

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14230

研究課題名(和文) ペプチドアレイ解析技術を用いた免疫寛容誘導ペプチドの設計

研究課題名(英文) Design of immune tolerance inducing peptide using the peptide array analysis technique

研究代表者

大河内 美奈 (OKOCHI, Mina)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：70313301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドマイクロアレイは、多数のペプチドに対する相互作用解析を一度に実施できることから、抗体エпитープ解析等を行う上で有用である。本研究では、カゼイン免疫によりミルクアレルギーマウスモデルを作製し、血清中のIgE抗体エピトープをミルクタンパク質全6種類のアミノ酸配列に基づいて合成したミルクペプチドマイクロアレイを用いて解析することで、アレルギー応答を抑制する短鎖エピトープペプチドを設計した。本ペプチドを経口免疫療法における補助剤として添加し、アレルギー応答を抑制しながら円滑に治療を行う可能性について検討した。

研究成果の概要(英文)：Peptide microarray is useful for the antibody epitope mapping since it enables high-throughput binding interaction analysis of medical serological samples. In this study, milk allergy mouse model was made by four times immunization of casein with alum adjuvant and heterovalent IgE epitope was analyzed using the milk peptide microarray that composed peptide library of six milk protein amino acid sequences. Using the milk allergy mouse sera-IgE sensitized basophilic leukemia cells, design of short epitope peptides was investigated for inhibition of allergic reaction by allergen addition. When the short epitope peptides was administrated to milk allergy mouse, allergic responses such as scratching and rectal temperature decrease were suppressed after allergen administration. Therefore, it was indicated that the short epitope peptides could be used as the personalized medicine in oral immunotherapy and it would help safe administration of allergens by suppressing allergic reactions.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：ペプチド アレルギー バイオチップ

### 1. 研究開始当初の背景

先進国におけるアレルギー患者数は増加傾向にあり、その治療法が広く求められている。アレルギー疾患の発症の主な原因はアレルゲンによって誘発される免疫の過剰応答であることが知られる。アレルギー疾患の克服には生体の免疫機構の制御が重要であり、制御性細胞の誘導やT細胞エピトープを利用したワクチン開発が進められている。近年では、アレルギーの原因抗原を持続的に摂取する経口免疫療法が根治療法として注目されており、臨床研究が進められている。食物アレルギーの経口免疫療法では、原因食物を徐々に増量させながら持続的に経口摂取して減感作状態に導いた後、2週間以上の抗原除去期間を経た後に再度、原因食物を摂取した際にアレルギー症状がないことが耐性獲得(アレルギー克服)の目安とされている。しかし、減感作状態(継続的な抗原摂取ではアレルギー症状がない)には至るものの耐性を獲得できない患者も多く、その機構解析が進められている。我々は、ペプチドマイクロアレイを用いたIgE抗体のエピトープ解析法を構築し、医療機関と連携して牛乳アレルギー患者血清を用いて、耐性獲得の有無など各病態群での抗体エピトープを詳細に解析してきた。これより、ペプチドマイクロアレイ解析によるIgE抗体エピトープの数やその認識部位は患者群により異なる傾向がみられ、治療指標として利用できる可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

食品や花粉などによる即時型アレルギー反応は、好塩基球やマスト細胞に結合した抗原特異的IgE抗体が、抗原を介して架橋することにより惹起される。生体内では一つの抗原に対して複数部位を認識する抗体が産生されるため、どのエピトープ認識抗体がアレルギー反応を規定するかを特定することは難しい。そこで、動物モデルを作製し、ペ

チドマイクロアレイ解析により少量の血液から抗体エピトープを明らかにし、その情報をもとに脱顆粒を指標としたアレルギー応答解析を行うこととした。さらに、エピトープペプチドを用いることで、抗原添加時のアレルギー応答の抑制について検討することで、経口免疫療法などにおいて原因食物を摂取した際のアレルギー応答抑制について検討し、より安全で円滑な経口免疫療法の確立に向けた取り組みを進めることとした。

