

氏名(本籍) 松井永子(岐阜県)  
 学位の種類 博士(医学)  
 学位授与番号 甲第435号  
 学位授与日付 平成12年3月24日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
 学位論文題目 Mutations of the IL-12 receptor  $\beta$ 2 chain gene and reduced responses of lymphocytes to IL-12 in atopic subjects  
 1. Reduced IFN-gamma production in response to IL-12 stimulation and/or reduced IL-12 production in atopic patients  
 2. Mutations of the IL-12 receptor  $\beta$ 2 chain gene in atopic subjects

審査委員 (主査) 教授 近藤直実  
 (副査) 教授 高見剛 教授 岡野幸雄

### 論文内容の要旨

アレルギー患者の中にはIgEが高値を示すものが多い。このIgE高値がどのような機序で生じるのかを明らかにすることはアレルギーの病態を理解すると同時にアレルギーの病因遺伝子の解明につながる。IgE産生はT細胞から産生されるサイトカインによって調節されており、健康人の末梢リンパ球単球分画(PBMCs)と比べてアレルギー患者のPBMCsではIFN-gamma産生が少なくIL-4産生が多いといわれている。このことはB細胞内におけるIgEの産生はIFN-gammaのようなTh1系のサイトカインによって抑制されていることを示している。また、IL-12はTh1反応を誘導し、T細胞やNK細胞からのIFN-gamma産生を強く誘導する。

申請者はアレルギー患者の病態において、IgE産生に抑制的に働くサイトカインとしてTh1反応にとって重要であるIL-12、IFN-gammaに注目して、IL-12刺激によるIFN-gammaの産生、IL-12 receptor  $\beta$ 2鎖遺伝子の塩基配列、Stat4のリン酸化について検討した。

#### 1. 研究対象及び研究方法

##### 1) 血清IgE値とPBMCsからのIFN-gamma、IL-12産生量の関係

- 0歳から18歳の17名の健康人および23名のアレルギー患者を対象とした。
- 血清IgEおよびハウスダスト、コナヒョウヒダニに対する特異IgE抗体を測定した。
- Ficoll-Paqueを用いて分離したPBMCsを10%胎児牛血清を含むRPMI1640の培養液にて $1 \times 10^6$ 個/mlの濃度に調整し、無刺激およびphytohemagglutinin (PHA), Derf1, IL-12 (5U/ml) で刺激し37°C、5%炭酸ガス培養器で24時間培養した。
- 培養上清中のIFN-gammaをHuman IFN-gamma ELISA kit (Ohtsuka), IL-12をHuman IL-12 ELISA kit (Bio Source international)を用いて測定した。

##### 2) IL-12 receptor $\beta$ 2鎖遺伝子の塩基配列の検討

- 62名の健康人および75名のアレルギー患者を対象とした。
- ヘパリン加血より分離したPBMCsを $1 \times 10^6$ 個/mlの濃度に調整し、無刺激およびPHA, IL-12 (5U/ml) で刺激し24時間培養した。
- PHAで刺激したPBMCsからISOGEN kit (Nippon Gene) を用いてRNAを抽出しcDNAを合成した。RT-PCR法にてIL-12 receptor  $\beta$ 2 を6断片にわけて増幅させ、Tベクターにクローニングし、ABI 373 Auto sequencerにより塩基配列を決定した。
- 変異のある症例についてはPHAとIL-12で刺激したPBMCsから蛋白を抽出後、抗Stat4抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体でリン酸化Stat4を測定し、コントロールと比較検討した。

#### 2. 研究結果

##### 1) 血清IgE値とPBMCsからのIFN-gamma、IL-12産生量の関係

血清IgEはコントロールで2.9-94 IU/ml、アレルギー患者で121-21000 IU/mlであった。血清IgE値とPHA刺激およびIL-12刺激によるPBMCsからのIFN-gamma産生量の関係を両対数にてプロットしたところ、血清IgE値とIFN-gamma産生量には、それぞれ明らかな負の相関を認めた (PHA刺激:  $r = -0.5125$ ,  $p < 0.001$ , IL-

IL-12刺激 :  $r = -0.5840$ ,  $p < 0.001$ 。

また、PHA刺激したIFN-gamma産生とIL-12刺激したIFN-gamma産生を比較したところ、両者の間には正の相関関係 ( $r = 0.4508$ ,  $p < 0.01$ ) があったが、興味あることに一部にPHA刺激ではIFN-gammaを十分に産生するがIL-12刺激ではIFN-gammaの産生が少ない症例が存在した。血清IgE値とDerf1刺激によるPBMCsからのIL-12産生量の関係を両対数にてプロットしたところ、血清IgE値とIL-12産生量には明らかな負の相関を認めた ( $r = -0.5333$ ,  $p < 0.001$ )。さらに、Derf1刺激によるPBMCsからのIL-12産生量とIL-12刺激したIFN-gamma産生を比較したところ、両者の間には正の相関関係 ( $r = 0.6715$ ,  $p < 0.001$ ) がみられた。

