


(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

The Nucleotide Sequence of Dinitrophenyl-Specific IgE and FcεRI α-Subunit Obtained from FE-3 Hybridoma Cells

(FE-3細胞由来のdinitrophenyl特異的IgE抗体及びFcεRI αサブユニットの塩基配列の決定)

氏名 渡辺 次 賀 博 

(直筆)

[	目	的	]	I	型	ア	レ	ル	ギ	ー	の	病	態	形	成	の	解	明	及		
び	治	療	戦	略	の	構	築	の	た	め	に	は	,	ラ	ット	を	用	い			
た	I	型	ア	レ	ル	ギ	ー	の	動	物	実	験	モ	デ	ル	で	の	IgE	の		
測	定	は	必	要	不	可	欠	で	あ	る	。	従	来	ア	レ	ル	ギ	ー	研		
究	に	用	い	ら	れ	て	い	た	ラ	ット	IgE	は	,	IR162	ミ	エ	ロ				
ー	マ	細	胞	由	来	の	IgE	で	あ	り	,	抗	原	特	異	的	IgE	で	は		
な	い	。	従	っ	て	,	I	型	ア	レ	ル	ギ	ー	の	病	態	生	理	学		
的	研	究	で	の	IgE	の	意	義	性	を	論	じ	る	の	に	は	問	題	が		
あ	っ	た	。	花	城	ら	は	,	dinitrophenyl-conjugated	<i>Ascaris suum</i>	(DNP										
-As)	抗	原	を	感	作	し	た	Brown-Norway	ラ	ット	の	脾	細	胞	と						
マ	ウ	ス	ミ	エ	ロ	ー	マ	細	胞	(Sp2/0-Ag14/SF)	を	融	合	し	,						
DNP	特	異	的	IgE	抗	体	を	産	生	・	分	泌	す	る	FE-3	細	胞				
を	作	製	し	,	さ	ら	に	ELISA	法	に	よ	る	抗	原	特	異	的	IgE			
の	測	定	法	を	確	立	し	た	。	本	研	究	で	は	,	FE-3	細	胞			
由	来	の	抗	原	特	異	的	IgE	(IgE FE-3)	と	IR162	由	来	の	IgE						
(IgE IR162)	の	構	造	の	違	い	を	明	ら	か	に	す	る	た	め	に	,				
と	り	わ	け	高	親	和	性	IgE	受	容	体	(FcεRI)α	サ	ブ	ユ	ニ	ツ				
ト	へ	の	相	互	作	用	に	関	与	す	る	CH3	,	CH4	ド	メ	イ				
ン	の	同	定	を	行	う	た	め	に	,	IgE FE-3	の	cDNA	の	塩	基					
配	列	決	定	を	目	的	と	し	た	。	ま	た	,	FE-3	細	胞	か	ら			

の IgE 分泌量が外在性に添加した IgE 量に反比例して減少することより、FE-3 細胞膜上の IgE レセプターまたは IgE 結合蛋白の存在が示唆されており、本研究では FE-3 細胞での FcεRI の発現に関して、FcεRIα サブユニットの cDNA の塩基配列決定を行った。

[ 方法 ] IgE FE-3 及び FcεRI α サブユニットの cDNA 断片を増幅するために、既に報告されている IgE ( IR162 ) 及びマウス FcεRI α サブユニット塩基配列から、特異的プライマーを作製し、逆転写 polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により目的 cDNA を増幅した。すなわち、抽出した total RNA を逆転写酵素とオリゴ (dT) 配列を含む合成プライマー (RT-1) を用いて total RNA から 1 本鎖 cDNA を合成し、IgE FE-3 または FcεRI α サブユニット特異的プライマーを用いて Taq DNA ポリメラーゼにより PCR を行った。増幅後アガロース電気泳動を行い、目的の DNA バンドをゲルから抽出した。Sanger らの方法に基づく dideoxy nucleotide chain termination 法により、塩基配列の決定を行った。

[ 結 果 ]	CH3	,	CH4	ド	メ	イ	ン	塩	基	配	列	の	IgE						
FE-3	と	IgE	IR162	の	相	同	性	は	100	%	で	あ	っ	た	。	一			
方	,	FE-3	細	胞	に	発	現	す	る	FcεRI	α	サ	ブ	ユ	ニ	ッ	ト	の	
塩	基	配	列	と	マ	ウ	ス	FcεRI	α	サ	ブ	ユ	ニ	ッ	ト	と	の	相	同
性	は	100%	で	あ	っ	た	。	ま	た	,	β-actin	cDNA	は	ラ	ッ	ト			
お	よ	び	マ	ウ	ス	由	来	の	塩	基	配	列	で	あ	っ	た	。		
[ 考 察 ]	IgE	FE-3	の	CH3,CH4	ド	メ	イ	ン	遺	伝	子	は	ラ						
ッ	ト	の	脾	臓	細	胞	由	来	で	あ	り	,	FcεRI	α	サ	ブ	ユ	ニ	ッ
ト	遺	伝	子	は	マ	ウ	ス	ミ	エ	ロ	ー	マ	細	胞	由	来	で	あ	る
と	考	え	ら	れ	た	。	IgE	FE-3	と	FcεRI	α	サ	ブ	ユ	ニ	ッ	ト	の	
mRNA	が	FE-3	細	胞	で	発	現	す	る	と	い	う	結	果	は	,			
FE-3	細	胞	か	ら	分	泌	さ	れ	た	IgE	が	FE-3	細	胞	膜	上	の		
IgE	レ	セ	プ	タ	ー	と	の	相	互	作	用	を	介	し	て	FE-3	細	胞	
の	IgE	分	泌	を	調	節	し	て	い	る	可	能	性	を	示	唆	す	る	も
の	で	あ	る	。	今	後	は	FE-3	細	胞	膜	上	の	FcεRI	蛋	白	発		
現	を	証	明	し	,	IgE	と	IgE	レ	セ	プ	タ	ー	の	相	互	作	用	に
起	因	す	る	outside-in	の	シ	グ	ナ	ル	伝	達	機	序	を	明	ら	か		
に	す	る	予	定	で	あ	る	。											