### 3. 研究の方法

アレルギーモデルマウスは、BALB/cAJclを1週間予備飼育後、20 mg/ml アラムゲル(Al(OH)<sub>3</sub>)と200 µg/ml カゼインナトリウムを当量混和した溶液を調製し、4週令マウスに1匹あたり200 µlの容量で腹腔内投与し、10日毎に4回免疫することで作製した。飼育環境は、温度25℃、湿度45%、午前8時点灯・午後8時消灯の条件下で単独飼育し、飼育中は飼料及び水を自由摂取させた。4回目の免疫から1週間後にマウスの尾にカッターで斜めに切り込みを入れて血液を採取した後、血液を37℃で30分間インキュベート後、5000 rpmで5分間遠心することで血清を取得した。血清は、10 µlずつ分注し、-80℃で保存した。

ペプチドマイクロアレイは、牛乳に含まれる $\alpha_{S1}$ -、 $\alpha_{S2}$ -、 $\beta$ -、 $\kappa$ -カゼイン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリンの全6種類のタンパク質のアミノ酸配列に基づいて583種類のペプチドライブラリーを合成し、各ペプチドをN=3でスライドガラスにスポットングすることで作製した。ペプチドマイクロアレイは、固定化処理後にブロッキングし、マウス血清を0.5% BSA (Albumin, from Bovine Serum)を含むPBS(-)で25倍希釈した液(500 µl)と反応させた。ハイブリダイゼーション用チャンバーを用いて37℃で30分間、20 rpmの回転撹拌で反応した後、PBS-T (0.1% Tween20を添加したPBS)で5分間、3回洗浄した。次に、抗マウスIgE抗体を1.0% BSA、

PBS-T で 500 倍希釈し、血清を作用させた時と同様の手順で反応させ、洗浄を行った。さらに、同様の手順で Alexa-647 標識抗体と反応・洗浄後、超純水で 3 回洗浄し、遠心乾燥させた。マイクロアレイスキャナーによる画像取得後、数値解析ソフトで各ペプチドに対する抗体結合量を蛍光強度値として評価した。

細胞レベルでのアレルギー応答は、ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3, ATCC CRL-2256) を使用した。  $2.5 \times 10^5$  cells/ml に調製した細胞懸濁液に 50 倍希釈したアレルギーマウス血清を添加し、36 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターで静置培養後、HEPES-Tyrode で 2 回洗浄した。抗原としてカゼインナトリウムを添加し、30 分後の細胞上清を採取した。界面活性剤 1% Triton X-100 を用いて細胞膜を損傷させた全顆粒放出サンプルを調製し、顆粒球に含まれる  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼを指標として、脱顆粒割合を算出した。

#### 4. 研究成果

カゼイン免疫マウスがアレルギーを発症していることを確認するため、マウス血中の総 IgE 抗体量を測定した結果、カゼイン免疫マウス群では  $19.26 \pm 5.96$  ng/mL、コントロールとして PBS を免疫した健常群では  $3.07 \pm 1.16$  ng/mL とカゼイン免疫群で顕著な IgE 抗体量の増加がみられた。次に、カゼイン免疫マウス血清を RBL-2H3 細胞に感作させてカゼイン添加に対する脱顆粒試験を行ったところ、健常マウス血清を用いた場合では 6.1% であったのに対し、56.0% の脱顆粒率が得られ、血清中 IgE 抗体がカゼイン特異的であることが示唆された。これより、ミルクアレルギーモデルマウスの作製を確認した。

