

京都大学	博士 (医学)	氏 名	ZHANG SHANSHAN
論文題目	Rheumatoid factor recognizes specific domains of the IgG heavy chain complexed with HLA class II molecules (リウマトイド因子はHLA class II と複合体を構成する IgG 重鎖の特定のドメインを認識する)		
(論文内容の要旨)			
<p>【目的】リウマトイド因子 (rheumatoid factor: RF) は関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) 患者の 70-80%にみられる自己抗体の一つであり、IgG の Fc 部分を認識する抗体で、通常は IgM 型である。近年、ミスフォールドタンパク質が MHC class II に結合した蛋白として細胞表面に提示される機序が提唱されている。IgG 重鎖 (IgG heavy chain: IgGH) は、RA に感受性の HLA class II (HLA-DR4 など) と結合して細胞表面に提示され、RF に認識されることが判明した。このメカニズムをさらに解明するために、IgGH が HLA-DR4 と結合する部位、RF に認識される部位を明らかにすることを目的とし研究を行なったものである。</p> <p>【方法と結果】IgGH は V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} の 4 つのドメインから構成される。まず、HLA-DR4 と結合するドメインを解析した。N 末端に FLAG-tag を付けたシングルドメイン 4 種類 (V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3})、ダブルドメイン 3 種類 (V_H-C_{H1}, C_{H1}-C_{H2}, C_{H2}-C_{H3})、およびトリプルドメイン 2 種類 (V_H-C_{H1}-C_{H2}, C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}) をクローニングし、HEK293T 細胞に HLA-DR4 とともに transfection しフローサイトメトリーで解析した。その結果、C_{H1} ドメインを有する IgGH 断片 (C_{H1}, V_H-C_{H1}, C_{H1}-C_{H2}, V_H-C_{H1}-C_{H2}, C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}) が細胞表面で高く発現した。</p> <p>次に、RF が認識する IgGH ドメインを解析した。HLA-DR4 の peptide binding groove と強く結合することが知られている Cw3 peptide を用いて、Cw3-peptide-IgGH ドメイン (V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) をそれぞれ HLA-DR4 とともに HEK293T 細胞表面に発現させ、RF との結合を解析した。その結果、RF は C_{H3} ドメインと結合が見られ、19 人の RA 患者血清を用いた場合もすべて同様の結果であった。</p> <p>最後に、細胞表面での IgGH ドメイン/HLA-DR 複合体に対する RF の認識を解析した。合計 10 種の組み合わせの IgGH ドメインをそれぞれ HLA-DR4 とともに細胞表面に提示し、RA 患者由来の RF との反応を解析した。その結果、RF は IgGH 全長 (V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}) あるいは C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} ドメインと HLA-DR との複合体を認識した。</p> <p>以上の結果より、RF が IgGH/HLA-DR4 複合体を認識するためには C_{H1} ドメインを peptide binding groove にアンカーとして働かせ、さらにエピトープが存在する C_{H3} ドメインが同時に存在することが必要であると考えられた。</p> <p>【結論】RF が IgGH/HLA-DR 複合体を認識するためには、IgGH の C_{H1} ドメインと C_{H3} ドメインが重要である。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は IgG 重鎖 (IgG heavy chain: IgGH) が、関節リウマチに感受性の HLA class II (HLA-DR4 など) と結合して細胞表面に提示され、リウマトイド因子 (rheumatoid factor: RF) に認識されることを示した過去の知見に基づき、IgGH がどのように HLA-DR4 と結合し、どのように RF に認識されるかの機序を解明するために行われた。まず IgGH を構成する V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} の 4 つのドメインを 1 つないし複数のドメイン断片とし、それぞれの cDNA を作成した。HLA-DR4 と同時に HEK293T へ co-transfection し IgGH ドメイン/HLA-DR4 複合体の細胞表面への発現をフローサイトメトリーで解析したところ、C_{H1} ドメインを有する IgGH 断片が細胞表面で高く発現した。次に RF が認識する IgGH ドメインを明らかにするために、HLA-DR4 の peptide binding groove と強く結合することが知られている Cw3 peptide を用いて、Cw3-peptide-IgGH ドメインをそれぞれ HLA-DR4 とともに HEK293T 細胞表面に発現させ、RF との結合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、RF は C_{H3} ドメインを認識していることが示された。さらに、作成した 10 種の IgGH 断片をそれぞれ HLA-DR4 とともに細胞表面に提示し、関節リウマチ患者由来の RF との反応を解析したところ、RF は IgGH 全長あるいは C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} ドメインと HLA-DR との複合体を認識した。以上の結果より、RF が IgGH/HLA-DR 複合体を認識するためには、IgGH の C_{H1} ドメインと C_{H3} ドメインが重要であると考えられた。

以上の研究は関節リウマチの RF の産生と認識機構の解明に貢献し、自己免疫疾患の病態の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 8 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。