

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670456

研究課題名(和文)抗体エフェクター機能におけるIgG脱糖鎖化を起こす脂溶性因子の作用機序

研究課題名(英文)A humoral lipid preventing from mouse anaphylactic death

研究代表者

増田 豊 (Masuda, Yutaka)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：20199706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに卵白アルブミン(OVA)を繰り返し注射し免疫すると、アナフィラキシーを起こす個体が見られるが、繰り返し免疫した後に血中に増加する脂溶性因子がアナフィラキシー反応を顕著に抑制することを見出した。血清からクロロホルム/メタノール抽出し、DEAEクロマトグラフィーで300mMNaCl溶出画分に活性が認められた。抗体IgGの糖鎖へのフコース付加は抗体のエフェクター機能を抑制することが知られており、このときのマウス血中の抗OVA抗体IgG糖鎖へのフコース付加を調べたが顕著な変化は見出せなかった。繰り返し免疫の後に血中にアナフィラキシー反応を制御する未知の脂溶性因子が産生していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anaphylaxis gives mice severe stress killing them. They could produce adaptogenic substance for coping the stress. In the present study, the adaptogenic substance preventing from mouse anaphylactic death was examined. Six-week-old male ddY mice were initially immunized with 1mg/kg of ovalbumin and second immunized with the same dosage 10 days after the initial immunization. The mice further immunized with the same dosage at 5 days or 15 days after the second immunization. All of the former were killed by the anaphylactic response, but none of the latter were. Although reactivity of fucosylated antibodies inducing anaphylactic response was not different in the former sera and the latter sera, a lipid preventing from anaphylactic death was found in fraction eluted with 300mM NaCl of the latter sera. The present findings suggest that the lipid had an adaptogenic activity against severe stress induced by anaphylactic response, and was produced in late phase of the second immune response.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アナフィラキシー IgG 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、1) マウスに卵白アルブミン(OVA)を繰り返し注射し免疫すると、アナフィラキシーを起こす個体が見られるが、血清中の抗OVA抗体IgGを精製し、Fc領域の糖鎖を除去したIgGをマウスに投与しておくと、OVAを再度注射すると引き起こされるアナフィラキシーショックが顕著に抑制されることを見出した(Guo et al., Biomed. Res., 2003)。2) また、このときのマウス血中の抗OVA抗体IgGに付加する糖鎖へのフコース付加が特異的に増加してくることを見出した(Guo et al., Clin. Biochem., 2005)。フコース付加は抗体のエフェクター機能を抑制することが知られており、抗OVA抗体IgGの細胞傷害活性(ADCC活性)を低下させると考えられる。3) 繰り返し免疫したマウス血清を分画し、OVAと同時にマウスに腹腔内投与するとアナフィラキシーショックが顕著に抑制される脂溶性画分があることを見出した。繰り返し免疫の後に血清中にアナフィラキシー反応を制御する未知の脂溶性因子が産生していると考えられた。

関節リウマチなどの自己免疫疾患の患者ではIgGのFc領域糖鎖のガラクトースとシアル酸の欠損が見られることが古くから知られており、自己免疫疾患の病態に何らかの関与をしていると考えられているが、そのメカニズムは未解明のままである。そこで、繰り返し免疫モデルマウスを作製し、抗原特異的IgGの糖鎖の修飾と本脂溶性因子について関連を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

本研究では、繰り返しOVAで免疫したマウスの血清を分画し、OVAと同時にマウスに腹腔内投与するとアナフィラキシー反応を顕著に抑

制する脂溶性画分を精製し、その構造と活性を解析する。生体内(in vivo)でアナフィラキシー反応を制御する未知の液性脂溶性因子と、抗体エフェクター機能における糖鎖の修飾の関連を明らかにし、IgG抗原特異的なアナフィラキシーの抑制作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

6週齢 ddY マウス雄に対して卵白アルブミン(OVA)を繰り返し腹腔内投与し免疫した。初回に1mg/kg 免疫、10日後に2回目を免疫し、その5日後と15日後に3回目の免疫を行なった。3回目の免疫を5日後に行う群は全てアナフィラキシーショックを起こすが、15日後の群は生存する。この群から血清を採取した。

血清はクロロホルム/メタノールで抽出し、DEAE カラムクロマトグラフィーにより分画した。アナフィラキシー抑制効果は、この画分をOVA繰り返し免疫マウスの3回目の免疫を5日後に行う群に同時に投与し、致死率の変化を調べることで検討した。血中脂溶性画分の糖鎖解析は、各種レクチン(AAL, DBA, MAM, PNA, SBA)によるELISA法で行った。血中抗OVA抗体の糖鎖解析は、レクチン(AAL, DSA)によるELISA法で行った。

