

論文の内容の要旨

論文課題 CpG ODN-mediated Prevention from Ovalbumin-induced Anaphylaxis in Mouse through B Cell Pathway

和訳 CpG ODN は B 細胞の IgE、IgG1 産生を阻害することで アナフィラキシーを軽減する

指導教員 高津 聖志 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 徐 雯

【目的】

アナフィラキシーは肥満細胞上の Fc 受容体に IgE が結合することによって誘導される脱顆粒が原因となって引き起こされる全身性の重篤で生命に関わるアレルギー性過敏反応である。重篤で生命に関わる疾患であるが故に、アナフィラキシーに対する予防法を開発することは重要であり、現在その一つの方法として、減感作療法が有効であると考えられている。

CpG-ODN は結核菌などの細菌のゲノム DNA の特徴的な配列でメチル化されていないシトシン、グアニンの連続した塩基配列 (CpG モチーフ) が繰り返されており、免疫賦活作用を有していることが知られている。一方で、哺乳類のゲノム DNA では CpG モチーフの頻度が少なく、また高頻度にメチル化されているために免疫賦活作用はない。

Toll-like Receptor (TLR) は細胞外領域にタンパク質間の相互作用に関わるモチーフであるロイシンリッチリピートを、細胞内領域に IL-1 Receptor の細胞内領域と相同性を持つ TIR 領域を持ち細菌、真菌、寄生虫、ウイルスなどの様々な病原体を感知する受容体であり、自然免疫を調節するのみならず、自然免疫と獲得免疫の橋渡しとして重要な役割を果たしている。近年の研究により、CpG-ODN の免疫賦活作用が樹状細胞、マクロファージ、NK 細胞、B 細胞に発現し

ている TLR9 を介して発揮されることが明らかになっている。

生体内での特異抗原に対する防御機能として獲得免疫が誘導される。獲得免疫は CD4⁺ Th1 細胞によって調節される細胞性免疫と CD4⁺ Th2 細胞によって調節される液性免疫に大別される。Th1、Th2 細胞はそれぞれ相互に作用を抑制する働きがあり、生体内での Th1、Th2 バランスが疾患の制御に重要であると考えられている。

CpG-ODN は、抗原提示細胞として機能するマクロファージや樹状細胞に発現する TLR9 を介し、IL-12、IL-18、IFN- γ などの Th1 反応を誘導するサイトカインの産生を誘導することで Th1 優位な免疫環境を惹起する。この作用から Th2 反応である喘息やアレルギー性結膜炎などのアレルギーを改善する効果を有していることが報告されている。

本研究は、CpG-ODN が全身性の即時型過敏反応に対して有効な防御効果を有しているかを明らかにすること、また有効である場合にはその機構を明らかにすることを目的とした。

【方法、結果及び考察】

まず、OVA で誘導するマウスアナフィラキシーモデルを樹立した。300 μ g の OVA を 2×10^9 個の百日咳菌と共に 1 mg の水酸化アルミニウムゲル(alum)に懸濁し、C57BL/6 腹腔内に免疫した(抗原感作)。免疫 12 日後の血中の OVA 特異的 IgE 濃度を ELISA にて測定した結果、顕著な IgE が検出された。さらに、14 日後に 100 μ g の OVA を静脈注射したところ(攻撃接種)、急激な体温の低下が見られ、アナフィラキシー症状は麻痺や引きつけを伴う重篤なショック症状を示すレベル 3 から致死に至るレベル 4 を示した。さらに血中のヒスタミン濃度を ELISA にて、血管の透過性をエバンスブルーの静脈注射によって検討した結果、いずれの測定値も亢進が見られ、典型的なアナフィラキシーであることを確認した。

そこで、この OVA 特異的アナフィラキシーに対する CpG-ODN の予防効果を検討した。CpG-ODN と OVA を PBS に懸濁し、C57BL/6 マウス腹腔内に免疫した。初回免疫 7 日後に追加免疫を行い、初回免疫 14 日後に前述の方法を用いてアナフィラキシーを誘導した。その結果、CpG-ODN と OVA で 2 回前処置を施すと、無処置のマウスや、OVA 単独処置、免疫賦活作用のない non-CpG-ODN と OVA 処置、CpG-ODN 単独処置に比べ、血中 IgE 濃度、アナフィラキシー症状、体温、血中のヒスタミン濃度、すべてに測定値において劇的な改善が見られた。

CpG-ODN は TLR9 と結合し、アダプター蛋白である MyD88 を介してシグナルを伝達することが知られている。そこで、CpG-ODN による OVA 特異的アナフィラキシーの軽減効果が MyD88 を介して誘導されているかを MyD88 欠損 C57BL/6 マウスを用い検討した。その結果、MyD88 欠損マウスでは CpG-ODN による軽減効果が

