Immunoblotting 法を用いた抗 U1 RNP および抗 Sm 抗体の補体結合性の検討

大道寺英幸

Jpn. J. Clin. Immun., 14 (4) : 395~402, 1991.

Complement fixation activity of anti-U1 RNP and anti-Sm antibody by immunoblotting

Hideyuki Daidoji

*Department of Internal Medicine (Rheumatology)
Juntendo University, School of Medicine*

【Summary】

Complement fixation activity of anti-U1 RNP and Sm antibodies was studied by immunoblotting using sera from patients with mixed connective tissue disease (MCTD) and systemic lupus erythematosus (SLE). U1 RNP antigens were purified from rabbit thymus extract by affinity column. The purified U1 RNP antigen consisted of 65 KD, 36 KD, 32 KD, 26 KD, 16 KD and 11-14 KD polypeptides in SDS-PAGE. Anti-U1 RNP antibodies from patients with MCTD and SLE reacted with 65 KD, 36 KD, 32 KD, and 26 KD in immunoblotting.

When the complement fixation activity of antibodies to those polypeptides was tested in MCTD, the antibodies to 32 KD polypeptide showed the significantly stronger reaction compared with the antibodies to 65 KD and 36 KD polypeptides ($p < 0.01$). In SLE patients, antibodies to 32 KD polypeptide showed the same reactivity, moreover complement fixation activity of antibodies to 26 KD and 16 KD polypeptides showed significantly higher ($p < 0.01$) than those to 65 KD polypeptide. In comparison with complement fixation activity of antibodies to U1 RNP polypeptides between MCTD and SLE, the antibodies to 36 KD polypeptide from SLE patients showed higher activity than that from MCTD patients ($p < 0.05$).

Those results suggest that anti-U1 RNP antibodies from MCTD and SLE patients may have different pathogenetic roles in relation to its complement fixation activity.

Key words : anti U 1 RNP antibody,
anti Sm antibody,
complement fixation,
systemic lupus erythematosus,
mixed connective tissue disease

【概 要】

精製 U 1 RNP を用い、Immunoblotting 法により抗 U 1 RNP および Sm 抗体の対応抗原を分析し、その補体結合性について検討した。

家兔胸腺 PBS 抽出液を抗原源とし、抗 U 1 RNP 抗体 affinity chromatography にて U 1 RNP を精製した。この精製 U 1 RNP を SDS-PAGE, western blotting 法にてニトロセルロース膜に転写し、二重免疫拡散法にて検出した SLE, MCTD 患者の抗 U 1 RNP および Sm 抗体陽性血清を反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて対応抗原の検索を行った。補体結合性は患者血清、補体源 (新鮮正常血清)、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト C 3 抗体を反応させ検討した。SDS-PAGE にて精製 U 1 RNP から主として 65, 36, 32, 26, 16 および 11~14 KD のポリペプチドが検出された。抗 U 1 RNP 血清は SLE, MCTD の診断にかかわらず、65, 36, 32 および 26 KD などのポリペプチドと反応し、抗 Sm 抗体が共存する血清は、それらの Band に加え 16 KD との反応が認められた。これらのポリペプチドに対応する抗 U 1 RNP 抗体の補体結合性を検討したところ、MCTD では 32 KD に対する抗体は、65 KD および 36 KD に対する抗体に比較し有意 ($p < 0.01$) に強かった。SLE でも 32 KD に対する抗体は、65 KD および 36 KD に対する抗体に比較し有意 ($p < 0.01$) に強く、さらに 26 KD および 16 KD に対する抗体は 65 KD に対する抗体に比較し有意 ($p < 0.01$) に強かった。次に MCTD と SLE で比較すると、36 KD において SLE (32%) は有意 ($p < 0.05$) に MCTD (0%) より補体結合性が強かった。抗 U 1 RNP 抗体はその補体結合の相違により、異なる病因的意義を呈する可能性が示唆された。

