

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
東野昌子	主査 教授 窪田 隆裕 主査 教授 竹中 洋 副査 教授 吉田 龍太郎 副査 教授 田窪 孝行 副査 教授 朝日 通雄
<b>主論文題名</b> IL-4-dependent induction of IgE <sup>+</sup> basophils in peripheral blood and IgE <sup>+</sup> B cells in spleen as respective indicators of allergen sensitization and a precursor of cells secreting allergen-specific IgE antibody (末梢血中の IgE 陽性好塩基球および脾臓の IgE 陽性 B 細胞がアレルゲンでの感作の指標および抗原特異的 IgE 抗体を分泌する形質細胞の前駆細胞としてそれぞれ IL-4 依存的に誘導される)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>スギ花粉抗原をアジュバントなしにマウスの鼻粘膜下(i.n.)や腹腔内(i.p.)に投与すると、血清中の非特異的 IgE が上昇し、i.n.(または i.p.)投与後 14 日目に皮下(s.c.)投与(i.n.+s.c.または i.p.+s.c.)すると7日後にスギ花粉特異的 IgE が上昇する。しかし、静脈内(i.v.)または s.c.1 回投与では血清中の IgE レベルに変化は無く、14 日後に 2 次刺激(s.c.)すると非特異的 IgE が上昇し、さらに 7 日後に 3 次刺激(s.c.)するとスギ花粉特異的 IgE が上昇することが知られている。以上の結果は、非特異的 IgE の産生が、スギ花粉特異的 IgE の産生に先行する事を意味している。B 細胞は、1 種類の抗原と反応する膜型 IgM を持ち、無数の抗原に反応できる無数の B 細胞が抗原と接する前に準備されている。したがって、抗原がアレルゲンの場合、アレルゲンと反応できる、アレルゲンの数に見合った IgE 陽性 B 細胞が、アレルゲンと接する前に準備される必要がある。本研究では、マウスをスギ花粉抗原で刺激後、どこ(血中および種々のリンパ組織)で IgE 陽性細胞が誘導されるか調べた。</p> <p>《方 法》</p> <p>実験動物には雄の BALB/c 野生型マウス(6～7 週齢)または BALB/c IL-4 ノックアウトマウスを使用し、スギ花粉抗原を i.n., i.p., s.c.あるいは i.v.投与した。処置後 7 日、10 日、14 日と 14 日後にさらに 2 次刺激(s.c.)して 7 日目(初回投与より21日目)に心採血した。その後、Ficoll 密度勾配遠心(1420 x g)で、末梢血より赤血球と大部分の顆粒球を除去し、末梢血単核細胞(PBMC)を得た。初期の実験では、高速遠心(2260 x g)後 buffy coat を回収し、塩化アンモニウム緩衝液にて赤血球を除去し白血球分画を得た。また、脾臓、鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板から遊離細胞を得た。</p> <p>細胞表面に IgE を持つ細胞の検索は、5 x 10<sup>5</sup> 個の細胞に、蛍光色素(FITC や PE)で標識された抗マウス IgE 抗体や IgM 抗体を加え 20 分間静置、洗浄後、セルソーター(FACS Aria)で解析した。その後、抗原陽性細胞をセルソーターで分取し、蛍光顕微鏡(Biozero, BZ-8000)で染色パターンを観察した。細胞に非特異的に付着した(cytophilic)抗体は酸処理により除き、低親和性 FcεR II への IgE の結合は、抗 FcεR II 抗体を加え阻害した。細胞の形態は、HE 染色後に観察した。</p>	

## 《結果》

1) BALB/c 野生型マウスにスギ花粉抗原を i.n. または i.p. 投与すると、10 日と 14 日目に、血清中の非特異的 IgE レベルが上昇し、末梢血中の IgE 陽性細胞数も未処理に比べ有意に増加した。また、スギ花粉抗原を s.c. あるいは i.v. すると、投与後 10 日の血清中の非特異的 IgE レベルには変動がなかったが、IgE 陽性細胞数は有意に増加した。しかし、BALB/c IL-4 ノックアウトマウスでは、どの投与経路でも、IgE 陽性細胞は末梢血中に検出されなかった。これらの結果は、血清中の IgE 濃度より末梢血中の IgE 陽性細胞数の方が、より敏感なスギ花粉抗原感作の指標であること、また、IgE 陽性細胞数の増加に IL-4 が必須であることを示唆している。