## 2) IL-12 receptor $\beta 2$ 鎖遺伝子の塩基配列の検討

PHA刺激によるIFN-gamma産生量はコントロールで116-10338pg/ml (平均2886pg/ml)、アレルギー患者で46-9417pg/ml (平均1342pg/ml)であった。また、IL-12刺激によるIFN-gamma産生量はコントロールで55-10000pg/ml (平均971pg/ml)、アレルギー患者で測定感度以下から1130pg/ml (平均145pg/ml)であった。アレルギー患者75名のうち24名はIL-12刺激によるIFN-gamma産生量は測定感度以下であった。

cDNAを用いてIL-12 receptor  $\beta 2$ 鎖遺伝子の変異解析を行ったところIL-12刺激によるIFN-gamma産生量が測定感度以下であった24名の中に合計10名において、塩基欠失 (2496 del 91), missense mutations (1577 A to G: R313G, 2799 A to G: H720R) が確認された。これらの異常はコントロール62名とIL-12刺激によるIFN-gamma産生が低下していない51名のアレルギー患者には認められなかった。

さらにIL-12 receptor  $\beta 2$ 鎖遺伝子異常を認めた症例におけるStat4のリン酸化はコントロールに比較して明らかに低下していた。

## 3. 考察

IgE産生はヘルパーT細胞(Th1, Th2)からのIL-4, IFN-gammaなどの各種サイトカインにより調節を受けている。今回、Th1系のサイトカインであるIL-12によるIFN-gamma産生について検討したところ血清IgE値はIFN-gamma産生量と負の相関関係をとった。このことは、IgE高値の患者の末梢血にはIL-12反応性T細胞が減少または、反応性そのものが低下していることを示唆している。さらに、アレルギー患者ではIL-12の産生量も低下していたこととあわせて、アレルギー患者ではIL-12/IFN-gamma loopに異常があると考えられた。IL-12はTh1反応およびIFN-gamma産生を誘導し、IL-12 receptorを介してTh1細胞のStat4のチロシンリン酸化をひきおこす。IL-12 receptor  $\beta 1$ がチロシン残基をもっていないのに対し $\beta 2$ は3つのチロシン残基をもっていることからIL-12刺激伝達に重要な役割をしていると考えられる。そこでIL-12 receptor  $\beta 2$ 鎖遺伝子の塩基配列を検討したところIL-12刺激によるIFN-gamma産生量が測定感度以下であった24名の中に合計10名において2496 del 91, 1577 A to G: R313G, 2799 A to G: H720Rの3種類のheterozygous mutationsが確認された。これらのmutationsは62名のコントロールとIL-12刺激によるIFN-gamma産生が低下していない51名のアレルギー患者には認められなかった。このことはIL-12刺激でIFN-gamma産生が低下している症例ではアレルギーとこれらのmutationsが強く関連していることを示唆している。heterozygous mutationsが認められた症例ではStat4のリン酸化も著しく低下していたことからIL-12 receptor  $\beta 2$ 鎖遺伝子の異常をもつ患者ではIL-12の刺激伝達系に異常が生じ、IFN-gammaの転写が不十分となり、IFN-gammaの産生が低下しIgE産生を抑制できないと考えられた。以上、アレルギー患者のなかにIgE産生の抑制系に働くIL-12シグナルカスケードの異常が病因となっている症例が存在することを始めて示した。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 松井永子は、アレルギー患者のIgE高値の病態を解明する目的で、特にIgE産生の抑制系について検討し、IgE高値のアレルギー患者ではIL-12刺激によるIFN-gamma産生が低下していること、特異抗原刺激によるIL-12産生が低下していることを明らかにした。さらに、IL-12 receptor  $\beta 2$ 鎖遺伝子異常によりIFN-gamma産生不全がおり、ひいてはIgE産生の制御が不十分となり、IgE産生亢進を来すことを明らかにした。これはIgE産生の抑制系の遺伝子異常を明らかにした世界で最初の報告である。この成果は小児科学ならびに免疫、アレルギー学の研究の進歩、発展に少なからず寄与するものと認める。

### [主論文公表誌]

1. Reduced IFN-gamma production in response to IL-12 stimulation and/or reduced IL-12 production in atopic patients  
Clinical and Experimental Allergy 印刷中
2. Mutations of the IL-12 receptor  $\beta 2$  chain gene in atopic subjects  
Biochemical and Biophysical Research Communications 266, 551-555 (1999)