

氏名 (本籍) 坂口平馬 (東京都)
 学位の種類 博士 (医学)
 学位授与番号 甲第 497 号
 学位授与日付 平成 14 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 Interaction among HLA-peptide-TCR complexes in cow's milk allergy :
 Significance of HLA and TCR-CDR3 loops
 審査委員 (主査) 教授 近藤直実
 (副査) 教授 高見剛 教授 安田圭吾

論文内容の要旨

アレルギー患児では牛乳に症状を示すが卵には症状を示さないなど、抗原特異性が存在する。この抗原特異性発現機構を解明することはすなわちアレルギー疾患の発症機序を理解し、さらには発症予防を目的とした新しい治療法の確立に重要である。申請者は一連のアレルギー反応の病態のうち抗原認識機構に注目し、牛乳アレルギーの主要抗原である β -lactoglobulin (BLG) を用い、抗原特異的T細胞クローンを樹立した。さらに162個のアミノ酸より成るBLGのT細胞エピトープを決定し、抗原提示分子、T細胞レセプター (TCR)、さらにTCRの相補性決定部位 (CDR3) を検討し、HLA-抗原ペプチド-TCRの3者の結合様式を解明する事を目的に本研究を行った。

1. 研究対象および研究方法

1) BLGのT細胞エピトープの決定。

ペプチド合成機PSSM8 (島津) を用いて、BLGのアミノ酸配列に従い22個のオーバーラッピングペプチドを合成し抗原として用いた。牛乳アレルギーと診断された当院通院中の患者5名を対象に、患者から採取した末梢血単核球をBLG抗原と共培養し、抗原ペプチドパルス後に30グレイの照射を行った患者の末梢血単核球を抗原提示細胞として、サイトカイン (IL-2, IL-4) を添加してfeedingを繰り返しBLG特異的T細胞株を樹立した。さらに限界希釈法を行いBLG特異的T細胞クローンを樹立した。22個のオーバーラッピングペプチドに対する増殖反応から樹立したT細胞クローンが認識するペプチド断片を同定した。

2) BLG特異的T細胞クローンのTCRの解析。

樹立したBLG特異的T細胞クローンより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ABI373 auto sequencerにより塩基配列を解析し、使用されているTCR遺伝子 ($V\alpha$, $V\beta$, $J\alpha$, $J\beta$) を決定した。

3) 抗原提示分子の検討。

樹立したBLG特異的T細胞クローンにおいてその抗原提示分子は6つのクローン中4つのクローンでHLA-DRB1*0405が使われていた。そこで牛乳アレルギー患者18例と非アレルギーコントロール33例でHLA class II分子のDNA typingを行いHLA-DRB1*0405の保有率を比較した。さらに牛乳アレルギー患者の中でBLG特異的T細胞クローンが樹立できた群と樹立できなかった群とでHLA-DRB1*0405の保有率を比較検討した。

2. 研究結果

1) BLGのT細胞エピトープの決定。

5人の患者より6つのBLG特異的T細胞クローンを樹立した。22個のオーバーラッピングペプチドのうちBLGp 97-117が6つのT細胞クローンのうち4つのT細胞クローンで認識されていたため、これが主要なT細胞エピトープ

プと考えられた。

2) BLG特異的T細胞クローンのTCRの解析。

BLG特異的T細胞クローンに使用されたTCR遺伝子にはheterogeneityが認められ、特に同一のBLGp97-117を認識するTCRにおいてさえも同一の一次構造を有してはいなかった。HLA class II分子により提示されたペプチド断片と直接結合するCDR3 α は9~13のアミノ酸で構成されており、全てに正に荷電したアミノ酸 (KもしくはD) を含んでいた。さらに 'NKL' 'OKV' といった特徴的なアミノ酸配列がみられた。これは正に荷電したアミノ酸 (K) を中心にアミド基をもったもの (NもしくはQ) と疎水基 (L, VもしくはF) で構成されていた。さらにそのN末端に 'G' が豊富に存在していた。

3) 抗原提示分子の検討。

牛乳アレルギー患者とコントロール群ではHLA-DRB1*0405の保有率に有意差は認められなかった。牛乳アレルギー患者のうちBLG特異的T細胞クローンの樹立できた群とできなかった群と比較するとその保有率は80%と7.7%でBLG特異的T細胞クローンを樹立できた群で有意に高かった ($p=0.0077<0.05$)。

3. 考察

T細胞エピトープはBLGp97-117が多く認識されていた。抗原提示分子からみるとDRB1*0405が多く機能していた。使用されていたTCR遺伝子にはheterogeneityがみられた。しかしHLA class II分子により提示されたペプチド断片と直接結合するCDR3 α および β ループには特徴的なアミノ酸配列が存在した。CDR3 α の場合、エピトープ内の負に荷電した 'E' とCDR3 α 内の正に荷電した 'K' が水性の環境で引き合い、それぞれの荷電したアミノ酸の近傍の疎水基同士が疎水結合で両者の結合強度を増しているものと考えられた。またCDR3 α のN末端に存在した 'G' がJ領域のframeの 'G' とともに両側からこの結合基にflexibilityを与えることにより構造的に結合を支持していると考えられた。CDR3 β ではエピトープ内の正に荷電した 'K' とCDR3 β 内の負に荷電した 'E' が引き合い疎水基 'Y' がエピトープ内の疎水基と疎水結合し、両者をpackingしていると考えられた。しかしこの特徴的なアミノ酸配列はJ領域遺伝子にcodeされた領域であり、実際、BLG特異的T細胞クローンに使用されていたTCRのJ領域遺伝子は単一のものではなく、T細胞エピトープに結合しやすいものが選択されclonal expansionしたのと考えられた。HLA-DRB1*0405は牛乳アレルギー発症に重要な役割を果たしていることは強く示唆されるが、疾患感受性を支配している遺伝子ではないと考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 坂口平馬は、アレルギー発症機序における抗原認識機構に着目し、 β -lactoglobulin特異的T細胞クローンを樹立して、抗原ペプチド、抗原提示分子、T細胞レセプターの3者の結合様式の解明を行い、牛乳アレルギーにおける主要抗原である β -lactoglobulin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る。

[主論文公表誌]

Interaction among HLA-peptide-TCR complexes in cow's milk allergy : Significance of HLA and TCR-CDR3 loops.

Clinical and Experimental Allergy 2002 ; 印刷中