

氏名(本籍)	鈴木清高(愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 520 号
学位授与日付	平成 15 年 3 月 25 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	The correlation between ovomucoid-derived peptides, human leucocyte antigen class II molecules and T cell receptor-complementarity determining region 3 compositions in patients with egg-white allergy
審査委員	(主査) 教授 近藤 直実 (副査) 教授 高見 剛 教授 北島 康雄

論文内容の要旨

食物アレルギーはアトピー性皮膚炎の病因において重要な役割を果たすとされる。卵白は、幼年者における主要な食物アレルギーの原因の1つとなっており、その中でもオボムコイド(OM)は卵白中の他のタンパクよりもアレルギー反応に強く関わっているとされる。CD4陽性T細胞のT細胞レセプター(TCR)は、HLAクラスII分子の溝の中に結合した免疫原性を持つペプチドを認識しており、HLA分子とTCRの相互作用を提唱したモデルにおいては、様々なペプチドに対し様々な相補性決定部位(CDR3)が相対することが知られている。申請者は、アレルギーの反応機構はある特定のHLA分子により提示された抗原の認識に起源すると仮定し、OMにアレルギー反応を示すアトピー性皮膚炎の患者よりOM特異的T細胞株(TCL)およびT細胞クローン(TCC)を樹立し、OMの抗原決定基(T細胞エピトープ)の決定、抗原提示分子および細胞表面マーカーの検討、OM特異的TCCのTCRおよびCDR3の解析を行い、これらの相互関連を明らかにすることを目的に本研究を行った。

1. 研究対象および研究方法

1) 対象

臨床症状、抗原負荷試験、卵白およびOMに対するCAP-RAST結果より卵白アレルギー患者と診断した4名(6ヶ月から1才1ヶ月まで)を対象とした。患者TMとYNは総IgE値と卵白およびOMに対するCAP-RAST値が高値を示し、患者IHとYTはそれらが低値を示し、後2者は、非即時型反応を示していた。

2) OMオーバーラッピングペプチドの作成

186残基からなるOMの全アミノ酸配列を含む、11から15残基ずつオーバーラップさせた14から22残基ずつの23本のオーバーラッピングペプチド(OMペプチド)を作成した。

3) OM特異的TCLおよびTCCの樹立

先に示した4名の末梢血単核球(PBMCs)をOMペプチドと共にまず7から9日間培養した。ペプチドパルス後に30グレイの照射を行った患者のPBMCsを抗原提示細胞とし、サイトカイン(IL-2, IL-4)とともに添加しさらに7日間培養。OMペプチドと照射後PBMCsを用いた細胞増殖反応の検討により有意な増殖のあるTCL(OM特異的TCL)を選択し、これを限界希釈法にてOM特異的TCCを樹立した。

4) OMのT細胞エピトープの決定

上記のOM特異的TCLおよびTCCを、照射後PBMCsとOM粗抗原およびOMペプチドを用いた細胞増殖反応を行い、OMのT細胞エピトープを決定した。

5) 抗原提示分子の検討

上記のOM特異的TCCを、照射後PBMCsとOM粗抗原およびOMペプチドと種々の抗HLA抗体を用いた細胞増殖阻止反応を行い、抗原提示分子の検討を行った。

6) 細胞表面マーカーの検討

上記のOM特異的TCLおよびTCCの細胞表面マーカーを、CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ につきFACS_{can}を用いて検討した。

7) OM 特異的 TCC の TCR および CDR3 の解析

上記の OM 特異的 TCC より RNA を抽出して cDNA を合成し、TCR α 鎖および β 鎖の特異的プライマーを用いて RT-PCR を行い ABI377 auto sequencer により塩基配列を解析し、使用されている TCR 遺伝子 ($V\alpha$, $V\beta$, $J\alpha$, $J\beta$) および CDR3 配列を決定した。

