

平成22年6月10日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790084

研究課題名 (和文) ネガティブシグナルを誘導する抗アレルギー性 IgE 抗体の開発

研究課題名 (英文) Development of negative signal-inducing anti-allergic IgE

研究代表者

中村 亮介 (Nakamura Ryosuke)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官

研究者番号：50333357

研究成果の概要 (和文)：アレルギー反応に重要な役割を果たすマスト細胞には、活性化に関与する高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) と、抑制シグナルを誘導する低親和性 IgG 受容体 (FcγRIIB) が発現している。本研究では、遺伝子工学的手法により FcεRI と FcγRIIB とを同時に架橋する新規 IgE 分子を作製するとともに、その抑制能を評価する系を作出した。

研究成果の概要 (英文)：Mast cells play important roles in the allergic reactions, and they express active signal-inducing high-affinity IgE receptors (FcεRI) and negative signal-inducing low-affinity IgG receptors (FcγRIIB) on their surface. In this study, new IgE molecule which may bind FcεRI and FcγRIIB simultaneously was genetically developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,000,000	0	1,000,000
2009年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：免疫化学、抗アレルギー薬、IgE、マスト細胞、シグナル伝達、アレルギー試験

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー反応に重要な役割を果たしているマスト細胞や好塩基球は、細胞表面に発現する高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に IgE を結合しており、アレルゲンが IgE との結合を通じ FcεRI を架橋すると、細胞内の

immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を介する活性化シグナルが誘導される。ところが、抗原が IgG とイムノコンプレックス (IC) を形成していると、これらの細胞が発現する II 型低親和性 IgG 受容体 (FcγRIIB) が FcεRI と共架橋 (co-cross-

linking) され、immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) を介するネガティブシグナルが誘導され、細胞の活性化を抑制することが知られている [Daeron et al., 1995, Nakamura & Nakanishi, 2000]。近年、Zhu らはこのメカニズムに着目し、IgG の定常部 (Fc γ) と IgE の定常部 (Fc ϵ) とを人工的につないだキメラ分子 GE2 を作製し、これが *in vitro* および *in vivo* でマスト細胞の活性化を抑えることを報告した [Zhu, 2002]。しかし、このようなキメラ分子は生体にとって明らかに異物であり、繰り返し投与するうちに宿主に抗体ができ、効果を失うことが懸念される (彼らの *in vivo* のデータは単回投与である)。アトピー性皮膚炎に代表される多くの慢性アレルギー疾患は薬物の単回投与で治癒することは考えにくく、薬物の免疫原性は大きな問題となりうると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、Fc γ RIIB に特異的な IgE 抗体を創出し、これにより Fc ϵ RI と Fc γ RIIB の共架橋を実現し、ネガティブシグナルを誘導することを試みる。IgE は生体に元々存在する分子であるから、免疫系により排除されることはない。また、Fc γ RIIB は低親和性受容体なので GE2 分子中の Fc γ と Fc γ RIIB との結合は低親和性であるが、本研究で作製する IgE と Fc γ RIIB との結合は抗原抗体反応であるため、高親和性結合が期待できる。

(2) 同時に、マスト細胞の活性化およびその抑制を適切に評価する実験系を作出するため、複数の新規培養細胞株を樹立する。一つはラットの培養マスト細胞株 (RBL-2H3 細胞) にマウス Fc γ RIIB を安定発現させたもので、もう一つは RBL-2H3 細胞にヒト Fc ϵ RI と転写因子 NFAT により発現が誘導さ

れるルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に導入したものである。

3. 研究の方法

(1) 抗体遺伝子の単離および解析
マウス Fc γ R2/III に対する特異的抗体である 2.4G2 クローン (ATCC より購入 ; HB-197) より、TRIzol Reagent (Invitrogen) により total RNA を抽出した。これを鋳型とし、SMART RACE (Clontech) により抗体 H 鎖遺伝子 (Rat IGG2B) および L 鎖遺伝子 (κ) の 5'-RACE を行ない、抗体遺伝子を複数単離した。これと別に、2.4G2 クローン由来の抗マウス Fc γ R2/III 抗体タンパク質を BD より購入し、SDS-PAGE により H 鎖および L 鎖を分離・単離後、タンパク質の N 末端アミノ酸配列を 10 残基ずつ解析した (アプロサイエンス株式会社)。マウス IgE 遺伝子に関しては、抗 TNP IgE 産生ハイブリドーマ (TB-142) を ATCC から購入し、上記と同様に IgE 定常部遺伝子および κ 鎖定常部遺伝子を単離した。

