

欠損細胞ならびに EP₄ アンタゴニスト (ONO-AE3-208: 10⁻⁶ M) の共存下で培養した野生型細胞では認められなかったことから、EP₄ を介した反応であると考えられる。本研究によって、脳内 PGE₂ が、EP₄ を介してミクログリアにおける VEGF の発現を増強するように制御する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79: 1193-226, 1999
- 2) Nogawa S, Zhang F, Ross ME, et al. Cyclooxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci.* 17: 2746-55, 1997
- 3) Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, et al. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 1294-9, 2001
- 4) Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 11790-5, 2006
- 5) Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med.* 12: 225-9, 2006
- 6) Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, et al. Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J Neuroimmunol.* 184: 172-9, 2007
- 7) McCullough L, Wu L, Haughey N, et al. Neuroprotective function of the PGE₂ EP₂ receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci.* 24: 257-68, 2004

7) シラカバ花粉症に関わる末梢血 T 細胞の特異性と動態解析

研究代表者 佐藤 啓介

【目 的】

抗原暴露によって微少変動を示す末梢血中の抗原特異的 T 細胞を、V β 鎖を指標にした遺伝子発現解析を用いて特異的クローンを検出することを目的とした。

【方 法】

I. シラカバ花粉抗原/ペプチド刺激による末梢血 CD4⁺T 細胞の CDR3 領域遺伝子によるクローナリティ解析

末梢血より比重遠心法にて単核球を分離し、CD4⁺T 細胞を単離した。抗原ペプチド+放射線照射した抗原提示細胞を加え7日間培養後、T細胞より mRNA を抽出し 1st strand cDNA を作製した。それらを鋳型として 31 種類のヒト T 細胞受容体 β 鎖 (TCRVB) 特異的プライマーを用い、PCR にて増幅後、2% アガロースゲル電気泳動で分離した。目的のバンドを切り出し、遠心分離法を用いて遺伝子を溶出、クローニングベクターに組み込み、培地上のコロニーから 48 個の遺伝子クローンをランダムに選択し、CDR3 領域遺伝子配列を決定した。

II. シラカバ花粉症患者末梢血液中の CD4⁺T 細胞のクローナリティ解析

花粉飛散期の患者 5 名 (RAST スコア 3 以上) より末梢血単核球を比重遠心法で分離し、上記と同様の方法で TCRV β 鎖 CDR3 領域の遺伝子配列を決定した。

【結 果】

患者 P1 末梢血単核球のシラカバ花粉抗原刺激、シラカバ花粉主要抗原 Bet v1 の T 細胞エピトープ p141 ペプチド刺激で、CD4⁺T 細胞の V β レパートリー発現遺伝子解析では、VB21 の遺伝子バンドに特異的増幅がみられた。このクローナリティを解析した結果、花粉の粗抽出液、ペプチド抗原刺激に反応する共通するクローンとして、CASS(VB21) - PDQL(NDN) - BJ2-1* というクローン遺伝子 (以下クローン PDQL) を同定した (図 1)。花粉飛散時期における患者末梢

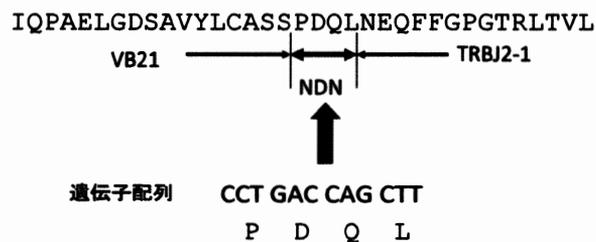


図 1 シラカバ花粉抗原/Bet v1 ペプチド刺激に反応したクローン PDQL における CDR3 領域のアミノ酸配列

血中 T 細胞の変動について検討するために、白樺花粉飛散期前後の 9 週間、毎週、患者 P1 より末梢血 CD4⁺T 細胞を分離し、その mRNA を抽出した。末梢血刺激により特異的増幅のみられた VB21 に着目し、その変動を遺伝子レベルで解析した。花粉飛散前 (4 月 7 日) に、特異的クローン (PDQL) は VB21 クロノタイプ中 5.88% みられた。さらに花粉飛散前の 4 月 21 日に 19.3% と上昇し、飛散期初期の 5 月 6 日には 70% に達した。5 月 19 日には 100% になったが、その 8 日後の 5 月 27 日には、24.2% と減少し、6 月 2 日には検出されなかった (図 2)。患者 P2 ~ P6 までの 5 名について、同様の方法で、VB21 クローナリティを解析し、クロノタイプの頻度を検討したところ、クローン PDQL は、患者 P3 (7.41%), P5 (11.29%) で増加がみられた (表 1)。

【考 察】

31 種類存在する T 細胞レパートリーの中で VB21 を有する T 細胞の頻度は、2.8-5.6% 程度である。そのため VB21 内でクローンの頻度が 10% 増加しても末梢血全体を用いた細胞レベル (FACS など) で T 細胞クローン増加を検出するのは難しい。今回検出した T 細胞クローン PDQL は、患者 P1, P3, P5 の末梢血中で花粉飛散期に増加していることが判明し、花粉症の発症・維持に関与していることが推察された。この実験系では、末梢血中の微少な特異的クローンとその変動、患者間共有クローンを同定することができた。今後、これらの T 細胞クローンを末梢血より分離し、詳細な機能と性質 (サイトカイン産生、細胞表面分子) を解析することにより、花粉症の診断、制御、治療にも役

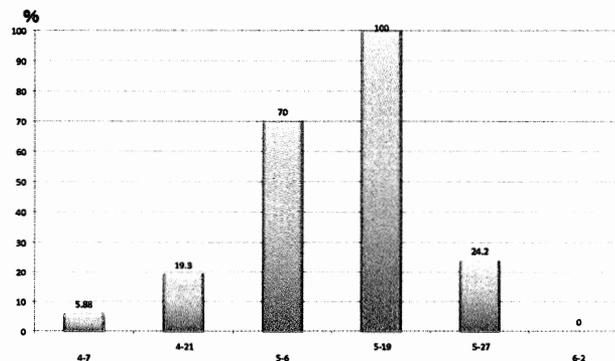


図 2 患者 P1 末梢血 CD4⁺T 細胞の VB21 レパートリー内 PDQL クローンの頻度

表 1 患者末梢血 T 細胞における VB21 のクローン (CDR3)

P2	%	P3	%	P4	%	P5	%	P6	%
LFSEGR	4.0	LIGAS	11.1	PRLAGVA	3.4	PGTD	29.0	LSFT	6.6
AFWGA	4.0	PDQL	7.4	FNFGLS	3.4	PDQL	11.3	LAAGP	4.9
		LVGGSVR	5.6	PSGLG	3.4			LDRAD	4.9
		LRTVG	3.7					LWDN	4.9
		LGGA	3.7					SSRG	4.9
		LVG	3.7					DDRQGS	3.3
								KGRGNA	3.3
								FLSGP	3.3
								LGGSG	3.3
								LGLA	3.3

立てることができると考えられる。