

## 論文の内容の要旨

論文題目     アレルギー疾患成因機構における  
                  T細胞発現遺伝子 MAL と単球発現遺伝子の役割

氏     名     長田 直子

アトピー性皮膚炎、アレルギー性喘息、花粉症は年々罹患率が上昇して大きな問題となっている。また、体質保因者も増加しており、さらなる増加が予想される。その一方で、効果的な対処法は確立されていない。アレルギー性疾患には環境や遺伝など、多様の因子が関与し、遺伝的要素においては複数の遺伝子が複雑な免疫システムを構築しており、またすべての患者で共通の遺伝子が関与しているとも限らず、これらの要因が病態の解明を困難にしていると考えられる。アレルギー患者では、健常人では認められない抗原に対する過敏な炎症反応が惹起され、抗原に対する免疫応答には血中の細胞が重要な役割を担っている。従って、末梢血単核球（PBMC）に発現する遺伝子につき、健常人、患者における発現レベルを比較することにより、病態に関連する遺伝子・遺伝子群を見出すことができる可能性がある。そこで、それらアレルギー性疾患の発症や病態に関連して特異的な発現を示す遺伝子を定量的 PCR 法、オリゴヌクレオチドアレイ法のトランスクリプトーム解析技術を駆使して探索した。

GeneChip による遺伝子解析の結果、無刺激条件下の単球において健常人と患者の発現量に差が認められる遺伝子がいくつか存在した。そこで、それらの

遺伝子につき、複数の検体での比較を行う目的で、健常人 10 名、患者 30 名の CD14 陽性細胞（単球）から total RNA を抽出し、定量的 PCR (ABI7700, Applied Biosystems) を行い mRNA 発現量の比較を行ったところ、*CD36*、*ERCC4*、*Legumain* が有意に患者群で発現が亢進しており ( $p < 0.05$ )、また、*Proteasome activator 28-beta (PA28 $\beta$ )* の発現が患者群において高い傾向が認められた。さらに、これらの遺伝子と機能的に関連していると考えられる既知遺伝子およびアレルギーとの関連に興味を持たれる遺伝子について、同様に mRNA 発現定量を行った。その結果、MHC class I 抗原提示に関与する遺伝子  *$\beta$ 2-microglobulin* や innate immunity に関与する *Toll-like receptor* 遺伝子等が患者群において有意に発現が亢進しており、また MHC class II の抗原結合部位を塞ぐ *Invariant chain* の発現は中等症・重症の患者で有意に発現が低下していた (図 1)。これらの統計解析結果より、アレルギー疾患患者の単球では抗原処理能が活性化している可能性が示された。さらに、検討した遺伝子につき、クラスタリングや相関性によって解析した結果、発現プロファイルは高い相関性を示しており、遺伝子発現のネットワークが存在することが示唆された。

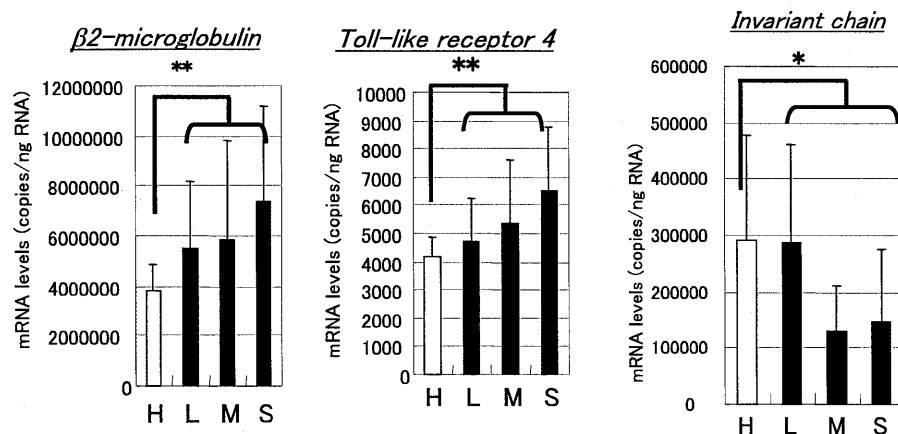


図 1 健常人群と患者群との発現量に差の認められた遺伝子。

H: 健常人、L: 軽症、M: 中等症、S: 重症 (各 n=10)。

一方、GeneChipによる遺伝子解析の結果、ダニ抗原刺激後に患者T細胞で健常者よりも発現が上昇する遺伝子 *T-lymphocyte maturation-associated protein (MAL)* を見出した。さらに健常者 18 名、アレルギー疾患患者 19 名の末梢血PBMCを用いてダニ抗原刺激を行い、total RNAを抽出して定量的PCR法によって発現量を検討したところ、*MAL*の発現はダニ抗原刺激時に健常者及び患者の抗ダニ特異的IgE陽性試料において特異的に発現が上昇することが

判明した ( $p < 0.01$ )。この時、ダニ特異的IgE陽性者では培養上清中にIL-4 量が多く検出された。また、*IL-4 receptor  $\alpha$* の発現プロファイルはMALの発現と酷似し、非常に強い正の相関 ( $r = 0.95$ ) が認められた。さらに、MALはT細胞で特異的に高い発現が認められ、末梢血培養T細胞プラストをIL-4 で刺激するとMALのmRNAが誘導されることが見出された。