(2) キメラ抗体の作製
抗体可変部がラット IgG2b である 2.4G2 クローンに由来し、定常部がマウス IgE であるキメラ抗体遺伝子を作成するため、splice overlapping extension 法により両遺伝子を *in frame* で融合させた。融合後の配列を確認後、H 鎖および L 鎖それぞれを Gateway L/R 反応により pcDNA6.2/V5-DEST および pcDNA-DEST47 の哺乳動物発現ベクターに組み換えた。両遺伝子をチャイニーズハムスター由来培養細胞 CHO-S (Invitrogen) に DMRIE-C (Invitrogen) により定法に従って導入した。導入 96 時間後の CHO-S 細胞の上清を回収した。

(3) マウス Fc γ RIIB を安定発現するラットマスト細胞株の作製

マウスマクロファージ J774.1 細胞由来の total RNA を鋳型とし、RT-PCR によりマウス FcγRIIB 遺伝子を調製した。これを哺乳動物発現ベクター pcDNA-DEST47 に組み込み、RBL-2H3 細胞に Lipofectamine2000 (Invitrogen) により導入した。同細胞を 3.0 mg/ml の geneticin により選択後、biotin 化 2.4G2 抗体とストレプトアビジン結合ビーズおよび MACS カラム (Miltenyi Biotec) により FcγRIIB 陽性細胞を濃縮し、限界希釈法により複数種のクローンを得た。発現の確認は PE 標識 2.4G2 抗体と共焦点レーザー顕微鏡とにより行なった。

(4) NFAT の活性化によりルシフェラーゼを発現する RBL-2H3 細胞の作製

FcεRI を介するシグナル伝達によるマスト細胞の活性化およびその抑制を定量的に解析するシステムとして、転写因子 NFAT によって発現が誘導されるルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に導入したラット培養マスト細胞株を作製した。培養細胞株としては、RBL-2H3 細胞にヒト FcεRI 遺伝子をすでに導入してある RBL-SX38 細胞を用いた。Lipofectamine2000 によりルシフェラーゼ遺伝子 (BioMyx) を導入し、その後 600 μg/ml の hygromycin により選択をかけ、限界希釈により複数種のクローンを樹立した。このうちルシフェラーゼを最も多く発現したクローンを選び、RS-ATL8 細胞と命名した。これを 5×10⁴ cells/50 μl/well の細胞密度でクリアボトム白色 96 ウェルプレートに播種した。3 時間後、最終濃度 100 倍に希釈した患者血清を添加し、一晚感作した。滅菌 PBS で 1 回洗浄後、10% FCS を含む MEM 培地に溶解した各種抗原または陽性対照としての抗ヒト IgE 抗体 (1 μg/ml) 50 μl を加えて刺激を行ない、3 時間 CO₂ インキュベータ中に静置した。ルシフェラーゼの発現量は、培

養液中に ONE-Glo (Promega) を 50 μl/well 加え、発光量をルミノメーター EnVision (PerkinElmer) により測定した。発光量は刺激前のバックグラウンド発光に対する相対比として表し、2 倍を以て活性化のカットオフ値とした。

4. 研究成果

(1) キメラ抗体の作製および解析

ラット抗マウス FcγRII/III 抗体 (IgG2b κ) 産生ハイブリドーマ 2.4G2 より、抗体 H 鎖および L 鎖の可変部領域遺伝子を 5'-RACE 法により単離することに成功した。同法により得られた抗体遺伝子から明らかにされたアミノ酸配列は、タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析により得られた H 鎖および L 鎖それぞれの成熟タンパク質における N 末端アミノ酸配列 10 残基と正確に一致した。なお、論文発表前のため、配列データの公表は差し控える。