I. 結 言

抗 U 1 RNP 抗体は、混合性結合組織病 (MCTD) ではほぼ 100% に検出されるが、他の膠原病、特に全身性エリテマトーデス (SLE) でも 30% の症例に出現する¹⁾。SLE における抗 U 1 RNP 抗体の臨床的特徴は、疾患活動性とは無関係に持続的に存在し^{2,3)}、腎症があっても軽く、腎不全を呈するものは少ないと報告されている⁴⁾。U 1 RNP は 68 KD, A (32), B' (29), B (28), C (23), D (16), G-E (11~14) のポリペプチドより成っているが⁵⁾、Pettersson らは MCTD の抗 U 1 RNP 抗体は 68 KD と特異的に反応し、SLE の抗 U 1 RNP 抗体では反応せず疾患により抗体の反応性に違いが認められると報告した⁶⁾。今回われわれは、自験例にて同様の検討を行い、さらにそれらのポリペプチドに対する抗体の補体結合性における疾患特異性の有無を、抗 Sm 抗体も含めて検討した。

II. 対象および方法

1. 対 象

1982 年のアメリカリウマチ協会 (ARA) の SLE 分類基準⁸⁾を満たす SLE 25 例 (抗 U 1 RNP および Sm 抗体の共存 10 例, 抗 U 1 RNP 抗体単独 15 例), および厚生省特定疾患混合性結合組織病調査研究班の診断の手引⁷⁾を満たし、ARA の SLE 分類基準を除外した抗 U 1 RNP 抗体単独陽性の MCTD 20 例を用いた。抗 U 1 RNP および Sm 抗体の同定は二重免疫拡散法⁹⁾により行った。

2. U 1 RNP 抗原の精製

幼若家兔胸腺アセトン粉末 (Pel-Freez 社) 45 g を 500 ml の 0.01 M リン酸緩衝食水, pH 7.4 (PBS) 中で 4°C, 24 時間攪拌後、3,000×G で 20 分間遠沈した上清 (RTE) を抗原源として用いた¹⁰⁾。U 1 RNP 抗原の精製は、初めに RTE を 25~60% の硫酸塩析を行い、次に抗 U 1 RNP 抗体 affinity chromatography を用いて精製した。すなわち、二重免疫拡散法にて抗

源として新鮮正常人血清を 0.03 M CaCl_2 , 0.1 M MgCl_2 添加ペロナル緩衝液で 20 倍希釈したものを 1 時間反応させ¹⁶⁾, 次にペルオキシダーゼ標識抗ヒト C3 ヤギ抗体を反応後, DAB により発色した。さらにこれらを densitometry を用いて定量的に検討した。

次にこれらの抗体の補体結合性の検討に関する con-

[illegible]

表 2 SLE における U1 RNP ポリペプチドに対する抗 U1 RNP 抗体, 抗 Sm 抗体の反応

U1 RNP polypeptide	patient number																frequency of antibody reacted with each polypeptide (total)											
	anti-U1 RNP															frequency		anti-Sm and anti-U1 RNP										frequency
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
65 KD	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	53% (8/10)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	80% (8/10)	64%(16/25)
36 KD	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	87% (13/15)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%(10/10)	92%(23/25)
32 KD	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	93% (14/15)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%(10/10)	96%(24/25)
26 KD	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	80% (12/15)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	90% (9/10)	84%(21/25)
16 KD	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7% (1/15)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%(10/10)	44%(11/25)

図 1 補体結合性に関する control study

lane 1: 抗 U1 RNP, Sm 抗体共存例の U1 RNP ポリペプチドに対する反応. lane 2: 抗 U1 RNP, Sm 抗体共存例の補体結合性. lane 3: 補体を非動化し反応. lane 4, 5, 6: 正常人血清を用い lane 1, 2, 3 と同様に反応. 左の 2 lane は molecular marker と RTE を SDS-PAGE, western blot 後アミドブラックにて染色.

trol study の結果を示す (図 1). lane 1 は抗ヒト IgG を用いた SLE 患者抗 U1 RNP および Sm 抗体共存例の反応をみたもので, 65 KD, 36 KD, 32 KD, 26 KD, 16 KD のポリペプチドが検出されている. lane 2 はその抗体の補体結合性をみたもので, 主として 32 KD, 26 KD に反応が認められ, 65 KD, 36 KD, 16 KD では反応していない. lane 3 は補体を 56°C 30 min で非動化したもので, 32 KD, 26 KD の反応も消失している. lane 3, 4, 5 は正常血清を用いて同様に反応を行ったもので, いずれも反応しなかった. これらの結果より, この系でポリペプチドにより, その補体結合性を特異的に検出できることが示唆された.

