

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

氏名 安永 祥

指導教官名 辻本 元

論文題目 Studies on pathophysiological roles and clinical application of co-stimulatory molecules in dogs with allergic diseases.

(犬のアレルギー性疾患における共刺激分子の病態生理学的役割と臨床応用に関する研究)

共刺激分子とは、抗原特異的免疫応答において抗原と独立したシグナルを主に T 細胞に伝達し、免疫応答の活性化または抑制を誘導する接着分子群である。特に T 細胞上に発現する CD28 および Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)と、これらの共通のリガンドであり主に抗原提示細胞(APC)や B 細胞上に発現する CD80 と CD86 との相互作用は、免疫系における主要な共刺激経路と考えられている。これらの分子を介した共刺激は、APC からの MHC-抗原複合体を介した抗原提示と同時に起こる。CD28 と CD80/CD86 の相互作用は抗アポトーシス遺伝子 BCL-XL の誘導や IL-2 などのサイトカインの産生を介して T 細胞の活性化と増殖を誘導し免疫応答を発現させる。一方、活性化 T 細胞のみに発現が認められ CD80/CD86 に対して CD28 より 40-100 倍高い親和性を示す CTLA-4 は、免疫抑制性サイトカインの誘導や T 細胞活性化に関与するシグナルタンパクの停止または不活化を誘導し、さらに CD28 を介した共刺激に競合することで活性化 T 細胞を抑制し、免疫応答を終息させると考えられている。

共刺激分子は免疫応答において中心的な役割を果たしていることから、多くの免疫介在性疾患の病理発生にも関与していると考えられる。特に CD80 と CD86 は単なる機能的相関体ではなく、それぞれ CD28 との相互作用によってサイトカインやケモカインなどの液性因子の産生に異なる影響を示すことが知られており、抗原特異的リンパ球の活性化だけ

でなく Th1-Th2 バランスの変化を通じて免疫学的な病理発生にも深く関与することが推測される。そこで本研究では犬のアレルギー性疾患をモデルとして、共刺激分子群の発現解析を行うことによってその病態生理学的役割を検討し、さらに将来的な臨床応用を目的として共刺激分子を標的とした新規治療法の開発を目指した基礎的検討を行った。

Chapter I ではアレルギー性疾患のモデルとして 12 頭の実験的日本スギ花粉抗原感作犬を作成し、末梢血単核球(PBMC)における共刺激分子群(CD28, CTLA-4, CD80, CD86)の発現量の解析を行った。また感作抗原に対する免疫応答の指標としてリンパ球刺激試験も同時に行った。その結果、6 頭の感作犬は日本スギ花粉抗原を用いたリンパ球刺激試験において強い幼若化反応を示し、このうち 5 頭では刺激後 24-48 時間に持続的な CD80 の発現増強がみられた。一方、残りの 6 頭は顕著な幼若化反応を示さず、このうち 5 頭は刺激後 24 時間後に一過性の CD80 の発現増強を示し 48 時間後ではその発現は低下していた。これらの結果から感作抗原特異的な T 細胞の活性化に CD28-CD80 を介した共刺激経路が関与することが示唆された。同時に測定した CD86、CD28 および CTLA-4 分子の発現量には変化は認められなかった。

Chapter II では、犬における代表的なアレルギー性疾患の一つであるアトピー性皮膚炎の自然発症例を用いて、免疫(減感作)療法後の CD80 および CD86 の発現量の解析を行った。免疫療法はアレルギー性疾患における原因療法の一つであり、アレルゲン量を漸増しながら反復投与することによって臨床症状の改善を誘導する治療法であるが、その詳細な機序については不明である。Chapter I の結果から、CD80 の発現増強による CD28-CD80 共刺激がアレルゲンに対する免疫応答の一因であり、免疫療法がこれを低下させることによって臨床症状を改善するという仮説を立てて実験を行った。皮膚の掻痒および発疹を主訴として東京大学動物医療センターに来院し、Willemse の診断基準に従ってアトピー性皮膚炎と診断し、その後免疫療法を行った 17 頭の犬の症例について CD80 および CD86 の発現解析を行った。その結果、臨床症状に改善のみられた 11 頭、および改善のみられなかった 6 頭のいずれにおいても PBMC での CD80 発現の増強が認められた。しかし、これらの犬で感作抗原刺激による CD80 発現量の変化はみられず、免疫療法後の臨床症状とも関連しなかった。また CD86 の発現量には変化はみられなかった。このアトピー性皮膚炎の犬の PBMC における CD80 の非特異的発現増強は、B 細胞や樹枝状細胞など非 T 細胞群における変化を反映しており、これらの犬は抗原過敏性が亢進した状態にあると推測された。また Chapter I の実験的日本スギ花粉抗原感作犬との CD80 発現量の違いについては、より重度なあるいは長期間にわたるアレルゲンへの暴露に由来するものと考えられた。

Chapter III では共刺激分子を利用した新規治療法の開発に関する基礎的検討として、CTLA-4 の細胞外領域と高親和性 IgE レセプターである FcεRIα とのキメラ蛋白

(CTLA4-Ig-Fc)を発現する DNA ワクチンを作成した。接着分子と結合させた抗原は、本来の分子と比較して効率よく APC に取り込まれ、より強い免疫応答を誘導することが報告されている。本研究で作成したキメラ蛋白も、IgE・アレルギー複合体と結合し、これを CD80/CD86 を発現する APC に効率的に取り込ませるようにデザインされたものである。*In vitro*での解析により、培養細胞で発現させた CTLA4-Ig-Fc は、犬の PBMC 中の単球分画および精製イヌ IgE とそれぞれ結合できることが示された。また CTLA4-Ig-Fc の生理活性を検討するために、実験的日本人スギ花粉抗原感作犬より PBMC を採取し、日本人スギ花粉抗原を用いたリンパ球刺激試験に CTLA4-Ig-Fc を添加したところ、通常では幼若化反応が誘導できない低濃度の抗原刺激においてもリンパ球増殖を増幅する結果が得られた。その生理活性の評価には検討の余地が残るものの、これらの結果はより有効性の高い免疫療法の開発に向けた新しい CTLA-4 ワクチンの臨床応用の可能性を示唆するものと考えられる。また IgE イディオタイプの誘導や生体の IgE を利用することによる多価ワクチンとしての性質など、これまでのワクチンにはない作用機序の解析も今後の検討課題であると考えられた。

本研究の結果は、犬のアレルギー性疾患においてアレルギーに対する免疫応答に CD28-CD80 相互作用を介した共刺激経路が関与することを示しており、また本疾患に対する共刺激分子を標的とした新規免疫療法の有効性についても示唆するものである。