2) スギ花粉抗原を s.c. で 3 回投与後の BALB/c 野生型マウスの末梢血中の IgE 陽性細胞は、表面抗原(CD3<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/Mac-1<sup>+</sup>/CCR3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>)と HE 染色像から好塩基球であることが判明した。また、s.c.+s.c. や i.v.+ s.c. 投与後の IgE 陽性細胞も好塩基球であったことは、どの投与経路でも、末梢血中に誘導される IgE 陽性細胞が好塩基球であることを示唆している。

3) 脾臓では、IgE 陽性細胞数が、i.v.+ s.c. でのみ有意に増加した。しかし、腸間膜リンパ節やパイエル板ではどの投与経路でも変化せず、i.n. 刺激後の NALT でもほとんど検出されなかった。また、IL-4 ノックアウトマウスではどの投与経路でも、脾臓、腸間膜リンパ節や NALT 中に IgE 陽性細胞は見られなかった。これらの結果は、脾臓が、スギ花粉抗原を i.v. した場合の応答臓器であり、脾臓での IgE 陽性細胞数の増加に IL-4 が必須であることを示唆している。

4) i.v.+ s.c. 刺激後の脾臓中の IgE 陽性細胞は、2 つの集団に分かれ、主集団は表面抗原(CD3<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/Mac-1<sup>+</sup>/CCR3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>)と HE 染色像から好塩基球と同定された。一方、副集団は表面抗原(CD3<sup>-</sup>/IgM<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CCR3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>)と形態から B 細胞と結論された。

## 《考察》

本研究によって、脾臓がスギ花粉抗原を i.v. した場合の応答臓器であることや、スギ花粉アレルギーの初期に IgE 陽性細胞数が IL-4 依存的に増加することが明らかになった。この IgE 陽性 B 細胞をセルソーターで分取し培養すると、微量のスギ花粉抗原特異的 IgE が産生された(未発表)ことから、この IgE 陽性 B 細胞は、抗原特異的 IgE の産生に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