MCTD 患者における抗 U1 RNP 抗体の補体結合性

を検討した結果の代表例を示す (図 2). 各レーンの左側が抗ヒト IgG 抗体を用いた対応抗原の反応で, 右側が抗体の補体結合性をみたものである. このように検出された MCTD 患者 18 例の各ポリペプチドに対する抗体の補体結合性を検討した結果を表 3 に示す. 32 KD に対する抗体の補体結合性は 67% に認められたが, 65 KD および 36 KD では 0% とまったく認められず, 有意 ($p < 0.01$) に補体結合性が強かった.

抗 U1 RNP 単独陽性, および抗 U1 RNP と Sm 抗体共存 SLE 例にて同様の検討を行った結果の代表例を図 3 に示す. 抗体の補体結合性は MCTD と同様に, 抗 U1 RNP 抗体単独陽性例では, 32 KD に対応する抗体の補体結合性は 69% と高率に認められたが, 65

図 2 MCTD における U1 RNP ポリペプチドに対する抗 U1 RNP 抗体の反応 (左) と補体結合性 (右)
lane の番号は表 1 の患者血清番号。

表 3 MCTD, SLE における U1 RNP ポリペプチドに対する抗体の補体結合性の比較

U1 RNP polypeptide	MCTD	SLE		
		anti-U1 RNP	anti-Sm and U1 RNP	total
65 KD	0% (0/15)**	0% (0/7)**	13% (1/8)*	7% (1/15)**
36 KD	0% (0/12)**	25% (3/12)*	40% (4/10)	32% (7/22)*
32 KD	67% (10/15)	69% (9/13)	90% (9/10)	78% (18/23)
26 KD	27% (4/15)	55% (6/11)	67% (6/9)	60% (12/20)
16 KD	0% (0/0)	0% (0/0)	70% (7/10)	70% (7/10)

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

分母はポリペプチドに対し反応した抗体の数。分子はそれらの抗体の補体結合性を認めた数。
ただし 16 KD と反応を認めた MCTD 2 例, SLE 1 例は除外した。

KD および 36 KD に対する抗体では 0% および 25% と低率で, 32 KD に対する抗体が有意 ($p < 0.01$ および $p < 0.05$) に補体結合性が強かった。抗 U1 RNP および Sm 抗体共存例では, 65 KD に対応する抗体の補体結合性は 32 KD, 26 KD, 16 KD と比較し有意に弱かった (表 3)。

次に, MCTD と SLE を抗 Sm 抗体共存例を含めて疾患別に検討すると, 36 KD の抗体が SLE で 32% (7/22) に補体結合性が認められるのに対し MCTD では 0% (0/12) と有意差 ($p < 0.05$) が認められた (表 3)。

4. Densitometry

各ポリペプチドに対する抗体によりその補体結合性に相違が認められたため, SLE 患者の抗 U1 RNP および Sm 抗体共存血清で二重免疫拡散法で両抗体の抗体価が等しいものを用い, densitometry で抗体の補体結合性を定量的に比較検討した (図 4)。A) は抗 IgG 抗体との反応を示すが, 65 KD, 36 KD, 32 KD, 26 KD および 16 KD のポリペプチドが検出されている。B) の補体結合性では 32 KD のポリペプチドの反応は強く認められるのに対し, A) と比較し相対的に 65 KD, 36 KD および 16 KD の反応が著明に低下しており, ポリペプチドによりその対応抗体の補体結合性に相違を認めることが半定量的にも示唆された。