# 論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏名	渡慶次 賀博
論文審査委員	平成 15 年 / 月 30 日			
	主査教授	田 中 勇 悦 (印)		
	副査教授	佐 藤 良 也 (印)		
	副査教授	渡 部 久 実 (印)		

(論 文 題 目)

The Nucleotide Sequence of Dinitrophenyl-Specific IgE and FcεRI α-Subunit Obtained from FE-3 Hybridoma Cells

(FE-3細胞由来のdinitrophenyl特異的IgE抗体及びFcεRI αサブユニットの塩基配列の決定)

(論文審査結果の要旨)

上記論文に対して、研究に至る背景と目的、論文の内容、特に、実験方法、手技と学術的水準、研究の成果とその意義について慎重に審査し、以下の審査結果を得た。

1. 研究の背景と目的

I型アレルギーの病態形成におけるIgEの役割の解明は、I型アレルギーの治療戦略を構築する目的において重要である。従来のラットI型アレルギー動物実験モデルで用いられていたラットIgEは、IR162ミエローマ細胞由来であり、反応する特異抗原は不明であった。従って、I型アレルギーの病態生理学的研究におけるIgEの役割性を論じるには不十分であった。そこで、花城らは、dinitrophenyl基(DNP)特異的IgEを産生するハイブリドーマ細胞、FE-3、をマウスミエローマ細胞とDNP-conjugated *Ascaris suum* 抗原感作 Brown-Norway ラット脾細胞との細胞融合により樹立した。当教室においてこれまでに、FE-3細胞由来のIgE(IgE FE-3)を用いて、ラットでのIgE生体内動態、IgE刺激によるラット腹腔内由来肥満細胞からのVEGF分泌促進とVEGFによるIgEの血管内皮細胞透過性の亢進が明らかにされている。しかしながら、IgE FE-3のイムノグロブリン構造等の詳細は未だ不明であった。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
  - 2 要旨は800字・1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。

本論文では、FE-3 細胞由来の DNP 特異的 IgE (IgE FE-3)と IR162 由来の IgE (IgE IR162)の構造の違い、とりわけ高親和性 IgE 受容体(FcεRI) αサブユニットへの結合に関する CH3、CH4 ドメインの同定を行うために、IgE FE-3 の cDNA の塩基配列決定を目的としている。また、FE-3 細胞から分泌された IgE が FE-3 細胞膜上の何らかの IgE レセプターと結合し IgE 産生を自己調節する可能性が示唆されることから、FE-3 細胞における FcεRIαサブユニットの発現を mRNA レベルで検討している。

## 2. 論文の方法と内容

1) DNP 特異的 IgE を産生するハイブリドーマ細胞 (FE-3) の培養を行い、細胞数  $1 \times 10^6$  個の FE-3 細胞から RNA を抽出し、オリゴ dT プライマー存在下に逆転写反応を行い、FE-3 細胞で発現する mRNA より cDNA ライブラリーを作製している。

2) PCR 反応により、ハウスキーピング遺伝子の一つであるβ-actin 遺伝子 (塩基配列部位 794-1198) と IgE CH3,CH4 ドメイン部分をコードする cDNA (1179-1765) を増幅している。PCR 反応に用いたプライマーは既に明らかにされているマウスβ-actin 遺伝子 (DDBJ 登録番号 X03672) 及びラット IgE 遺伝子 (DDBJ 登録番号 J00744) の塩基配列を基に作製されたものである。得られた PCR 産物より目的とする cDNA バンドをアガロースゲルから抽出し、ジデオキシ法によりその塩基配列を決定している。

3) FcεRIαサブユニット mRNA の発現の検討も同様に RT-PCR 法で行われている。FcεRIαサブユニット細胞外ドメインをコードする cDNA 部分を PCR 増幅の標的とし、ラットの FcεRIαサブユニット遺伝子 (DDBJ 登録番号 J03606) の塩基配列を基に作製したプライマーで増幅すると、複数の非特異的バンドが見られた。そこで、さらに下流側の塩基配列を標的とする nested センスプライマーを用いて nested PCR を行っている。さらに、他のプライマーをマウス由来の塩基配列 (DDBJ 登録番号 J05018) より新たに作製し直し、nested PCR を行っている。

## 3. 研究成果

本論文は、1) FE-3 細胞では、マウス及びラット由来の両方のβ-actin 遺伝子が発現していること、2) IgE FE-3 の CH3、CH4 ドメインは、IgE IR162 の CH3、CH4 ドメインと塩基配列が完全に一致すること、3) FcεRIαサブユニット遺伝子が発現し、遺伝子配列はマウスのそれと完全に一致すること、を明らかにしている。これらの実験結果から、FE-3 由来の IgE 単クローン抗体の CH3、CH4 ドメインがラット由来のものであり、ラットの I 型アレルギー動物実験モデルで、IgE FE-3 を用いての病態生理学的研究の妥当性が示された。また、FE-3 細胞では、FcεRI が発現し、IgE 抗体産生抑制的に機能している可能性が示唆されることから、今後、細胞レベルでの IgE 産生制御機序の解明を目的とする研究に、FE-3 細胞が有用であることが示された。

以上の研究成果は、新たな視点から I 型アレルギー反応を研究するための基盤形成に寄与するものであり、本研究は学位授与に充分値する内容であると判断された。