スギ花粉抗原で i.v.+ s.c. 刺激後の脾臓中に IgE 陽性 B 細胞を少数認めたが、IgM と IgE アイソタイプをもつ B 細胞の存在はこれまでのアイソタイプスイッチングの分子機構についての定説と合致しない。しかし、LPS 刺激されたマウス B 細胞は、IL-4 によって IgG<sub>1</sub> と IgE を分泌したり、 $\mu$  鎖を欠失せずに  $\gamma$  2b 鎖を合成した細胞の報告もある。また、*in vivo* でのアイソタイプスイッチの最中に、元々の C<sub>H</sub> $\gamma$  特異的遺伝子と transgenic された VDJ-C<sub>H</sub> $\mu$  遺伝子が共存し、VDJ transgene 特異的蛋白質を持つ IgG 分子が形成されたとの報告もある。今回見出し出した小数の IgE 陽性 B 細胞でも、新たな分子機構の可能性が推察された。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	東野昌子
論文審査担当者		主査 教授 窪 田 隆 裕	
		主査 教授 竹 中 洋	
		副査 教授 吉 田 龍 太 郎	
		副査 教授 田 窪 孝 行	
		副査 教授 朝 日 通 雄	
主論文題名			
<p>IL-4-dependent induction of IgE<sup>+</sup>basophils in peripheral blood and IgE<sup>+</sup> B cells in spleen as respective indicators of allergen sensitization and a precursor of cells secreting allergen-specific IgE antibody</p> <p>(末梢血中の IgE 陽性好塩基球および脾臓の IgE 陽性 B 細胞がアレルゲンでの感作の指標および抗原特異的 IgE 抗体を分泌する形質細胞の前駆細胞としてそれぞれ IL-4 依存的に誘導される)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>アレルギー反応における抗原特異的 IgE の産生機構については未だ不明な点が多い。申請者は BALB/c 野生型マウスと BALB/c IL-4 ノックアウトマウスを用い、スギ花粉抗原を鼻粘膜下(i.n.)腹腔内(i.p.)皮下(s.c.)あるいは尾静脈内(i.v.)に投与した。1次刺激後7日、10日、14日と14日に2次(s.c.)刺激して7日後(初回投与より21日目)に、末梢血単核細胞と種々のリンパ組織から遊離細胞を得、抗マウス IgE 抗体と抗マウス IgM 抗体を加えセルソーター(FACS Aria)で解析した。</p> <p>その結果、BALB/c 野生型マウスにスギ花粉抗原を i.n.(あるいは i.p.)投与すると、10日と14日後に、血清中の非特異的 IgE レベルと末梢血中の IgE 陽性細胞数が有意に増加した。また、s.c.(あるいは i.v.)すると、投与後10日の血清中の非特異的 IgE レベルには変動がなかったが、末梢血中の IgE 陽性細胞数は有意に増加した。さらに、スギ花粉抗原を種々の経路で1~3回投与すると、投与回数に従い IgE 陽性細胞に結合する IgE 量が増加し、この IgE 陽性細胞は、表面抗原(CD3<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/Mac-1<sup>+</sup>/CCR3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>)と HE 染色像から好塩基球であることが判明した。しかし、BALB/c IL-4 ノックアウトマウスでは、どの経路で頻回投与しても、IgE 陽性細胞は末梢血中に検出されなかった。これらの結果は、末梢血中の IgE 陽性細胞数の方が血清中の IgE 濃度より敏感なスギ花粉抗原感作の指標であること、また、IgE 陽性細胞数の増加に IL-4 が必須であることを示唆している。一方、脾臓では、IgE 陽性細胞数が、i.v.後14日に s.c.(i.v.+s.c.)でのみ有意に増加し、腸間膜リンパ節、パイエル板ではどの投与経路でも変化せず、i.n.刺激後の鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)でもほとんど検出されなかった。また、IL-4 ノックアウトマウスでは、どの経路の頻回投与でも、脾臓、腸間膜リンパ節や NALT 中に IgE 陽性細胞は検出されなかった。これらの結果は、脾臓が、スギ花粉抗原を i.v.した場合の応答臓器であり、脾臓での IgE 陽性細胞数の増加に IL-4 が必須であることを示唆している。さらに i.v.+s.c.刺激後の脾臓中の IgE 陽性細胞を調べると、2つの集団に分かれ、major な集団は、表面抗原(CD3<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/Mac-1<sup>+</sup>/CCR3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>)と HE 染色像から好塩基球と同定され、minor な集団は、表面抗原(CD3<sup>-</sup>/IgM<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CCR3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>)と形態から B 細胞と結論された。</p> <p>本研究により、種々の経路でスギ花粉を投与すると、投与回数に従って、末梢血中の IgE 陽性細胞数と IgE 結合量が IL-4 依存的に増加することや、脾臓がスギ花粉抗原を i.v.した場合の応答臓器であることが明らかになった。脾臓中の IgE 陽性 B 細胞をセルソーターで分取し培養すると、微量のスギ花</p>			

粉抗原特異的 IgE が産生されたことから、この IgE 陽性 B 細胞は、抗原特異的 IgE の産生に重要な役割を担っている可能性が考えられる。また、今回見出し出した少数の IgE 陽性 B 細胞の存在は、 $\mu$  鎖を欠失せずに $\epsilon$ 鎖を合成した可能性を示唆している。

本研究で得られた成果は、スギ花粉アレルギーにおける IgE 産生機構解明に寄与すると考えらる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Microbiology and Immunology 53(1): 30 - 40 , 2009