図3 SLEにおけるU1 RNPポリペプチドに対する抗U1 RNP抗体, 抗Sm抗体の反応(左)と補体結合性(右) laneの番号は表2の患者血清番号。

図4 Densitometry

A) 抗U1 RNP, Sm抗体共存例のU1 RNPポリペプチドに対する反応, B) 抗U1 RNP, Sm抗体共存例の補体結合性の反応。

IV. 考 案

抗核抗体(ANA)は膠原病患者血清中に高頻度で

出現し, 疾患特異性が高いものも多く, また特異な病態と密接に関係していることもあり, その検出や同定は診断, 治療, 予後判定に重要である。ANAの対応抗原はDNA, RNAなどの核酸, ヒストン, 非ヒストン核蛋白とさまざまなものであるが, 抗U1 RNP抗体, 抗Sm抗体の対応抗原はsnRNPに属し, U1, U2, U4, U5, U6 RNPの5種が含まれる。Hela細胞より精製したU1 RNPはU1 RNAと蛋白との複合体で, 68 KD, A (32 KD), B' (29 KD), B (28 KD), C (23 KD), D (16 KD), E (14 KD), F (12 KD), G (11 KD)の蛋白で構成されている⁹⁾。抗U1 RNP抗体は68 KD, A, C蛋白と反応し, 抗Sm抗体はB', B, D蛋白と反応する⁹⁾。子牛胸腺抽出物より精製したU1 RNPでは, 抗U1 RNP抗体は65 KD, 30 KD, 抗Sm抗体は13 KD蛋白と反応する¹⁷⁾。一方, Habetsら¹⁸⁾は, RTEより精製したU1 RNPでは抗U1 RNP抗体は68 KD, A, B', B, C蛋白と反応し, 抗Sm抗体はB', B, D蛋白と反応すると報告している。このように抗原源や抗原の精製方法によりポリペプチドの組成に違いが認められるが, われわれの用いた精製U1 RNPでは65 KDが68 KD, 36 KDがA, 32 KDがB, 26 KDがC, 16 KDがD蛋白に相当すると思われる。これらのポリペプチドへの抗U1 RNP抗体, 抗Sm抗体との反応はHabetsらのRTE由来のU1 RNPを用いた結果と類似している。

PetterssonらはMCTDおよびSLEにおける抗U1

RNP 抗体の対応抗原の分析を行い、MCTD にて 68 KD のポリペプチドが特異的に検出されるが SLE ではまったく検出されず、疾患により同じ抗 U 1 RNP 抗体でも相違が認められることを報告した⁶⁾。われわれの検討では 65 KD (68 KD) は、MCTD では 85% (17/20) に対し、SLE 全体では 64% (16/25)、さらに抗 U 1 RNP 抗体単独陽性 SLE では 53% (8/15) と MCTD 血清が高率に反応したが有意差は認めなかった。

次に、それぞれのポリペプチドと反応した抗 U 1 RNP 抗体の補体結合性を検討した。その結果、MCTD および SLE 共に 65 KD, 36 KD に対する抗体に比較し、32 KD に対する抗体の補体結合性が有意に強いことが示された。この点についてはさらに Densitometry による定量的な分析で検討された。その結果、抗 IgG 抗体による染色では 32 KD の反応が 36 KD, 26 KD, 16 KD に比較し明らかに弱いにもかかわらず、補体結合性では最も強く検出され、この補体結合性の差が単純に抗体価の差に基づくものでなく、各ポリペプチドに対する抗体により相違が認められることが示唆された。

また、MCTD と SLE の間で各ポリペプチドに対する抗体の補体結合性を検討したところ、SLE の 36 KD に対する抗体の補体結合性が MCTD に比較し有意に強いことが示された。このことは、MCTD の抗 U 1 RNP 抗体が他のポリペプチドに比較し、その補体結合性が低いと思われる 65 KD に高率に反応することに加え、抗 U 1 RNP という同一の抗体ながら、その補体結合性の相違により異なる病因的意義を呈する可能性を示唆している。このことは MCTD と SLE の病態の相違を考えるうえで興味深い所見と思われた。この点について詳細に検討するためには、その epitope 解析が重要と

考える。また抗 Sm 抗体の対応抗原である 32 KD (B), 16 KD (D) の補体結合性は 90%, 70% と高率であった。金山, Tan らは Hep-2 を用いた蛍光抗体法で抗 Sm 抗体の補体結合性が抗 U 1 RNP 抗体より低いと報告しているが¹⁹⁾、これは抗原源の違いや、イムノプロットと蛍光抗体法による相違、U 1 RNP 全体での反応と各ポリペプチドにおける反応の違いによるものと思われる。われわれの系がより特異的であると考えている。

各ポリペプチドにおける補体結合性と臨床症状および検査値の相関を検討したが、有意なものは認められなかった。青塚らは ELISA による抗 U 1 RNP 抗体の補体結合性を検討し、SLE において精神神経症状または腎症、低補体血症と関連すると述べているが²⁰⁾、この点に関しては抗 DNA 抗体、抗 Sm 抗体による影響を考慮する必要がある。また今回の研究は IgG クラスのみであり、他の Ig クラスやサブクラスも考慮し、さらに症例数を増やし検討を加える必要があると思われる。

