

機関番号：32639

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580143

研究課題名（和文） 株化ヒトリンパ球が分泌する抗ピーナツ抗体によるアレルゲン解析

研究課題名（英文） Analysis of peanut allergen with human monoclonal antibodies

研究代表者

新本 洋士 (SHINMOTO HIROSHI)

玉川大学・農学部・教授

研究者番号：50355301

研究成果の概要（和文）：

ヒト末梢血リンパ球からピーナツアレルゲン Ara h1 に対する抗体を分泌する 31 種の短期培養可能なオリゴクローンの B 細胞が得られた。Ara h1 アミノ酸配列から合成したペプチドとの反応解析により、抗体結合部位は大きく 6 つに分類することができた。つぎに Ara h1 に対するモノクローナル IgM 抗体 92-2 および #86 を得た。92-2 抗体の認識するエピトープは QEWGTPGS 配列であり、#86 抗体は DEDEEEE であった。

研究成果の概要（英文）：

Peripheral blood B-cells were transformed with Epstein-Barr virus. We have obtained 31 oligo-clonal B-cells secreting antibodies recognizing 6 parts of peanut allergen Ara h1 protein. Detailed analysis with human IgM class monoclonal antibodies 92-2 and #86 against peanut allergen Ara h1 showed that the peptides QEWGTPGS and DEDEEEE were core epitopes of Ara h1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食物アレルギー

1. 研究開始当初の背景

ピーナツは喘息やアナフィラキシーショックなどの重篤なアレルギー症状を引き起こすことが知られている。このため平成 14 年に改正された食品衛生法関連法令中の加工食品の原材料表示では、卵、牛乳、小麦、

そばの 4 品目とともに特定原材料として表示が義務づけられた。

ピーナツのアレルゲンタンパク質についての研究は米国を中心に進んでいる。ピーナツアレルギー患者の血清 IgE との反応性から、3 つの主要ピーナツアレルゲンが同定され、

それぞれ Ara h1, Ara h2, Ara h3 と名付けられた。このうち Ara h1 については、一次構造から合成した部分ペプチドを用い、患者血清が結合する B 細胞エピトープの解析も行われている。また米国農務省農業研究所南部研究センターにおいては、ピーナツの加熱加工工程におけるアレルゲン性の変化を検討し、加熱処理によってかえって Ara h1 のアレルゲン性が増加する可能性を示した。

このような研究では目的のアレルゲンとよく反応する患者血清の入手が必須である。しかし多くの場合、食物アレルギーの患者は小児であることから患者血清を大量に得ることが困難である。また、患者によって反応するアレルゲンがさまざまである。これらの理由から患者血清を用いた食物アレルギー研究は、大量に血清を得られる特定の患者血清に依存したものであり、容易に他研究室で研究を再現できなかった。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者らが開発した独自のヒトモノクローナル抗体作製手法を、ピーナツアレルゲン解析に応用し、ピーナツアレルギー発症機構を解明することを目的とした。

食物アレルギー患者の末梢血リンパ球をエプスタインバーウイルスで形質転換した後、マウスミエローマと細胞融合することによって、ピーナツアレルゲンに対するヒトモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを複数樹立することが第1の目的である。つづいて、得られたモノクローナル抗体を用い、ウェスタンブロット解析、合成ペプチドによるエピトープ解析を行う。このことにより、ヒトモノクローナル抗体が認識するピーナツアレルギー発症に関わるアレルゲン蛋白質上のアミノ酸配列（エピトープ）が明らかになり、ピーナツアレルギー発症における抗体とアレルゲンの結合の様式が解明される。

3. 研究の方法

図1に本研究のフローチャートを示す。まずエプスタインバーウイルスで形質転換し短期間の培養が可能になった多数のヒト末梢血リンパ球由来の細胞群（ライブラリー）から、ピーナツアレルゲンに対する抗体分泌細胞の検索を行った。得られた抗体のうち、ピーナツの主要アレルゲンタンパク質である Ara h1 分子（図2）上のどのアミノ酸配列を認識するかを大まかに把握する。

つぎに上記抗体分泌細胞をマウスミエローマと細胞融合させることによって、ピーナツアレルゲンに対するヒトモノクローナル抗体を分泌するマウス-ヒトハイブリドーマを作製する。さらに、ピーナツアレルゲンタンパク質 Ara h1 のアミノ酸配列をもとに合成したペプチドのどの位置に得られたヒトモノクローナルが結合するか（抗体結合部位=エピトープ）を明らかにする。ペプチドは固相上に合成し、8アミノ酸配列まで配列を絞り込む。また、アラニン置換ペプチドとの反応性解析により、抗体の結合部位を詳細に解明する。