カゼイン免疫マウスの血清中 IgE 抗体のエピトープを調べるため、ミルクペプチドマイクロアレイを用いて解析した。図 1 に示す通

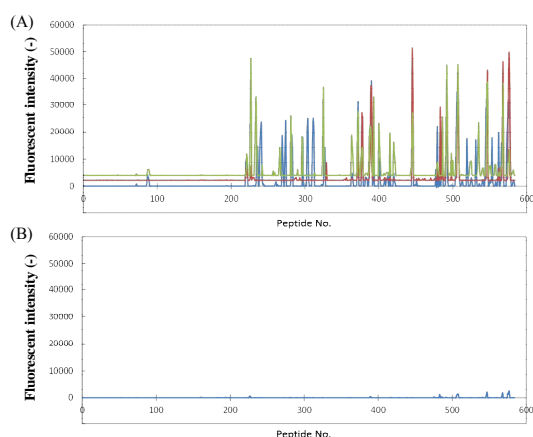


図 1 ペプチドマイクロアレイを用いたカゼイン免疫マウス(A)及び健常マウス(B)の IgE 抗体エピトープ解析

り、カゼイン免疫マウスでは、複数ピークがみられ、 $\beta$ -カゼイン及び  $\kappa$ -カゼイン由来のペプチドに抗原性を示すことが示唆された。

アレルギー反応では、一つの抗原に対して複数部位を認識する IgE 抗体が産生され、これらが抗原を介して架橋することで脱顆粒を引き起こす。そこで、エピトープペプチドの添加により IgE 抗体の架橋が阻害され、脱顆粒を抑制できるか検討した。カゼイン免疫マウス血清を感作させた RBL-2H3 細胞に図 1 より得られた 21 種類のエピトープペプチドをそれぞれ添加した後、抗原としてカゼインを添加したところ、多くのペプチドにおいて脱顆粒率が減少した。これに対し、ペプチドマイクロアレイにおいて結合がみられなかった配列 (Negative peptides) では、脱顆粒率に変化はみられなかった。そこで、脱顆粒抑制効果が高い 3 配列 (A-C) について単独、及び各ペプチドを 1:1:1 の割合で混合したペプチドカクテルを様々な濃度で添加し、脱顆粒試験を行った。その結果、濃度依存的に脱顆粒を大きく抑制できることが示された (図 2)。これより、エピトープペプチドが感作した IgE 抗体と抗原との結合を阻害し、脱顆粒を抑制していることが示唆された。

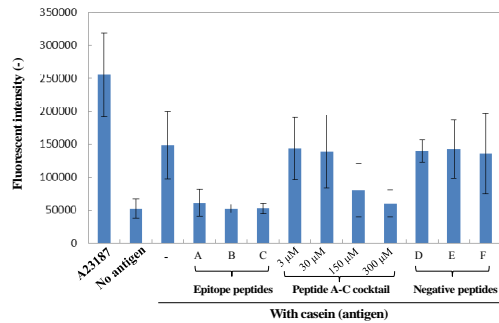


図2 混合ペプチドを用いた脱顆粒阻害

カゼイン免疫マウスを用いて、エピトープペプチドによるアレルギー反応の抑制について検討した。細胞試験において脱顆粒を抑制できた3種類の混合ペプチドを投与した後、15分後に抗原であるカゼインナトリウムを投与したところ、ペプチドを添加していないアレルギーマウスでみられる直腸温の低下は認められず、アレルギー反応を抑制できることが示唆された。しかし、長鎖のエピトープペプチドは疑似抗原として作用することが懸念されるため、より詳細に解析することで10残基弱の短鎖エピトープペプチドを設計し、細胞試験にて脱顆粒を抑制できることを確認した。そこで、カゼイン免疫マウスを用いて短鎖エピトープペプチドを事前に投与した後に抗原を投与し、アレルギー応答を抑制しながら継続的な抗原投与を行った。図3は、2か月間抗原およびペプチドとの共投与を継続的に実施した後に、抗原のみを投与した30分後の直腸温を示している。ペプチドと抗原の共投与群においては、抗原投与群と同様に抗原摂取による直腸温の低下は認められなかった。これに対し、コントロールとして実施した2か月間のPBS投与群では、抗原投与後の直腸温低下が認められた。しかし、マウス血清中のIgE抗体量を測定したところ、その減少は認められなかったことから、減感作状態に達しているが、まだ耐性を獲得できていないことが示唆された。以上のことから、短鎖エピトープペプチドを抗原投与前に用いることで、アレルギー応答を抑制できる可能性が示された。今後、動物実験により