4. 研究成果

[平成25年度]

マウスにOVAを繰り返し免疫し、血清を採取して脂溶性因子の精製と解析を行った。血清をクロロホルム/メタノールで抽出し、DEAEカラムクロマトグラフィーにより分画した。

250-300mM NaCl 溶出画分にアナフィラキシー抑制効果の最も高い因子が溶出していることが明らかになった。この画分についてレクチンを使ってELISA分析したところ、脂溶性因子を含む画分は糖鎖付加していること、さらに、繰り返し免疫をする前のマウスの血清から精製した画分と比較すると、フコース含有糖鎖に反応するAALレクチンへの反応性が変化(平成26年当時は減少と経過報告で記載したが後に詳細な検討の結果、増加すると結論した。)していることがわかった。このことから繰り返し免疫前の脂溶性画分は糖鎖構造にフコースを含んでいて、繰り返し免疫をするとその糖鎖構造が変化すると考えられた。また、限外濾過膜を使って脂溶性因子の分子サイズを分析したところ、見かけの分子量は30kDa以上であることから、脂溶性因子は脂質がミセル構造をとっている可能性が考えられた。

[平成26年度]

前年度に行なったマウス血清中の脂溶性因子の精製と解析をさらに検討した。DEAEカラムクロマトグラフィーの250-300mM NaCl 溶出画分にアナフィラキシー抑制効果の最も高い因子が溶出していることを確認し、この画分が特定のレクチンに対して反応性を示すことをELISA法により分析してきた。しかし、レクチン反応性の特徴がクロマトグラフィーで隣接する各画分で重複する場合があることや、繰り返し免疫のタイミングのわずかな違いが微量な活性画分の分離に大きく影響することなどがわかり、活性画分の分離と含まれる因子の分析を再度検討した。繰り返し免疫の条件を単純化し、分離方法も一定条件になるようにして、DEAEクロマトで300mM NaCl 画分に最も活性が高い因子が溶出することを確認した。複数のレクチンの反応性がこの画分で変化していることも確認できた。26年度は活性画分の脂溶性因子の分析のほか抗OVA抗体IgGの糖

鎖構造解析を行う予定であったが、活性画分の分離を一定にするために免疫条件と分離条件を再検討し時間がかかった。そこで活性画分の脂溶性因子の分析とIgG糖鎖構造解析のために研究計画期間を延長した。

[平成27年度]

血清中脂溶性因子の構造とアナフィラキシー抑制作用の解析とIgG糖鎖構造の解析を行なった。

血中脂溶性画分の糖鎖解析は、各種レクチン(AAL, DBA, MAM, PNA, SBA)によるELISA法で行った。アナフィラキシー抑制作用の最も強い1300mM NaCl 溶出画分のAALに対する反応が高かった。AALは糖鎖の末端フコースを認識するレクチンであり、活性を持つ脂溶性因子がフコースを含む糖鎖をもつ可能性が示唆された。他のレクチンは顕著な反応性を示さなかった。血中抗OVA抗体の糖鎖解析は、レクチン(AAL, DSA)によるELISA法で行った。繰り返し免疫した血清を、OVAをコートしたウェルに添加、洗浄後にレクチンの反応性を調べたが、レクチン反応性に大きな差は見られなかった。このことから、今回の免疫モデルマウスの系において、これまでの解析ではアナフィラキシー反応の抑制と抗体IgG糖鎖変化に関連は認められなかった。繰り返し免疫後の抗体IgG糖鎖構造の変化について、引き続き、質量分析の手法を用いて解析を行っている。

引用文献

1, The role of IgG carbohydrates in anaphylaxis: a possible way for antigen-specific anaphylaxis treatment by deglycosylated IgG. Guo, N., Liu, Y., Masuda, Y., Kawarada, Y., Kawagoe, M.,

Yoshikawa, K., Kameda, T. and Sugiyama, T.
Biomed. Res., 24, 291-297 (2003).

2. Repeated immunization induces the increase in
fucose content on antigen-specific IgG N-linked
oligosaccharides.

Guo N., Liu Y., Masuda Y., Kawagoe M., Ueno
Y., Kameda T. and Sugiyama T. Clin Biochem.,
38, 149-53 (2005).

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 1 件)

1. A humoral lipid preventing from mouse
anaphylactic death. Masuda Y., Koyota S.,
Sugiyama T. Akita J. Med. 42, 37-41, 2015

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

増田豊 (MASUDA YUTAKA)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号: 20199706

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小代田宗一 (KOYOTA SOUICHI)

秋田大学バイオサイエンス教育・研究セン

ター分子医学部門・准教授

研究者番号: 80400480