両遺伝子を splice overlapping extension (SOE) 法により in frame で融合させ、可変部領域が 2.4G2 クローンに由来し、定常部領域がマウス IgE に由来するキメラ抗体遺伝子を作製した (図 1)。この H 鎖および L 鎖遺伝子を哺乳動物発現ベクターに組み換え、

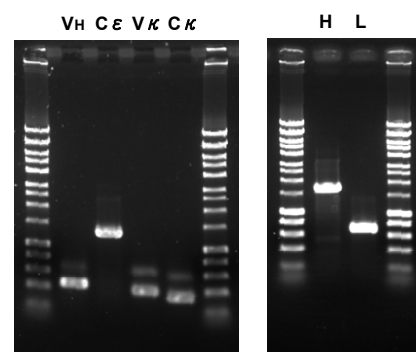


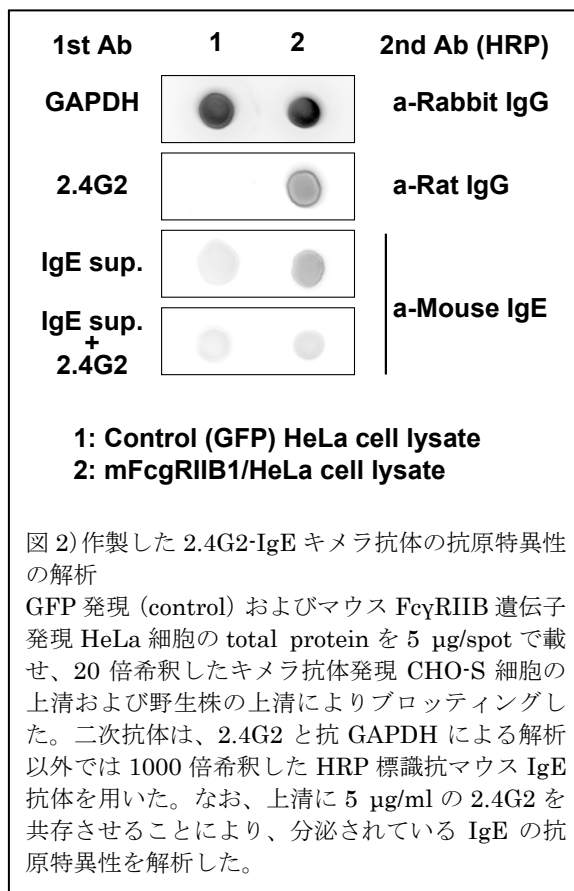
図 1) SOE 法によるキメラ遺伝子の作製
左: IgG2bH 鎖と κ 鎖の融合前の可変部 (V) および定常部 (C) 遺伝子。右: 融合後の H 鎖および L 鎖遺伝子。

定評ある哺乳動物発現系である CHO-S 細胞に導入し、その上清を採取した。

一方、抗原となるマウス FcγRIIB 遺伝子を HeLa 細胞に導入し、total protein を採取した。これを抗原とし、ドットプロット解析を行なったものが図 2 である。マウス FcγRIIB は同遺伝子を導入した細胞でのみ発現しており、CHO-S 細胞上清中にはこの抗原と特異的に結合する IgE 抗体が存在することが分かった。上清中の IgE の抗原への結合性は 5 μg/ml の 2.4G2 の共存によりバックグラウンド並みに減少するため、抗原特異性は 2.4G2 と同一、すなわちマウス FcγRII/III 特異的であることが示された。