次に、ダニ抗原刺激による MAL 発現亢進がIL-4 依存性かどうかを確認するため、健常人および患者由来の PBMC に対し抗 IL-4 抗体存在下でダニ抗原刺激を行った。その結果、患者 PBMC におけるダニ抗原刺激による MAL の発現誘導は抗 IL-4 抗体により抑制された (図 2)。以上の結果より、抗原提示細胞から提示された抗原に対してダニ抗原特異的なT細胞が反応しIL-4 が産生され、その IL-4 がT細胞において MAL 遺伝子のmRNA 発現を誘導することが示唆された。

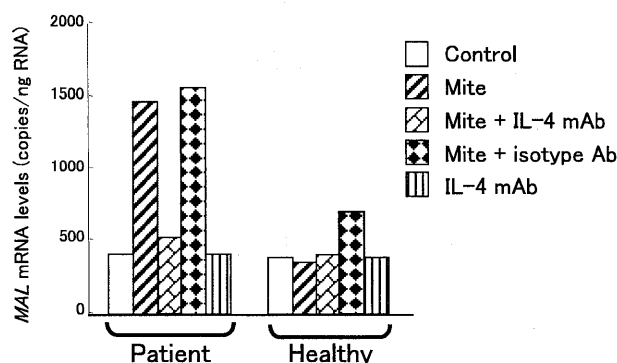


図 2 IL-4 刺激による MAL 発現誘導に与える抗 IL-4 抗体の影響

PBMC を各種刺激剤存在下で培養後、Total RNA を抽出し、MAL の発現量を測定した。

MAL 蛋白はT細胞からクローニングされた疎水性が非常に高い4回膜貫通型の膜蛋白質であり、ヒトT細胞膜のGlycolipid-enriched membrane (GEM) microdomains いわゆるラフトに存在することが報告されている。ラフトは細胞膜上の界面活性剤不溶性の複合体であり、シグナル伝達や免疫シナプスの形成において非常に重要な役割を担う。ヒト末梢血T細胞プラストをIL-4刺激して抗MAL抗体でMALの蛋白を検出したところ、IL-4刺激した場合にラフト画分にMAL蛋白の強い発現が認められた。従って、ダニ抗原刺激を受けた場合にも、T細胞のラフト上にMAL蛋白が誘導されていると考えられた。次に、レトロウイルスベクターを用いてヒト末梢血T細胞へMALを強制発現させ、MALのラフト分子への影響をウエスタンブロッティングにより検討した。その結果、MAL導入細

胞のラフトにはコントロールと比較して強い CD3 $\zeta$  蛋白バンドが認められた。CD3 $\zeta$  は T 細胞受容体のシグナル伝達に必須の分子であり、刺激によりリン酸化された CD3 $\zeta$  はラフトに多く存在することが報告されている。これらの結果より、抗原刺激により IL-4 が放出されると、MAL の発現が上昇し、CD3 $\zeta$  をラフトへ集積させて、TCR シグナルの CD3 $\zeta$  を介した細胞内への情報伝達を促進している可能性が考えられた。

本研究で見出された遺伝子にはいずれもアレルギー疾患患者で認められる過剰な免疫応答反応との関連が考えられた。アレルギー疾患は多因子疾患であることに加え、遺伝子発現量は個人差が大きい、遺伝子を群としてとらえることにより、発現傾向の特徴を見出すことが出来、本結果より、患者の単球はアレルギー疾患に伴うなんらかの刺激を受けて、抗原提示細胞へとプライミングされている可能性が示唆された。つまり、患者の単球は、常に抗原に関して応答する準備段階にあり、抗原刺激を受けた際には複数の遺伝子変異が相互作用し合い、炎症反応が増幅されることで特有の異常な過敏反応が引き起こされていると考えられた。こうしたアレルギー疾患に関連した遺伝子機能から予測される免疫応答システムの解明は疾患の解明に貢献するものである。

また、抗原刺激時の発現傾向についての解析は、特に免疫応答の際に健常人と患者との間で生じる差についての情報を得ることが出来る。これにより、本検討では T 細胞のシグナル伝達を活性化している可能性のある遺伝子 MAL を見出した。抗原刺激時に IL-4 の放出量が多い患者 T 細胞では、MAL が発現亢進して CD3 $\zeta$  をラフトに集積させ、そのために T 細胞のシグナル伝達が促進され、T 細胞の細胞分化やサイトカイン放出を誘導し、過剰の免疫応答を引き起こしていると考えられた。また、アレルギー性疾患の成立に深く関与している IL-4 によって誘導される MAL は IL-4 と同様にアレルギー性疾患の成立に深く関与し、Th2 サイトカインの産生や Th2 への分化を促す作用を持つ可能性があると考えられた。

これらの遺伝子は、診断マーカーとしての応用が期待され、重篤度の判断、Th2 分化、IL-4 の作用等の判断に役立つことが可能である。さらに、末梢血採取は容易であり、患者負担も少なく小児患者にも適用できるという利点があり、アトピー性および薬剤応答性の診断に加え、成長により症状が寛解するかを予測できる可能性があり、診断ならびに治療指針に貢献できると考えられる。今後、診断応用のためにゲノムワイドな発現研究が進められる際、見出された遺伝子も含めた発現解析が、臨床上有用な情報を得るために役立つと考えられる。