

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	石井 香
学位授与の条件	学位規則第4条第1・②項該当		
論文題目 A human monoclonal IgE antibody that binds to MGL_1304, a major allergen in human sweat, without activation of mast cells and basophils (汗の主要抗原である MGL_1304 に、肥満細胞や好塩基球を活性化することなく結合するヒトモノクローナル IgE 抗体の同定)			
論文審査担当者			
主 査	杉山 英二	印	
審査委員	菅野 雅元		
審査委員	竹野 幸夫		
〔論文審査の結果の要旨〕			
【背景・目的】			
<p>汗はアトピー性皮膚炎（AD）の増悪因子として知られており、コリン性蕁麻疹（ChU）では発汗刺激により膨疹が出現する。我々は、これまで多くの AD および ChU 患者がヒト汗に対して即時型アレルギーを示し、その主要抗原がヒト皮膚に常在する <i>Malassezia globosa</i> が分泌する MGL_1304 であることを同定した。また、汗中の MGL_1304 と血清中の抗 MGL_1304-IgE の定量は、患者 IgE で感作された好塩基球もしくは肥満細胞によるヒスタミン遊離試験(HRT)および抗 MGL_1304 マウスモノクローナル抗体と精製 MGL_1304 を用いた ELISA により行ってきた。しかしこれらの方法では、IgE 濃度は標準患者血清を基準とした相対的濃度で表すしかなく、また汗中の MGL_1304 を検出するためには感度が不十分であった。</p> <p>本研究では、市販されているヒトモノクローナル IgE の一つ（ABS-IgE）が MGL_1304 に特異的に結合することを証明し、そのエピトープや結合特性を調べるとともに、MGL_1304 および抗 MGL_1304-IgE の測定に応用した。</p>			
【方法】			
<p>ABS-IgE の MGL_1304 に対する生化学的結合特性は、ELISA、ドットプロット、ウェスタンブロット、および表面プラズモン共鳴により解析した。MGL_1304 のヒスタミン遊離活性に対する中和活性は、AD 患者由来好塩基球を用いた HRT により検討した。また、ABS-IgE のヒト高親和性 IgE 受容体（FcεRI）に対する感作能は、健常人由来好塩基球と、ヒト FCERI 遺伝子を導入、発現させたラット肥満細胞株(RBL-48 細胞)を用いて検討した。</p>			
【結果】			
MGL_1304 をコートした ELISA プレートと、市販されている 4 種類のヒトモノクローナ			

ル IgE を用いた検討では、ABS 社製の 1 クローン (ABS-IgE) のみ IgE および MGL_1304 の各濃度依存性に結合した。またウェスタンブロットでは、ABS-IgE は MGL_1304 に一致する分子量の蛋白を認識し、MGL_1304 のリコンビナント蛋白断片を用いたドットブロットからは、ABS-IgE は MGL_1304 の 46~183 番目のアミノ酸配列を含む高次構造を認識することが示唆された。さらに表面プラズモン共鳴を用いた解析では、MGL_1304 に対する ABS-IgE の結合解離定数 (K_D 値) は 1.99 nM で、かなり親和性の高い結合であることが示された。

次に、患者血清中の MGL_1304 特異的 IgE 量を、標準 AD 患者血清 (1000 U/ml) に対する相対値から、IgE 重量濃度で表記するために ABS-IgE をスタンダード IgE とする ELISA を構築し、これまで標準 AD 患者血清に含まれる抗 MGL_1304-IgE 濃度を 32 ng/ml と算出した。

MGL_1304 量の測定では、従来 ELISA プレートに直接コートした MGL_1304 を抗 MGL_1304 マウスモノクローナル抗体により定量していたのに対し、本研究では抗 MGL_1304 モノクローナル抗体をプレートにコートし、ABS-IgE を検出抗体として用いるサンドイッチ ELISA を構築し、約 10 倍高い検出感度を得た。その結果、ヒト汗中に含まれる MGL_1304 量をほぼ正確に定量することができ、9 名のボランティアから採取した汗中には 0.6~8.0 ng/ml (3.76 ± 2.64 ng/ml, mean \pm SD) の MGL_1304 が含まれることを確認した。

さらに MGL_1304 を ABS-IgE とプレインキュベーションすると、ヒト汗中の 3 ng/ml の MGL_1304 のヒスタミン遊離活性の 50%以上が 30 ng/ml の ABS-IgE により抑制された。一方、乳酸処理により内因性 IgE を除いた健常人由来ヒト好塩基球、およびヒト Fc ϵ RI 発現ラット肥満細胞株の RBL-48 細胞を ABS-IgE で感作すると、いずれも抗 IgE 抗体には反応してヒスタミンを遊離したが、予想に反して MGL_1304 刺激には反応しなかった。

以上の結果から、本論文は ABS-IgE は、単体で MGL_1304 に特異的に結合し、MGL_1304 のヒスタミン遊離活性を中和するのみならず、好塩基球や肥満細胞の Fc ϵ RI に結合した状態で MGL_1304 に曝露されても細胞を活性化しないというユニークな性質を持つこと、そして、この特性は、高感度に MGL_1304 を測定するサンドイッチ ELISA、およびヒト血清中の抗 MGL_1304-IgE 濃度測定のための標準物質として利用できるとともに、今後、MGL_1304 の関与するアレルギー疾患治療薬のプロトタイプとして使用できる可能性を示した。以上の知見はアレルギー疾患の治療の進歩に寄与するところが大きいと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。