2. 研究結果

1) OM の T 細胞エピトープの決定

OM 特異的 TCL である TM line は、p8-27, p35-53, p40-59, p85-105, p103-122, p156-176 および p166-186 の OM ペプチドの存在下で増殖反応を示し、YN line は、p40-59, p48-69, p75-96, p120-141 および p130-151, IH line は p75-96, p85-105, p120-141, p130-151 および p166-186, YT line は p120-141 および p130-151 の存在下でそれぞれ増殖反応を示した。また OM 特異的 TCC である TM1.3 は p35-53 および p40-59, TM1.4 は p166-186, YN1.5 は p40-59 および p48-69, IH3.3 は p120-141 および p130-151, YT6.1 は p120-141 および p130-151 の存在下で増殖反応を示した。同じ TCL より樹立された TCC (TM1.3 および TM1.4) では、それらの認識するペプチドは各々異なっていた。

2) 抗原提示分子の検討

抗 HLA 抗体を用いた細胞増殖阻止反応結果より、OM 特異的 TCC の抗原提示分子は、TM1.3 は HLA-DRB1*0901, TM1.4 は HLA-DRB1*0901, YN1.5 は HLA-DQB1*0302, IH3.3 は HLA-DRB4*0101, YT6.1 は HLA-DRB1*0405 であることが分かった。同じ TCL より樹立された TCC (TM1.3 および TM1.4) では、異なるペプチドを同じ抗原提示分子 (HLA-DRB1*0901) による提示で認識していた。

3) 細胞表面マーカーの検討

OM 特異的 TCL および TCC の細胞表面マーカーは、全て CD3 陽性、CD4 陽性、CD8 陰性、TCR $\alpha\beta$ 陽性、TCR $\gamma\delta$ 陰性であった。

4) OM 特異的 TCC の TCR および CDR3 の解析

OM 特異的 TCC に使用された TCR α 鎖および β 鎖、またそれらの CDR3 配列には heterogeneity がみられた。同じ TCL より樹立された TCC (TM1.3 および TM1.4) では、それらの有する TCR α 鎖および β 鎖は各々異なっていた。同じペプチドを認識していた TCC (IH3.3 および YT6.1) は、同じ TCR $V\beta$ - $J\beta$ 鎖を有し、両者とも非即時型反応を示す患者らから樹立されていた。CDR3 配列と T 細胞エピトープに、荷電アミノ酸 (正の荷電を持つ 'Q', 'K', 'N', 'R' および負の荷電を持つ 'E', 'D') が存在していた。

3. 考察

樹立された OM 特異的 T 細胞が認識した抗原決定基は、OM 分子全体に散在していた。TCR α 鎖および β 鎖、またそれらの CDR3 配列には heterogeneity がみられ、ここに存在する荷電アミノ酸と、HLA クラス II 分子に結合し提示されたペプチドに存在する荷電アミノ酸が、各々の結合に関与している可能性が考えられた。同じペプチドを認識していた TCC (IH3.3 および YT6.1) は、同じ TCR $V\beta$ - $J\beta$ 鎖を有し、両者とも非即時型反応を示す患者らから樹立されており、ある特定の TCR による抗原認識が各々の患者の症状の特性と強く関与しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 鈴木清高は、アレルギー発症機序における抗原認識機構に着目し、オボムコイド特異的 T 細胞クローンを樹立して、同細胞の認識する抗原決定基、抗原提示分子、細胞表面マーカー、T 細胞レセプターおよび相補性決定部位の同定を行い、それらの相互関連につき検討し、オボムコイドの抗原認識の様式を分子レベルで明らかにした。この成果は小児科学ならびに免疫・アレルギーの研究の進歩、発展に少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

The correlation between ovomucoid-derived peptides, human leucocyte antigen class II molecules and T cell receptor-complementarity determining region 3 compositions in patients with egg-white allergy
Clin Exp Allergy 2002 ; 32 : 1223~1230