内 容 要 旨

〔目的〕

特定の系のマウスに新生仔期胸腺摘除を行うと、臓器特異的の自己免疫性病変が発生する。中でも胃炎はヒトの悪性貧血にともなう萎縮性胃炎と類似点が多く、その発生メカニズムを探る上で有用な動物モデルと考えられる。この胃炎に關与する抗原蛋白はその病因を解明する手がかりとなるばかりではなく、同時にヒト悪性貧血の解析にも重要であると思われる。新生仔期胸腺摘除胃炎発症マウス32匹の血清を用いてその抗原蛋白の同定を試みた。

〔方法〕

生後3日目のBALB/cマウスを児島らの方法で胸腺摘除した。90日後にそれらを採血屠殺した。胃を切除し胃炎発生の有無を組織学的に検索した。胃壁細胞はRammrelらの方法にしたがってラット胃より分離した。これより分画遠心法と密度勾配遠心分離法を組み合わせたMaedaらの方法にて各細胞分画を得た。マウス血清に含まれる自己抗体抗体価は、ラット胃壁細胞より精製したベジクル分画に対する反応としてELISA法により測定した。各細胞分画の含有蛋白は、Laemmliらの方法にしたがいSDS-PAGEにて泳動分離した。分離蛋白のうちマウス血清との反応蛋白をウェスタンブロット法で検出した。ベジクル分画と、これから免疫沈降法によりマウス血清反応蛋白を除いた分画とてH⁺/K⁺-ATPase酵素活性を比較した。

酵素活性は Sachs ら、Sacomani らの方法にしたがって K^+ 依存性 ATP 加水分解能として測定した。正常 BALB/c マウスに様々の投与量で胃壁細胞あるいはベジクル分画を 3 週間隔で 3 回 CFA と共に皮下免疫した。最終免疫 1 週後にマウスを採血屠殺した。

〔結果〕

96 匹の胸腺摘除マウスのうち 61% に自己免疫性胃炎が発症した。この中から、ベジクル分画に対して 1600 から 51200 倍の様々の自己抗体価を持つ 32 のマウス血清をランダムに選出した。ウェスタンブロット法により、すべての血清が同分画中の分子量 94 kDa の蛋白に反応した。そのうち 6 血清は 65 から 85 kDa の、あるいは 60 kDa の蛋白とも反応した。これらの蛋白はそれらの分子量からそれぞれ H^+/K^+ -ATPase α -subunit、 β -subunit、intrinsic factor と推測された。マウス血清を用いてベジクル分画から 94 kDa 蛋白を免疫沈降除去することによって、この分画自身が本来持つ H^+/K^+ -ATPase 酵素活性が抑制された。この抑制効果はそれぞれのマウス血清の持つ自己抗体価と相関した。正常マウス免疫実験ではいずれの抗原を用いた場合も、萎縮性胃炎と 94 kDa 蛋白に対する自己抗体が同時に誘導された。

〔考察〕

ヒト悪性貧血は、萎縮性胃炎にともないビタミン B 12 欠乏症に起因する自己免疫性疾患と考えられている。患者血清中には高率に抗胃壁細胞抗体が検出される。これまでの解析で、 H^+/K^+ -ATPase、intrinsic factor、あるいは gastrin receptor がその標的蛋白として知られている。

田口らは以前、マウスの新生仔期に胸腺摘除すると、いくつかの臓器に臓器特異的自己免疫疾患が発症することを報告した。これらの疾患は同系ヌードマウスへのリンパ球移入実験等により、T cell-mediated disease と考えられている。さらに同疾患発症と各自己抗体産生が一致してみられることから、T cell の自己抗原認識と B cell による抗体生産は一連の免疫反応として誘導されたと考えられた。したがって胃炎発症マウスの血清反応蛋白は同疾患の発症に関連した抗原蛋白である可能性が高く、これを解析することはその病因を探る上で重要であると思われる。

今回の検索で 32 匹の胸腺摘除胃炎発症マウスすべてが 94 kDa の蛋白に対する自己抗体を有していることがわかった。これらの血清はベジクル分画が本来持つ H^+/K^+ -ATPase α -subunit が同疾患発症に関与していると考えられた。

以上より本モデルにおける自己免疫性胃炎において、 H^+/K^+ -ATPase α -subunit が抗原蛋白としてその発症に重要であると考えられた。

〔結論〕

- 1) 新生仔期胸腺摘除マウスの 61% に自己免疫性胃炎が惹起された。
- 2) 胃炎発症マウス血清はすべてラット胃壁細胞より精製したベジクル分画中の分子量 94 kDa 蛋白と反応した。

- 3) これら血清はベジクル分画が本来有する H^+/K^+ -ATPase 酵素活性を抑制したという結果から、血清反応蛋白は H^+/K^+ -ATPase α -subunit と考えられた。
- 4) 正常同系マウスを胃壁細胞あるいはベジクル分画で免疫したところ、萎縮性胃炎と 94kDa 蛋白に対する抗体が同時に誘導された。
- 5) H^+/K^+ -ATPase α -subunit が抗原蛋白としてこの自己免疫性胃炎の発症に関与していると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

特定系のマウスの新生仔期に胸腺摘除を施すと、いくつかの臓器に自己免疫性病変が惹起される。甲状腺、胃、副腎、前立腺、卵巣はその好発臓器であり、特に胃炎はヒト悪性貧血に伴う萎縮性胃炎と類似性が高く、同疾患の動物モデルとしてその解析に有用と考えられる。

本論文では、胸腺摘除マウスの胃炎発症に関与する抗原蛋白同定を目的として、以下の実験が行われた。32匹の胸腺摘除胃炎発症マウス血清を用い、ウェスタンブロット法にてその反応蛋白を検出した。それらの *in vivo* での胃炎誘導能を正常マウスへの免疫実験にて解析し、胃炎発症との関連を確認した。

その結果 32匹の胃炎発症胸腺摘除マウスのすべての血清が胃壁細胞より精製した小胞分画中の分子量 94 kDa の蛋白と反応した。同時に 6匹が 65 - 80 kDa と 2匹が 60 kDa 蛋白と反応した。これらはその分子量から、それぞれ H^+/K^+ -ATPase α -、 β -サブユニット、及び内因子と推定された。特に前 2 者は、小胞分画からマウス血清反応蛋白を免疫沈降法により取り除くと分画が本来もつ ATPase 酵素活性が失われたという事実によって確認された。次にこれらの反応蛋白が抗原性を持ち、実際に胃炎発症に関与しているか否かを調べるために、小胞分画で正常同系のマウスを強化免疫した。この結果胃炎を誘導できたすべてのマウスから 94 kDa 蛋白に対する自己抗体が検出できた。

以上の結果より胸腺摘除マウスに惹起された胃炎の発症に関与する抗原蛋白は、 H^+/K^+ -ATPase α -サブユニットであろうと考えられた。

本研究は自己免疫性胃炎の抗原蛋白を動物モデルを用いて同定したものであるが、同蛋白はヒト悪性貧血にともなう萎縮性胃炎でもその病因に関与している可能性が極めて高い。本論文は今後同疾患の予防あるいは治療法を確立する上での基盤となり、医学上の価値も高く、博士(医学)の学位論文に値すると思われる。