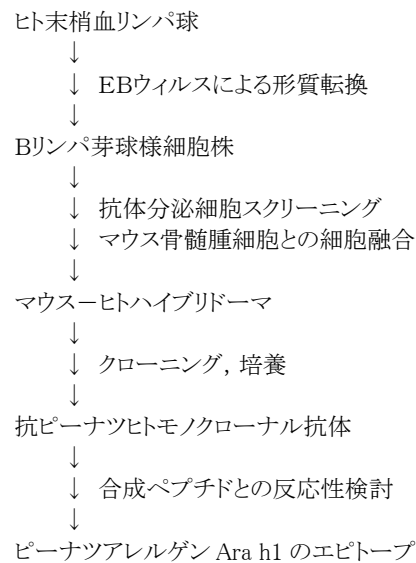


図1 ヒト型抗ピーナツ抗体によるアレルゲン解析のフローチャート

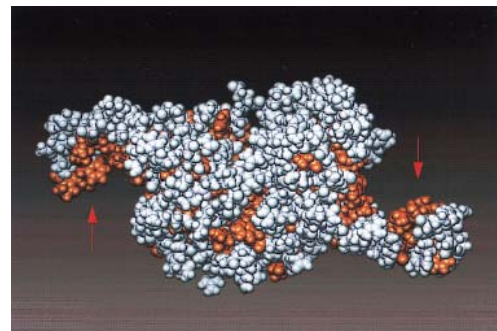


図2 Ara h1 の推定される立体構造：矢印部分において、3量体構造を取り、立体構造が安定すると考えられている。ただし、アミノ末端側4分の1の部分の立体構造は解明されていない。

4. 研究成果

形質転換ヒトリンパ球ライブラリーの抗

体スクリーニングを行ったところ、31種の抗体分泌細胞が得られた。Ara h1のアミノ酸配列から合成した20アミノ酸長のオーバーラッピングペプチドとの反応性を解析した結果、抗体が結合する部位は大きく6つに分類することができた。このうちエリアCと名付けたアミノ酸配列171-230のエリアは、米国のピーナツアレルギー患者IgEを用いた結合試験では見いだされていない新規な抗体結合部位であることが明らかになった。

上記抗体分泌細胞のうち、増殖のよい2株をマウスミエローマと細胞融合してクローニングし、ピーナツアレルギーAra h1に対するIgM抗体分泌ハイブリドマクローン92-2および#86を得た。

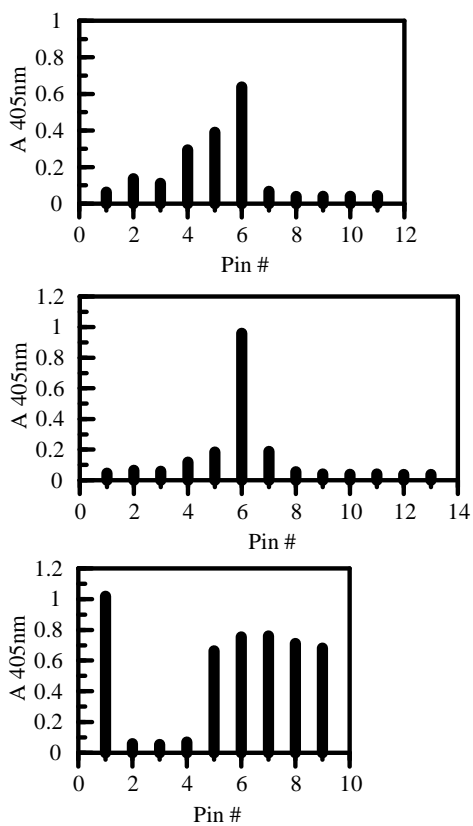


図3 Ara h1配列由来の合成ペプチドと92-2抗体との反応性

上段：10アミノ酸ペプチド

- | | |
|--------------|---------------|
| 1 GREGEQEWGT | 2 REGEQEWGTP |
| 3 EGEQEWGTPG | 4 GEQEWGTPGS |
| 5 EQEWGTPGSH | 6 QEWGTPGSHV |
| 7 EWGTPGSHVR | 8 WGTGSHVRE |
| 9 GTPGSHVREE | 10 TPGSHVREET |
| 11 PGSHVREET | |

中段：8アミノ酸ペプチド

- | | |
|------------|------------|
| 1 GREGEQEW | 2 REGEQEWG |
|------------|------------|

- | | |
|-------------|-------------|
| 3 EGEQEWGT | 4 GEQEWGTP |
| 5 EQEWGTPG | 6 QEWGTPGS |
| 7 EWGTPGSH | 8 WGTGSHV |
| 9 GTPGSHVR | 10 TPGSHVRE |
| 11 PGSHVREE | 12 GSHVREET |
| 13 SHVREET | |