(2) マウス FcγRIIB を安定発現するラットマスト細胞株の作製

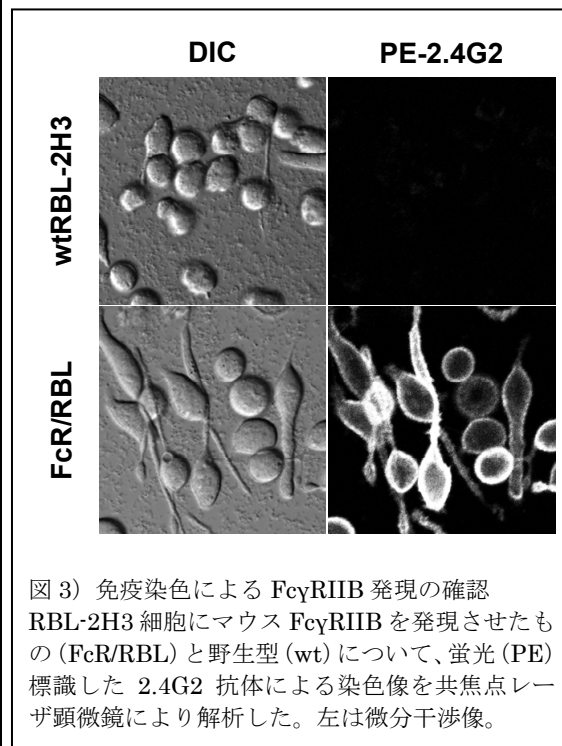
2.4G2 は抗マウス FcγRII/III 抗体であるため、ラットの培養マスト細胞株である



RBL-2H3 細胞にマウス FcγRIIB 遺伝子を発現させれば、本分子の機能のみを解析するマスト細胞株の系を作出することができる。マウス FcγRIIB 遺伝子を単離し、これを哺乳動物発現ベクターに組み換えて RBL-2H3 細胞に導入し、薬剤選択を行なった後、FcγRIIB を多く発現している細胞のみを選別する目的で、biotin 化 2.4G2 抗体とストレプトアビジン結合ビーズを用いて MACS カラムにより受容体陽性細胞を濃縮した。ここから限界希釈法によるクローニングを行ない、PE-2.4G2 による免疫染色で成績のよいクローンを選択した (図 3)。

(3) FcεRI を介するシグナル伝達によりルシフェラーゼを発現する細胞の開発

マスト細胞の FcεRI を介するシグナル伝達による活性化は、通常、脱顆粒を以て測られることが多い。しかし、脱顆粒法は感度が高くなく、また、実験の手順がやや煩雑であることが実験誤差を生む一因となっていることが懸念されていた。



そこで、培養細胞を用いてマスト細胞の活性化を簡便かつ感度よく定量する系を樹立するため、転写因子 NFAT に注目した。ヒト FcεRI を安定発現させてある RBL-2H3 細胞由来細胞株である RBL-SX38 細胞に NFAT 依存的ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入することにより、ヒト・マウス・ラットすべての動物種により感作できる系を開発することにした。このような細胞は、アレルギー患者の血清中に存在するアレルギー特異的 IgE によっても感作され、アレルギー刺激によりルシフェラーゼを発現し、感度よくマスト細胞の活性化を定量できると期待される。樹立した細胞は RS-ATL8 細胞と名付けられた。

本法は IgE の架橋によって誘導されるルシフェラーゼ発現の測定に基づいていることから、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression の頭文字より EXiLE 法と命名した。

血清中卵白特異的 IgE が >100 U_A/ml、総 IgE が 12700 IU/ml である卵白アレルギー患者の血清により RS-ATL8 細胞を感作し、様々な濃度の卵白アレルギー (EWP) により刺激した際のルシフェラーゼ発現を調べたところ、少なくとも 1 fg/ml の EWP による

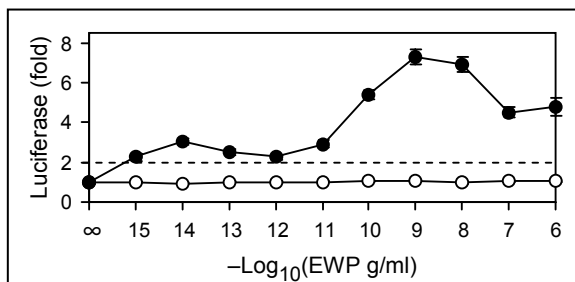


図 4) 卵白アレルギー患者血清と EWP による刺激 100 倍希釈した卵白アレルギー患者血清により RS-ATL8 細胞を感作し、培地に希釈した EWP により 37°C で 3 時間刺激したときのルシフェラーゼ発現。抗原刺激あり (●) および刺激なし (○)。点線はカットオフ値。少なくとも 1 fg/ml の EWP でカットオフ値を超える応答を示している。

