

学位論文題名

IgE and IgG 4 antibodies from patients with mite allergy recognize different epitopes of Dermatophagoides pteronyssinus group II antigen (Der p 2).

(ヤケヒョウヒダニ・グループII抗原における、ダニアレルギー患者
IgE および IgG 4 抗体結合部位の解析)

学位論文内容の要旨

【緒言】

ヤケヒョウヒダニ(Dermatophagoides pteronyssinus)はアレルギー性疾患の重要な誘因と考えられており、特に小児気管支喘息の80%以上においてその主たる抗原とされている。ヤケヒョウヒダニの成分の中で特にアレルギー性の強い主要アレルギーには、Der p1、Derp2、Derp3の3つが知られている。Derp1・Derp2のcDNAは既に単離されており、このうちDer p2の成熟蛋白は分子量約14kd、129アミノ酸からなり、糖鎖は持たないことが知られている。これまでにDerp2における抗体結合部位に関してIgE抗体は酵素処理したnative Derp2および合成ペプチドを用いた報告があるが、IgGないしIgG4抗体に関してはほとんど知られていない。

IgEおよびIgG4はそのクラススイッチ制御機構の共通性から、一つの抗原に対し同じ特異性を持つことが予想されたが、近年必ずしも両者の認識するエピトープが一致しない可能性が示唆されている。

本研究においてはpolymerase chain reaction法(PCR)と融合蛋白発現ベクターを用いてDerp2の全長およびその断片を大腸菌内で発現させ、これらの融合蛋白に対するダニアレルギー患者血清中のIgEおよびIgG4抗体の反応性を検討した。

【材料と方法】

ヤケヒョウヒダニ虫体よりacid-phenol法を用いてRNAを抽出後、逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを作製し、これを鋳型として成熟Derp2蛋白の全長(1-129)およびアミノ酸残基1-40、20-63、41-80、64-105、81-129をコードするcDNAをPCRで増幅した。その産物をマルトース結合蛋白(MBP)融合蛋白発現ベクターpMALc2に挿入し、大腸菌TB1を形質転換した。これにisopropyl-thiogalactosideを加えて融合蛋白を発現させ、菌体を破碎後、アミロース・レジンを用いて融合蛋白(p1-129,p1-40,p20-63,p41-80,p64-105,p81-129)を精製し、ウェスタンブロット法に用いた。各融合蛋白の発現は兔抗MBP血清および兔抗Derp2血清を用いて確認した。ヒト血清はmockのpMALc2で形質転換したTB1のlysateで5倍希釈し、4℃で16時間反応後、IgE抗体の検出には2次抗体としてペルオキシダーゼ標識(PO)-ヤギ抗ヒトIgE抗体、またIgG4抗体の検討にはマウスモノクローナル抗ヒトIgG4抗体(2次抗体)、PO-ヤギ抗マウスIgG抗体(3次抗体)と反応させ、化学蛍光発色システム(ECL)を用いてX線フィルムを感光しこれを現像した。

ダニアレルギー患者血清はダニ特異的IgE RAST scoreが3+以上で、減感作療法は受けていない気管支喘息13例（5-16歳、男児10例、女児3例）より得た。

【結果】

兔抗MBP血清はすべての融合蛋白に同程度に反応した。また兔抗Derp2血清も全ての融合蛋白に反応したが、p1-129,p41-80,p64-105,p81-129に対し特に強い反応性を示した。

ダニアレルギー患者13例中12例でIgE抗体とp1-129（Derp2全長）の反応が見られ、うち11例でいずれかの断片との反応も見られた。11例中10例はp41-80と、9例がp63-105と、7例でp81-129とIgE抗体の反応が認められたが、いずれの症例でもp1-40およびp20-63とは反応を認めなかった。

IgE高値の抗ダニ抗体陰性コントロール血清（高IgE症候群患者；IgE RIST 12000IU/ml、ダニ特異的IgE RAST陰性）および成人ボランティアより得たコントロール血清においてはIgE抗体とp1-129の反応は認められなかった。