鳥飼らはわれわれと同様の補体結合性の検討を行い 68 KD, C, D に対する抗体に強い補体活性を認めると報告し²¹⁾、われわれの結果と異なっていた。これらの相違をより明確に検討するためには、各ポリペプチドを単離し、より特異的な反応系を確立する必要があると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました廣瀬俊一教授、橋本博史助教授に深謝いたします。また、終始御指導いただいた高崎芳成講師に深謝いたします。

なお、本稿の一部は、第 15 回日本臨床免疫学会総会で発表した。

文 献

- 1) Tan, E. M. : Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. An analysis Arthritis Rheum., 25 : 753~756, 1982.
- 2) Sharp, G. C., Irvin, W. S., Tan, E. M. et al. : Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am. J. Med., 52 : 148~159, 1972.
- 3) McCarty, G. A., Rice, J. R., Bembe, M. L., Pisetsky, D. S. : Independent expression of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol., 9 : 691~695, 1982.
- 4) Reichlin, M., Mattioli, M. : Correlation of a precipitin reaction to an RNA protein antigen and a low prevalence of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. N. Engl. J. Med., 286 : 908~911, 1972.
- 5) Pettersson, I., Hinterberger, M., Mimori, T., Gottlieb, E., Steitz, J. A. : The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. J. Biol. Chem., 259 : 5907~5914,

- 1984.
- 6) Pettersson, I., Wang, G., Smith, E. I., Wigzell, H., Hedfors, E., Horn, J., Sharp, G. C. : The use of immunoblotting and immunoprecipitation of (u) small nuclear ribonucleoproteins in the analysis of sera of patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.*, 29 : 986~996, 1986.
- 7) 粕川禮司・東條 毅・宮脇昌二・吉田 浩・谷本潔昭・延永 正・鈴木輝彦・高崎芳成・田村多絵子 : 混合性結合組織病診断の手引き. 厚生省特定疾患混合性結合組織病調査研究班 昭和58年度研究報告書, 班長 粕川禮司, 1984, pp. 79~82.
- 8) Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F. et al. : The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.*, 25 : 1271~1277, 1982.
- 9) Tan, E. M., Kunkel, H. G. : Characteristics of a soluble antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 96 : 464~471, 1966.
- 10) Kurata, N., Tan, E. M. : Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arth. Rheum.*, 19 : 574~580, 1976.
- 11) Heide, K., Schwik, G. H. : Salt fraction of immunoglobulines. In *Handbook of Experimental Immunology*. Edited by Weir, D. M., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA. 7. 1~7. 11, 1978.
- 12) Fahey, J. L., Terry, W. E. : Ion exchange chromatography and gel filtration. In *Handbook of Experimental Immunology*. Edited by Weir, D. M., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA. 8. 1~8. 16, 1978.
- 13) Douvas, A. S., Stump, W. E., Reyers, P., Tan, E. M. : Isolation and characterization of nuclear ribonucleoprotein complexes using human anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies. *J. Biol. Chem.*, 254 : 3608~3616, 1979.
- 14) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680~685, 1970.
- 15) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350~4354, 1979.
- 16) Rader, M. D., Yamagata, H., Reichlin, M., Harley, J. : Complement C4 fixation by the anti-La (SSB) found in normal donors and in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 13 : 79~82, 1986.
- 17) Takano, M., Golden, S. S., Sharp, G. C. et al. : Molecular relationships between two nuclear antigen, ribonucleoprotein and Sm : purification of active antigens and their biochemical characterization. *Biochemistry*, 21 : 5929~5935, 1981.
- 18) Habets, W. J., Berden, J. H. M., Hoch, S. O., Venrooij, W. J. V. : Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 ribonucleoprotein antigen. *Eur. J. Immunol.*, 15 : 992~997, 1985.
- 19) Kanayama, Y., Peebles, C., Tan, E. M., Curd, J. G. : Complement-Activating abilities of defined antinuclear antibodies. *Arth. Rheum.*, 29 : 748~754, 1986.
- 20) 青塚新一・大川雅子・木下牧子・横張龍一 : 補体結合性抗 RNP 抗体の臨床的意義. 厚生省特定疾患混合性結合組織病調査研究班 昭和60年度研究報告書, 班長 粕川禮司, 1986, pp. 174~177.
- 21) 鳥飼勝隆・稲田進一・黒川 豊 : 抗 U1-RNP 抗体の補体結合性に関する研究. 厚生省特定疾患混合性結合組織病調査研究班 昭和61年度研究報告書, 班長 粕川禮司, 1987, pp. 121~125.