FcεRI 架橋を検出できることが分かった (図 4)。

この極めて鋭敏な検出系がどの程度アレルギーの臨床症状と相関しているかを調べるため、食物負荷試験 (OFC) により卵白へのアレルギーの有無が判明している患者血清 25 検体について、EXiLE 試験を行なった。合わせて、血清中のアレルギー特異的試験の標準的試験法である CAP-RAST 法および脱顆粒法についても試験し、OFC と比較した。

Fisher の正確確率検定により CAP-RAST、脱顆粒法および EXiLE 法の OFC の結果に対する相関を調べたところ、P 値はそれぞれ 0.09333、0.06545 および 0.0001267 となり、EXiLE 法が最も相関が高かった。

最後に、EXiLE 法がアレルギー応答のネガティブ制御を検出できるかどうかについて、複数の抗アレルギー性候補物質を添加した場合のルシフェラーゼ発現を解析した。

今回は、プロポリス由来フラボノイドである、Kaempferol、Chrysin、Dropanin の 3 種を被験物質としたが、図 5 に示す通り、Kaempferol および Chrysin には抗原刺激に伴うルシフェラーゼ発現の顕著な抑制効果

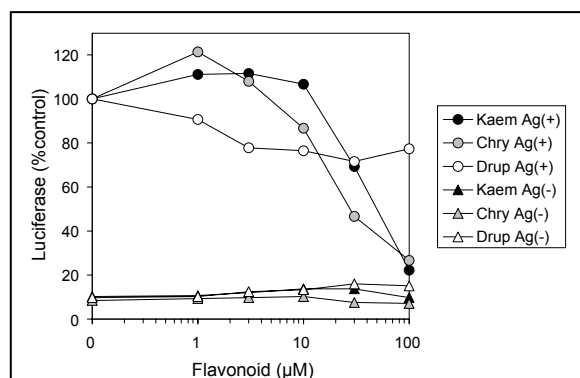


図 5) RS-ATL8 細胞を用いた抗アレルギー活性の評価

卵白アレルギー患者血清により感作した RS-ATL8 細胞を 1 μg/ml の EWP で刺激する際、3 種のフラボノイドを共存させた。フラボノイドを含まない時のルシフェラーゼ発現量を 100% とした相対量として表している。

が認められた。一方、Drupanin の抗アレルギー活性はわずかであった。

このことから、RS-ATL8 細胞を用いた EXiLE 試験は、抗アレルギー活性の測定系としても有用であることが示されたといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Nakamura R., Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R., A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells, Allergy、査読有、2010、in press
- ② Nakamura, R., Teshima, R., Hachisuka, A., Sato, Y., Takagi, K., Nakamura, R., Woo, G.H., Shibutani, M., Sawada, J., Effects of developmental hypothyroidism induced by maternal administration of methimazole or propylthiouracil on the immune system of rats, International Immunopharmacology、査読有、Vol.7、No.13、2007、pp.1630-1638

[学会発表] (計 13 件)

- ① 中村亮介、内田好海、樋口雅一、手島玲子、培養細胞を用いた新しいアレルギー検査法の開発、第 16 回日本免疫毒性学会学術大会、2009 (旭川市)
- ② 中村亮介、樋口雅一、内田好海、中村里香、手島玲子、EXiLE 法 - 培養細胞を用いた新規アレルギー試験法の開発 -、第 130 回日本薬学会、2010 (岡山市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：I 型アレルギーの検査方法

発明者：中村亮介、手島玲子

権利者：西島正弘

種類：特許

番号：特願 2009-168530

出願年月日：2009 年 7 月 17 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 亮介 (NAKAMURA RYOSUKE)

研究者番号：50333357

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：