IgE抗体結合部位を明らかにできた11例中9例でIgG4とp1-129の反応を認めた。このうちいずれかの断片との反応性を認めたのは4例であった。この4例のプール血清はMBPとは反応しなかった。個々の患者におけるIgG4抗体結合部位を検討すると、4例全てにおいてp1-40、p64-105、p81-129、3例でp20-63、2例でp41-80と幅広い反応性が見られた。正常コントロール2例中1例でIgG4抗体はp1-129と反応を示した。p1-129と患者血清ないし正常コントロール血清のIgG4との反応は過剰量の精製Derp2抗原で完全に阻害された。従ってこれらの反応は抗原に特異的なものと考えられた。

【考案】

Derp2蛋白の全長および5つの重複する断片を融合蛋白として作製し、これらを用いてダニアレルギー患者血清中のIgE抗体のDerp2における結合部位はp41-80、p64-105およびp81-129にあり、特にp41-80に対する反応頻度が高いことを示した。Derp2のIgE抗体結合部位は、ダニ虫体より精製し酵素処理した抗原を用いた実験で、N末端側76アミノ酸を含む断片に存在することが知られており、この断片にはp41-80の大部分が含まれている。また合成ペプチドを用いた報告ではアミノ酸残基65-78にダニアレルギー患者血清の60%が反応し、さらに65-78のペプチド内でもIgE結合部位に多様性があることが示されている。我々の検討ではこの部分を含むp41-80、p64-105の他にp81-129に対する結合を認める症例があり、さらに幅広い多様性が示されたと同時にIgE抗体の特異性に個体差が存在する可能性が示唆された。

一方、Derp2抗原におけるIgGないしIgGサブクラス抗体の結合部位に関しては、これまで報告されていない。そこで、IgE抗体結合部位を明らかにできた11例でIgG4抗体のp1-129に対する結合性を検討したところ、9例で反応が認められた。同時に非アレルギー患者血清2例中1例でも反応が認められた。この結果はIgE抗体を持たない正常血清中にもしばしば抗Derp2-IgG抗体が含まれるという従来の報告と一致する。さらにp1-129に反応した9例中、いずれかの断片に反応し、その結果IgG4結合部位が同定出来たものは4例であったが、いずれの症例においてもIgG4抗体が認識するエピトープはIgE抗体のそれより広範囲であった。同様なIgE抗体とIgGないしIgG4抗体の結合部位の違いはDerpIおよびネコの主要アレルゲンFel dIでも報告されている。

こうしたIgE抗体とIgG4抗体の結合部位の差異は、共通の特異性をもつ前駆細胞からIL-4、IL-13による共通のクラススイッチ機構を経て両抗体が産生される機序のみでは説明がつかない。Derp2に対してIgG4抗体がより広い特異性を有していることを考慮すると、IgE抗体の特異性決定の上で何らかの特別な機序が働いている可能性が示唆される。また、Derp2で免疫した兔血清中のIgG抗体がヒトIgE抗体と類似した特異性を持つことから、抗原侵入経路の違いによって抗体の特異性も変る可能性も示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

IgE and IgG 4 antibodies from patients with mite allergy recognize different epitopes of Dermatophagoides pteronyssinus group II antigen (Der p 2).

(ヤケヒョウヒダニ・グループII抗原における、ダニアレルギー患者
IgE および IgG 4 抗体結合部位の解析)

ヤケヒョウヒダニはアレルギー性疾患の重要な誘因と考えられており、特に小児気管支喘息の80%以上においてその主たる抗原とされている。ヤケヒョウヒダニの主要アレルゲンの一つDer p2は129アミノ酸からなる分子量約14kdの蛋白である。これまでにDer p2における抗体結合部位に関してIgE抗体は酵素処理したnative Der p2および合成ペプチドを用いた報告があるが、IgGないしIgG4抗体に関しては知られていない。