下段：アラニン置換ペプチド（元配列は中段8アミノ酸ペプチド#6）

- | | |
|------------|------------|
| 1 QEWGTPGS | 2 AEWGTPGS |
| 3 QAWGTPGS | 4 QEAGTPGS |
| 5 QEWATPGS | 6 QEWGAPGS |
| 7 QEWGTAGS | 8 QEWGTPAS |
| 9 QEWGTPGA | |

92-2抗体については、Ara h1のアミノ酸配列からN末端から10アミノ酸ずつシフトさせた20アミノ酸からなるペプチド63種類を合成し、モノクローナル抗体の結合部位を検討した結果、GREGEQEWGTPGSHVREETの配列に抗体が結合することが判明した（結果示さず）。さらにこの20ペプチドの配列から10アミノ酸（図3上段）あるいは8アミノ酸ペプチド（図3中段）を合成し、8アミノ酸からなるQEWGTPGS配列がコアとなるエピトープ配列であることが判明した。この配列はこれまでピーナツアレルギー患者の血清IgEによって明らかにされた配列とは異なっていた。アラニン置換ペプチドとの反応性から、エピトープ中のQ, E, Wの三つのアミノ酸が抗体との結合に特に重要な働きをしていると推察された（図3下段）。

#86抗体については、DEDEEEEが最小配列として抗体に認識された。加えて、DEDのいずれかのアミノ酸をアラニンに置換すると抗体の反応性が著しく低下したことから、この3つのアミノ酸からなる配列部分に抗体が結合する重要な構造が存在することが考えられた（データ示さず）。

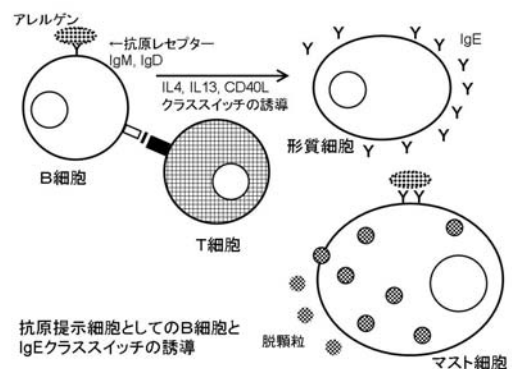


図4 抗原提示細胞として働くB細胞上のIgM抗体の役割：IgM抗体によってB細胞エピトープの位置で捕捉された抗原（アレルギー）はB細胞内に取り込まれ、分解された

ペプチド（T細胞エピトープ）をT細胞に提示する。T細胞はサイトカインを分泌し、B細胞をIgE分泌細胞へクラススイッチさせる。分泌されればIgE抗体はマスト細胞に結合し、再びアレルゲンが侵入してくると、ヒスタミンなどの化学伝達物質を分泌し、アレルギー反応を引き起こす。

これらのIgM抗体におけるB細胞エピトープに係るアミノ酸配列は、患者がピーナツアレルゲンに感作される時に、抗原提示細胞としてのB細胞表面上で重要な役割を果たす配列であると考えられる。本研究結果はピーナツアレルギーのペプチド治療に役立つ知見を与えると考えられる。

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3件）

1) Shinmoto H, Takeda M, Matsuo Y, Naganawa Y, Tomita S, Takano-Ishikawa Y., Epitope analysis of peanut allergen Ara h1 with human monoclonal IgM antibody clone #86., Hum Antibodies. 査読有 2010 19: 101-105.

2) Shinmoto H, Matsuo Y, Naganawa Y, Tomita S, Takano-Ishikawa Y. Epitope analysis of peanut allergen Ara h1 with human monoclonal IgM antibody 92-2. Cytotechnology. 査読有 2010 62: 307-311.

3) Naganawa Y, Shimmoto M, Maleki SJ, Takase M, Shinmoto H. Epitope analysis of peanut allergen Ara h1 with oligoclonal IgM antibody from human B-lymphoblastoid cells. Cytotechnology. 査読有 2008 57: 177-180.

〔図書〕（計1件）

1) 新本洋士, 中村他編著, 第一出版, 食物アレルギー A to Z, 2010, pp114-119

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新本 洋士 (SHINMOTO HIROSHI)
玉川大学・農学部・教授
研究者番号: 50355301

(2) 研究協力者

Soheila J. Maleki
米国農務省農業研究所南部研究センター