完全に消失することから CpG-ODN が TLR9 と結合し MyD88 を介して軽減効果を発揮していることが示された。

CpG-ODN は抗原提示細胞を活性化することで Th1 免疫反応を惹起できることが知られている。そこでまず、骨髄由来樹状細胞に対する CpG-ODN の効果を *in vitro* にて検討した。その結果、CpG-ODN 刺激を行うと骨髄由来樹状細胞上の CD40、CD80、CD86 の発現の上昇及び IFN- γ や IL-12p40 産生が誘導されたことから、CpG-ODN 刺激が骨髄由来樹状細胞の活性化及び成熟化を誘導していることが明らかになった。

そこで、CpG-ODN と OVA で前処置したマウスの脾臓細胞における OVA 特異的サイトカイン産生を検討した。前処置 14 日目にマウスより脾臓細胞を摘出し、OVA で刺激を行い上清中に含まれる IFN- γ を ELISA にて測定した結果、OVA 単独免疫では見られなかった IFN- γ 産生が見られた。さらに、CpG-ODN と OVA で前処置したマウスを感作し、感作 7 日後にマウス脾臓を摘出し、OVA で刺激を行い脾臓細胞が産生するサイトカインを ELISA にて検討した結果、未処置群では IL-4 産生が誘導されるのに対し、CpG-ODN と OVA 前処置群では IFN- γ の産生のみが検出された。また、感作 12 日後の血清中の OVA 特異的 Ig 産生を ELISA にて検討した結果、未処置マウスでは IgE が検出されるのに対し、CpG-ODN と OVA 前処置群では IgG2a が検出された。以上のことから、CpG-ODN と OVA 前処置によって感作による OVA 特異的免疫反応が Th2 優位な反応から Th1 優位な反応へと転化することが明らかになった。

そこで、アナフィラキシーの軽減効果が CpG-ODN で誘導された Th1 免疫反応に起因しているかを検討した。Th1 免疫反応の誘導には IFN- γ が重要な役割を果たしている。そこで、IFN- γ 欠損マウスを用いて検討した。IFN- γ 欠損マウスを CpG-ODN と OVA で 2 回前処置し、アナフィラキシーを誘導すると、野生型マウスと比べ、血中の IgE 濃度、アナフィラキシー症状、体温、血中ヒスタミン濃度、すべての測定値で野生型マウスとの間に優位な差は見られなかった。このことから、CpG-ODN によって誘導される IFN- γ 産生はアナフィラキシーの軽減に重要な役割を果たしていないことが明らかになり、CpG-ODN によるアナフィラキシー軽減には Th1 免疫反応が必須ではないことが示唆された。

TLR9 は樹状細胞だけではなく、B 細胞にも発現している。CpG-ODN は B 細胞に作用して転写調節因子 T-bet の発現を誘導することが報告されている。また、B 細胞における T-bet の発現は IgG2a へのクラススイッチを誘導することが知られている。そこで、CpG-ODN の B 細胞への影響を *in vitro* で検討した。抗 CD40 抗体と IL-4 刺激で誘導される脾臓細胞由来ナイーブ B 細胞の IgG1 及び IgE 産生に対する CpG-ODN の影響を ELISA 及び細胞染色法にて検討した。その結果、CpG-ODN 処理によって抗 CD40 抗体と IL-4 刺激で誘導される IgG1 及び IgE の産

生が阻害されるのに対し、IgM の産生量はむしろ増加していた。このことから、CpG-ODN は B 細胞に発現している TLR9 を介して IgM から IgG1 及び IgE へのクラススイッチを阻害することで、IgG1 及び IgE の産生を阻害していることが示唆された。

CpG-ODN はその塩基配列と修飾状態から 2 種類のタイプに大別される。A 型は 5' 末端、3' 末端に polyG を有し、その G のみが S 化修飾 (P=0 から P=S へと置換) されており、NK 細胞を活性化する。これまでの検討に用いた CpG-ODN は B 型に区分され、すべての塩基が S 化修飾されており、5' 末端と 3' 末端に poly-G 配列を持たず、B 細胞を活性化することが報告されている。また、いずれの型も骨髄系樹状細胞の活性化し、IL-12 産生を誘導するが、A 型は形質細胞様樹状細胞を活性化し、IFN- α 産生を誘導するのに対し、B 型は IL-12 産生を誘導することが知られており、同じ TLR9 を介してもその機能発現が異なることが知られている。そこで、OVA で誘導されるアナフィラキシーに対する効果を比較検討した。OVA で誘導されるアナフィラキシーに対する軽減効果は血中 IgE 濃度、体温、アナフィラキシー症状、血中ヒスタミン濃度いずれの測定値においても B 型の方がわずかに軽減効果が優れていたが、有意差は見られなかった。さらに *in vitro* での抗 CD40 抗体と IL-4 刺激で誘導される脾臓 B 細胞の IgE 及び IgG1 産生阻害効果も有意差は見られなかった。このことから、CpG-ODN のアナフィラキシー軽減効果はいずれの型も有していることが示された。

以上をまとめると、CpG-ODN は TLR9 を介して抗原提示細胞を活性化することによって OVA 特異的 Th1 型免疫反応を誘導できるものの、CpG-ODN は直接 B 細胞に作用して IgM から IgE へのクラススイッチを阻害することで IgE によるアナフィラキシーを阻害していることが示唆された。

(3950 字)