IgEおよびIgG4はそのクラススイッチ制御機構の共通性から、一つの抗原に対し同じ特異性を持つことが予想されたが、近年必ずしも両者の認識するエピトープが一致しない可能性が示唆されている。

本研究はPCR法と融合蛋白発現ベクターを用いてDer p2の全長およびその断片を大腸菌内で発現させ、これらの融合蛋白に対するダニアレルギー患者血清中のIgEおよびIgG4抗体の反応性から、両抗体の認識するエピトープを検討したものである。

ヤケヒョウヒダニ虫体より得たRNAから1本鎖cDNAを作製し、これを鋳型として成熟Der p2蛋白の全長(1-129)およびアミノ酸残基1-40、20-63、41-80、64-105、81-129をコードするcDNAをPCRで増幅。これをマルトース結合蛋白(MBP)融合蛋白発現ベクターpMALc2に挿入し、融合蛋白(p1-129,p1-40,p20-63,p41-80,p64-105,p81-129)を作製した。これらの融合蛋白の発現および特異性は兔抗MBP血清および兔抗Der p2血清を用いたウェスタンブロット法で確認した。

IgEおよびIgG4の結合部位もウェスタンブロット法で行った。ヒト血清はmockのpMALc2で形質転換したTB1のlysateで5倍希釈することによって非特異的の反応を除去し、またnative Der p2抗原による結合阻害実験等によって、反応の特異性を確認した。血清と反応後、IgE抗体の検出には2次抗体としてペルオキシダーゼ標識(PO)-ヤギ抗ヒトIgE抗体、またIgG4抗体の検討にはマウスモノクローナル抗ヒトIgG4抗体(2次抗体)、PO-ヤギ抗マウスIgG抗体(3次抗体)と反応させ、化学蛍光発色システム(ECL)を用いてシグナルを検出した。

減感作療法は受けていない気管支喘息13例中11例でIgE抗体の結合部位を同定可能であり、11例中10例はp41-80と、9例がp63-105と、7例でp81-129とIgE抗体の反応が認めら

れたが、いずれの症例でもp1-40およびp20-63とは反応を認めなかった。

IgE抗体結合部位を明らかにできた11例中9例でIgG4とp1-129の反応を認めた。このうち4例でIgG4結合部位を同定できた。その結果、4例全てにおいてp1-40、p64-105、p81-129、3例でp20-63、2例でp41-80との反応性が見られた。

以上よりダニアレルギー患者血清中のIgE抗体のDer p2における結合部位はp41-80、p64-105およびp81-129にあり、特にp41-80に対する反応頻度が高いことが示された。またIgG4抗体が認識するエピトープはIgE抗体のそれより広範囲であった。

同様なIgE抗体とIgGないしIgG4抗体の結合部位の違いはDer p1およびネコの主要アレルゲンFel d1でも近年報告されており、一般的に認められる現象と理解される。

従来、共通の特異性をもつ前駆細胞からIL-4、IL-13による共通のクラススイッチ機構を経てIgE・IgG4両抗体が産生されるという考え方が支配的であるが、本研究の成果は抗体特異性決定の上でIgE抗体とIgG4抗体で何らかの異なる機序が働いている可能性を示唆する点で貴重な意味を持つと考えられる。

審査に当たっては副査の小池教授から1) ウェスタンブロット法を用いた反応性検討では、血清中の特異的IgEとIgG4が競合しないか。2) Der p2抗原中のT細胞エピトープと今回のIgE・IgG4が認識するエピトープの関係について。3) Der p2抗原の糖鎖の関与について等の質問があった。次いで副査の小林教授より1) 抗体との反応性に及ぼす抗原のコンフォメーションの影響について。2) 血中に存在する特異抗体と気管支分泌液等に存在する抗体間で認識する抗原エピトープに差はないか等の質問があった。さらに主査の上出教授よりIgEとIgG4が認識するエピトープが異なる理由について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去のアレルゲンのエピトープ検索に関する国内外の論文を引用しつつ、これまでの小児アレルギー、免疫学の勉強に基づき明確な回答をした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、研究歴や既出論文なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。