

Title	Mucosal Immunogenicity of Eschericia coli Labile Toxin : Oral Immunization of Recombinant B subunit induces Early Th 1 and Late Th 2 Cytokine Expression in Peyer's Patches
Author(s)	中川, 一路
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39815
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【2】

氏名	なか がわ いち ろ 中 川 一 路
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 1 2 4 3 1 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	Mucosal Immunogenicity of <i>Escherichia coli</i> Labile Toxin : Oral Immunization of Recombinant B subunit induces Early Th 1 and Late Th2 Cytokine Expression in Peyer's Patches (細菌毒素による消化管関連 T 細胞サブセットの選択・分化とその機能)
論文審査委員	(主査) 教 授 浜田 茂幸
	(副査) 教 授 雫石 聰 助教授 大嶋 隆 講 師 村上 伸也

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

口腔をはじめとする一連の消化管は、ヒトが最初に大量の異物と接触し、また絶え間のない微生物感染の場である。口腔を含む消化管粘膜では循環器を介する全身系とは異なる独特の免疫応答が引き起こされる。例えば分泌型の IgA は、粘膜分泌液中に高濃度に含まれ、粘膜面での防御に役立っているが、血液中では低濃度にしか認められない。これは消化管の粘膜関連リンパ組織が胸腺や骨髄とは異なった免疫中枢として機能分化しているためと考えられている。最近、消化管が胸腺外 T 細胞分化の重要な場であることが示唆されており、また、B 細胞についても消化管で抗原と接触することにより分化・成熟することが明らかにされた。

病原性 *Escherichia coli* 感染に際して重要なビルレンス因子とみなされる易熱性毒素 (LT) は、通常の食餌性タンパク質とは異なり、体液性免疫応答を誘発する。LT は抗毒素抗体の産生のみならず、毒素と共に経口投与した別種のタンパク質に対する体液性免疫をも亢進させることが報告されている。しかし、LT を経口投与した場合に、消化管リンパ節で展開される T 細胞レパトアの選択や分化のプロセス、さらに B 細胞との相互作用については謎のままである。本研究は、LT をモデル抗原として、分泌型 IgA の合目的誘導制御のしくみを正常およびパリエル板欠損マウスを用いて、おもに T 細胞レパトアの選択・分化を中心に細胞生物学的に解析した。

【研究方法】

1. 抗原の精製：ヒトより分離された *E. coli* の LT 遺伝子のうち、抗原性を有する B サブユニットをコードする LT-B 遺伝子を高発現ベクターに組み換え、isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG) 存在下で LT-B を大腸菌に発現させ、その菌体破砕物よりカラムクロマトグラフィーを用いて分離精製した。精製 LT-B は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動と、抗 LT-B 抗体を用いたウエスタンブロットにより 11.6 kDa の単一バンドを示すことが確認された。

2. 免疫法：得られた LT-B を 25 μ g ずつ、ハプロタイプの異なる BALB/c マウス (H-2^d) および C57BL/6 マウス (H-2^b)、さらにパリエル板を欠如する ALY マウス (*aly/aly*; H-2^b) に 1 回経口投与し、血清中および糞便中の LT-B 特異的抗体価を、経時的にサブクラス別に ELISA 法にて測定した。

3. 抗原特異的な増殖刺激の測定：BALB/c マウスに同上の方法で免疫し、パリエル板から CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞をパンニング法により分離し、抗原提示細胞と抗原と共に培養し、経時的に [³H] チミジンの取

り込みを測定した。

4. 抗原特異的サイトカイン発現の測定：LT-Bで経口免疫したBALB/cマウスのパイエル板CD4陽性T細胞を抗原提示細胞と抗原とともに培養し、経時的にRNAを抽出し、サイトカイン特異的プライマーを用いて、Reverse transcription (RT)-PCR法によりその発現を検討した。さらに、サイトカインmRNAの発現量は、内部標準相補RNAの存在下でRT-PCR法で増幅したPCR産物を分析し定量化した。

5. LT-B特異的T細胞クローンの樹立：上記の方法でパイエル板CD4陽性T細胞を抗原提示細胞と抗原とともに培養し、限界希釈法によりLT-B特異的なT細胞クローンを樹立した。各T細胞クローンは、フローサイトメトリーによりその表面抗原を解析し、またRT-PCR法によりそのサイトカイン遺伝子の発現を測定した。

6. T細胞クローンによるB細胞活性化の測定：確立したT細胞クローンまたはその培養上清のB細胞のポリクローナル抗体産生に対する影響を調べるため、B細胞培養系にこれらを加え、上清中に産生される抗体をサブクラスおよびアイソタイプ別にELISA法にて測定した。

【結果と考察】

LT-Bをマウスに経口投与すると、BALB/cおよびC57BL/6マウスでは、免疫後2週目で、LT-B特異的な血清IgGと糞便中の分泌型IgAの著しい産生増強が認められた。しかし、パイエル板を欠損したALYマウスでは、わずかにIgM抗体の産生が認められるものの、LT-B特異的な抗体産生はほとんど認められなかった。そこで、BALB/cマウスのパイエル板T細胞を分離し、試験管内で抗原刺激を加えたところ、CD4陽性T細胞のみが、経時的に増殖していることが明らかとなった。RT-PCR法によりこのCD4陽性T細胞のサイトカインプロファイルを解析すると、インターフェロン(IFN)- γ 、インターロイキン(IL)-2、4、5、6の産生が増強されており、Tヘルパー(Th)1およびTh2タイプ双方のCD4陽性T細胞が活性化されていた。さらにこの発現量を定量的に解析すると、培養3日目でまずTh1タイプが、さらに6日目でTh2タイプのサイトカイン遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。次に限外希釈法を用いてLT-B特異的T細胞クローンの樹立を試み、3個のクローンが分離された。IL-2存在下で樹立したこれらのクローンは、サイトカイン特異的ELISA法およびRT-PCR法によりいずれもIFN- γ のみを強く発現すること、また、フローサイトメトリーによる表面抗原の解析により、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻、B220⁻の性質を示しヘルパーT細胞であることを明らかにした。つぎに、試験管内でリポ多糖(LPS)で刺激を加えたB細胞に各クローンまたは培養上清を加えると、いずれのクローンにおいてもポリクローナルIgG2aの産生量がLPS単独刺激のB細胞と比較して約300倍以上に増加し、また、この系に抗IFN- γ 抗体を加えると、IgG2aの産生が抑制されることが示された。

以上の結果より、パイエル板はタンパク抗原を経口的に摂取した場合、それに対する抗原抗体反応が最初に起こる場として最も重要な働きを担っていることが明らかとなった。さらに、LT-Bは腸管パイエル板のCD4陽性T細胞を特異的に活性化し、活性化CD4陽性T細胞のTh1およびTh2双方を介することによりB細胞に抗原特異的な抗体産生を促し粘膜免疫応答を行っていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、経口的に投与された抗原に対する粘膜面への特異抗体の誘導機序について、大腸菌の産生する易熱性毒素(LT-B)をモデル抗原として、免疫学および細胞生物学的に検討したものである。

その結果、LT-Bを経口的に投与すると、腸管パイエル板に存在するTh1およびTh2型のヘルパーT細胞が顕著に活性化され、これらの細胞の産生するサイトカインを介してLT-B特異抗体が粘膜面へ効率的に誘導されることを明らかにした。この業績は、消化管における粘膜免疫機構の一端を明らかにしたものとして評価でき、博士(歯学)の学位請求に値するものと認められる。