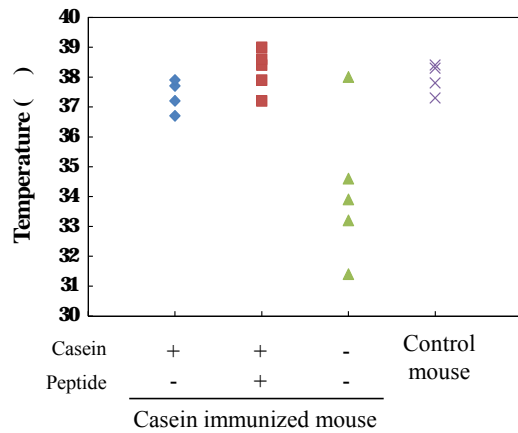


図3 カゼイン免疫アレルギーマウスを用いて、抗原(◆)および短鎖エピトープペプチド共投与(■)を2か月間行った後に、抗原投与後の直腸温を測定した結果。抗原非投与(▲)、健常マウス(×)をコントロールとして用いた。

抗原投与法や安全性評価をさらに検討し、ペプチドワクチンを設計することで、より安全性の高い経口免疫療法の確立が可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Mina Okochi, Shinji Koike, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda, Detection of *Her2*-overexpressing cancer cells using the on-chip RT-PCR employing a magnetic droplet-manipulation system. *Biosens. Bioelectron.* 査読有、93: 32-39 (2017).

DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.013

Mina Okochi, Tomohiro Kamiya, Takeshi Omasa, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda, Rapid colorimetric antibody detection using a dual-function peptide probe for silver nanoparticle aggregation and antibody recognition. *Anal. Sci.* 査読有、32 (1): 93-97 (2016).

DOI: 10.2116/analsci.32.93

Mina Okochi, Tomoya Sugita, Masayoshi

Tanaka, Hiroyuki Honda, A molecular peptide beacon for IgG detection. *RSC Adv.* 査読有, 5: 91988 – 91992 (2015). DOI: 10.1039/c5ra15174k

〔学会発表〕(計 8 件)

大河内美奈 「ペプチドアレイを用いたバイオセンシングプローブの探索」 バイオチップコンソーシアム第 97 回ワーキンググループ講演会、2017 年 3 月 24 日、新宿区若松地域センター

大河内美奈 「ペプチドを利用したバイオセンシング法の開発」 化学工学会中国四国地区コロキウム、2016 年 12 月 16 日、岡山理科大学

大河内美奈 「ペプチドマイクロアレイによる食物アレルギーの解析」 日本化学会東海支部三重地区講演会、2016 年 12 月 9 日、三重大学

大河内美奈 「ペプチドプローブを用いたバイオセンシング」日本ペプチド学会 2016 ペプチド夏の勉強会、2016 年 7 月 31 日、八王子セミナーハウス

大河内美奈 「ペプチドアレイを用いたアレルギー解析」 第 3 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム、2015 年 9 月 9 日、熊本大学

大河内美奈 「ペプチドアレイを利用したアレルギー診断」 第 33 回電気化学会夏の学校、2015 年 8 月 26-27 日、八王子セミナーハウス

大河内美奈 「食物アレルギーに関する抗体エピトープ解析」 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 31 回研究会、2015 年 6 月 8 日、京都大学

大河内美奈 「全網羅ミルクペプチドアレイを用いた食物アレルギーの病態モニタリング」 バイオインダストリー協会「未来へのバイオ技術勉強会」、2015 年 5 月 19 日、バイオインダストリー協会

〔図書〕(計 1 件)

大河内美奈 第 編 第 2 章 10 節「食物アレルギーに関する抗体エピトープ解析」を分担執筆「バイオチップの基礎と応用」シーエムシー出版、2015 年、274 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
東京工業大学物質理工学院応用化学系大河内研究室  
<http://www.chemeng.titech.ac.jp/~lab-okochi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 美奈 (OKOCHI, Mina)  
東京工業大学・物質理工学院・教授  
研究者番号: 70313301

(2) 研究分担者

本多 裕之 (HONDA, Hiroyuki)  
名古屋大学・予防早期医療創成センター・教授  
研究者番号: 70209328

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし