

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670274

研究課題名(和文)好塩基球細胞株を用いた新規アレルギー検査法の開発

研究課題名(英文)Novel Blood Allergen Test using the Basophil Cell Strain

研究代表者

八木 久子(yagi, hisako)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50717832

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)：特異的IgE検査の簡便さと好塩基球活性化試験(BAT)の正確性を併せ持つ好塩基球細胞株をベースにしたアレルギーによる活性化試験法の開発を目的とした。まず幼弱好塩基球細胞株の効率よい分化培養系を確立し、更にクローニングし高いFcεRI発現を示す株を樹立。次にⅠ型アレルギー患者血清を用いてフローサイトメトリーで好塩基球活性化マーカー(CD164等)測定を行い、抗原特異的活性化を確認。しかし細胞株の自発的活性化がみられたため、刺激前に細胞洗浄を行い刺激による脱顆粒反応時に分泌されるトリプターゼ活性を測定した。測定は簡便で自発的活性化の影響が少なくBAT法の欠点を補完する手法になりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a novel allergen test using a basophil cell line that possesses both the simplicity of the serum specific IgE measurement and the specificity of basophil activation test (BAT) for the diagnosis of IgE-mediated allergic diseases. We established an efficient differentiating culture system of an immature basophil cell line and subcloned a cell line that highly expresses Fcε receptor 1. We incubated the cells with serum from patients with Japanese cedar pollinosis, activated it with the allergen, and determined the expression of basophil activation markers, such as CD164, with flow cytometry. Since spontaneous activation of the cells impaired the detection of allergen-specific activation, we measured the activity of tryptase, which is released upon degradation. The tryptase activity increased upon allergen stimulation, indicating that this new method was simple and easy, while complementing the drawbacks of a BAT assay.

研究分野：小児アレルギー

キーワード：アレルギー検査 好塩基球 特異的IgE抗体 Ⅰ型アレルギー

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーや花粉症などの I 型アレルギー患者は増加の一途をたどっており、医療経済的にも大きな負担となっている。その対策には精度の高い診断に基づいた治療あるいは予防が重要である。

現在、アレルギー検査として広く利用されている特異的 IgE 抗体検査法 (Radioallergosorbent Test, 以下 RAST 法) は、定量的であり多種抗原が一度に解析できる利点があるものの、その結果は必ずしも生体内での反応と一致しない。これを補う検査として近年、好塩基球活性化試験 (Basophil Activation Test, 以下 BAT 法) が開発された。BAT 法では、生きた好塩基球の表面上に結合した IgE 抗体とアレルゲンを反応させて、好塩基球の活性化の程度を細胞表面の活性化マーカー (CD203c, CD63 等) のフローサイトメトリー法による測定で評価する。

BAT 法では、アレルゲンによる細胞の活性化すなわち I 型アレルギー反応の初期の段階を直接検出するため、よりの確に症状を反映すると期待される。しかしながら、新鮮な末梢血を用いて検査することが前提となるため、末梢血全血を新鮮な状態で検査施設に送付する必要があることなど RAST 法と比較して検査としての制約が多いことや小児では採血量が多いなどの問題点がある。また、抗原濃度依存的に活性化が上昇するが、個人間で活性化の程度が大きく異なることが知られている。このことは、好塩基球自体の活性化能に個体差があることに起因していると考えられている。

そこで、以上の問題点を克服すべく、RAST 法の簡便さと、アレルギー反応の一部を *in vitro* で再現するという BAT 法の正確性を併せ持つ手法として、患者血清とヒト好塩基球細胞株を反応させた後に抗原で刺激する新規検査法の開発を考えるに至った。RAST 法のように患者検体は血清を使用するため長期保存が可能である点、細胞株を用いるため検査結果の標準化が容易に行える点などの利点が挙げられ、優れた検査となると期待される。

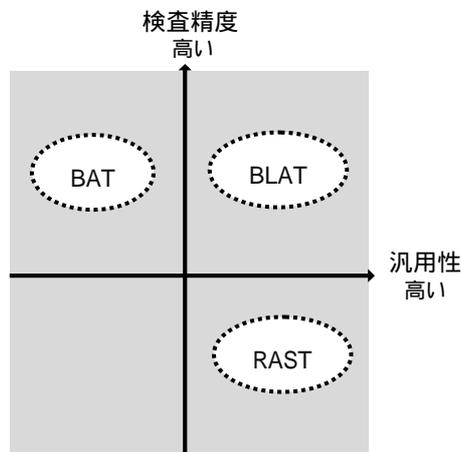


図 1. アレルギー検査の位置づけ

2. 研究の目的

RAST 法の簡便さと、BAT 法の正確性を併せ持つ手法を開発することを目的として、好塩基球細胞株をベースにしたアレルゲンによる活性化試験 (Basophil cell Line Activation Test, 以下 BLAT) 法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 幼弱好塩基球細胞株 (KU812) の効率よい分化培養系の確立と、BLAT 法に最適化好塩基球前駆細胞株の樹立

KU812 は、高アフィニティ IgE レセプター (Fc RI) をほとんど発現していない幼弱好塩基球細胞である。既報の IL-4、IL-3 刺激を含め、いくつかの成長因子・サイトカイン・ケモカイン刺激による成熟法を確立する。成熟好塩基球への分化の度合いは、Fc RI 発現をフローサイトメトリーによる測定で評価し、分化に最適な条件を検討する。

同時に限界希釈法を用いて KU812 細胞をサブクローニングし、刺激でもっとも効率よく成熟好塩基球に分化する細胞株を樹立する。同細胞株をもっとも分化能の高いクローンを選択・樹立する。以降この細胞株を用いて実験を行う。

(2) I 型アレルギー患者の好塩基球活性化能の解析

確立された分化培養法、細胞株を用いて、患者末梢血血清を用いた BLAT 法を確立する。

I 型アレルギー患者あるいは対照末梢血を採取し血清を分離する。分離した血清を KU812 細胞に添加培養を行い、血清中の IgE を KU812 細胞表面の Fc RI に結合させる。洗浄後、アレルゲン、陽性コントロールとして抗 IgE 抗体を添加培養する。この時、同時に活性化マーカー抗体 (抗 CD63 抗体、抗 CD203c 抗体) を添加する。刺激培養後、洗浄してフローサイトメトリーで活性化マーカーを検出する。

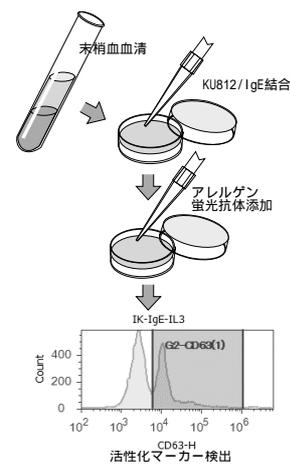


図 2. BLAT 法

(3) BLAT, BAT, RAST 法の比較

BLAT 法と同じサンプルの全血を用いて BAT 法を行う。全血を刺激培養液で希釈後、アレルゲン、抗 IgE 抗体、および好塩基球ゲーティング用抗体 (抗 CD3, 抗 CCR3) 活性化マーカー抗体 (抗 CD63 抗体、抗 CD203c 抗体) を添加、培養する。フローサイトメトリーで、好塩基球集団をゲーティングし、

この集団の活性化マーカーを検出する。
同時に RAST 法も行い、ROC 分析（受信者動作特性曲線）を行い、BLAT、BAT、RAST 法それぞれの検査の有効性の比較を行う。

4. 研究成果

(1) 幼弱好塩基球細胞株 (KU812) の分化培養系の確立と好塩基球前駆細胞株の樹立

幼弱好塩基球細胞株 (KU812) の効率よい分化培養系の確立

KU812 細胞を IL4、IL-3 等のサイトカインの存在下で培養し、成熟好塩基球への分化の度合いを、Fc RI 発現をフローサイトメトリーによる測定で評価した。結果、サイトカイン刺激により若干 Fc RI の発現量は上昇するものの、陽性細胞の比率は 20-25% であった。より安定して高感度な検査を確立するために、KU812 細胞株のクローニングを試みた。

BLAT 法に最適化された好塩基球前駆細胞株の樹立

通常の限界希釈法によるクローニングを試みたが、希釈することにより細胞の生存性・分裂能が著しく減少しクローンをえることができなかった。さらに、軟寒天内培養、メチルセルロース法によるコロニー形成法を用いてもクローンの取得は出来なかった。現在は、フィーダー細胞を用いることで限界希釈法によるクローニングが可能であることを見出し、19 種の KU812 細胞クローンを得ることに成功した。

(2) 確立した細胞株の機能解析

KU812 細胞クローンのスクリーニングのため、分化能 (Fc RI 発現量が高いか)、IgE 結合能、活性化能を調べた。

分化能の確認

抗 Fc RI 抗体を使用してフローサイトメトリーにて Fc R の発現量を IL3 刺激とサイトカイン無刺激で測定した。その後リアルタイム PCR で遺伝子を確認し、Fc R 発現の高いクローン (KU812/AC4 株) を以下の実験に用いた。

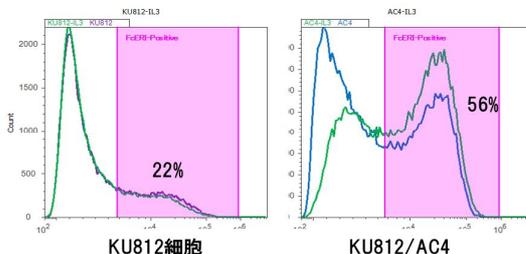


図 3. フローサイトメトリーによる Fc R 発現量の測定

KU812/AC4 株は高度に IgE レセプターを発現している。

IgE 結合能の確認

KU812/AC4 細胞をヒト IgE 蛋白に反応させ、フローサイトメトリーにて IgE 結合能を確認した。サイトカイン無刺激では Fc RI 発現細胞のうち、50-60% は IgE 結合能があることが判明した。次に細胞を各々サイトカイン無刺激、IL3、IL6、TNF 刺激下で分化能や IgE 結合能を測定したが、変わらなかった。

活性化能の確認

KU812/AC4 細胞にヒト IgE 蛋白を添加し IgE 結合させた後、抗 IgE 抗体で刺激し、フローサイトメトリーで好塩基球活性化マーカー (CD164、CD63、CD203 c) 量を確認した。その結果、CD203 c は全く変動なかったが、抗 IgE 抗体の刺激で CD63 と CD164 は活性化率の増加がみられた。

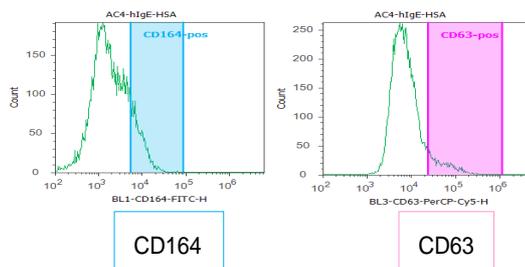


図 4. フローサイトメトリーによる活性化マーカー量の測定

(3) 型アレルギー患者血清を用いた抗原特異的活性化の確認

好塩基球活性化マーカー (CD164、CD63) 量の測定

KU812/AC4 細胞は好塩基球と同等の活性化機能があると判断し、実際の患者血清 (スギ花粉症) と抗原 (スギ花粉) を用いて、活性化するかをコントロールとともに確認した。

前培養時間を、40 時間と 16 時間の 2 通りで行った。結果、活性化細胞率 (/Fc R) は IL3 刺激条件では増加していたが、無刺激では低下していた。しかし活性化細胞数では、ともに増加していた。また、前培養時間は、40 時間より 16 時間の方が Fc R 陽性率や活性化率が高かった。

自発的活性化の抑制方法と新たなマーカーの検討

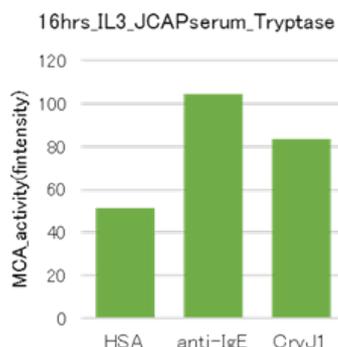
KU812/AC4 細胞は、高い FcER1 発現を示すものの、培養中に自発的に活性化し、結果として無刺激区においても一定の活性化マーカーの発現がみられた。自発的活性化を抑えるために、いくつかの可逆的な阻害剤による抑制培養を試みたが十分な成果は得られなかった。

そのため、自発的活性化の問題解決と検査としてより有利なものとするため、フローサイトメトリーではなくより簡便に検出が可能な活性化マーカーの検討が必要と考えた。

まずリアルタイム PCR で、KU812 細胞およびクローンのトリプターゼ遺伝子の発現を

確認したところ、KU812/AC4 細胞では Tryptase-Alpha/Beta1 の発現量が高いことが判明した。次に刺激培養によっておこる脱顆粒反応時に分泌されるトリプターゼの活性を測定した。刺激前に細胞を洗浄後、刺激をおこない培養上清を採取した。トリプターゼ活性の測定は、トリプターゼにより Boc-phe-Ser-Arg-MCA が加水分解をうけ遊離された AMC の濃度を蛍光プレートリーダーにより測定した。結果、ヒト IgE 蛋白およびスギ花粉患者血清を添加した細胞にそれぞれ、抗 IgE 抗体と Cry j 1 で刺激することによりトリプターゼの上昇がみられ、定量確認が可能であった。トリプターゼ活性の測定は簡便で刺激前の活性化の影響が少なかった。しかしながら少なからず自発的活性化がみられたため、より安定して培養可能な細胞株を新たに樹立する必要性を感じた。

表 1.トリプターゼ活性の測定
スギ花粉症患者に抗原(CryJ1)を刺激し測定



以上より、BLAT 法は RAST、BAT 法の双方の利点を有し、BAT 法の欠点を補完する優れた手法になりうるということが分かったが問題点も残っている、また BAT 法、RAST 法と比較することで有効性を実証するところまで至らなかった、今後、スギ花粉症患者に RAST、BAT 測定も行い、BLAT 法と比較する予定である。本法が開発されれば、アレルギー臨床の様々な局面で幅広く利用されるとともに、アレルギー研究分野にも非常に大きなインパクトかつ意義のあるものとなると期待される。

<引用文献>

Kleine-Tebbe et al, Int Arch Allergy Immunol, 141(1):79-90 2006

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 八木久子, 滝沢琢己, 佐藤幸一郎, 西田豊, 龍城真依子, 石毛崇, 小山晴美, 荒川浩一. 新生児・乳児消化管アレルギーにおける重症度と検査所見の関係について. 日本小児アレルギー学会誌 (査読あり) 30(1) 33-38 2016
2. 八木久子. カレースパイスによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FEIAn) の小

児例. 日本小児アレルギー学会誌 (査読あり) 8(3)391-393 2016

3. 八木久子, 消化管アレルギーの診断と治療. 食物除去と治療乳および成分栄養による治療. 小児内科 (査読なし) 48(9)1331-1334 2016

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 八木久子, 滝沢琢己, 佐藤幸一郎, 西田豊, 小山晴美, 荒川浩一, 分子病態からみた新生児・乳児消化管アレルギーの臨床像, 第 53 回日本小児アレルギー学会 2016.10.8-10.9 群馬県・前橋市

2. Yagi H, Takizawa T, Sato K, Nishida Y, Koyama K, Ishige T, Maiko T, Hatori R, Arakawa H. Severity Grading of Gastrointestinal Allergy in Infants, EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) Congress 2016, June 11-15 2016, Vienna(Austria)

3. 八木久子, 石毛崇, 佐藤幸一郎, 西田豊, 龍城真依子, 小山晴美, 滝沢琢己, 荒川浩一, 新生児・乳児消化管アレルギーにおける重症度と検査所見の関係について, 第 52 回日本小児アレルギー学会 2015.11.21, 奈良県・奈良市

4. 八木久子, 佐藤幸一郎, 西田豊, 小山晴美, 石毛崇, 滝沢琢己, 荒川浩一, 新生児・乳児消化管アレルギーにおける重症度分類の検討, 第 118 回日本小児科学会学術集 2015.4.16-4.18 大阪府・大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 久子 (YAGI, Hisako)
群馬大学・大学院小児生体防御学・助教
研究者番号: 50717832

(4) 研究協力者

滝沢 琢己 (TAKIZAWA, Takumi)

相澤 明 (AIZAWA, Akira)