

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18917

研究課題名(和文) IgE産生B細胞標的ペプチドによる花粉症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of IgE-producing B-cell targeting peptide to treat pollen allergy

研究代表者

野中 元裕 (Nonaka, Motohiro)

京都大学・薬学研究科・特定研究員

研究者番号：70514173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：花粉症を始めとするアレルギー疾患は年々患者数を増しており、今でもステロイドなどを用いた対処療法が中心である。本課題では、ファージディスプレイ法を用いて、アレルギー疾患の原因であるイムノグロブリンE(IgE)に結合するペプチドの取得、およびペプチドを利用した治療メカニズムの解明を目的とした研究を行った。ヒト骨髄腫細胞株U266由来の精製IgEを対象としてスクリーニングを実施したところ、IgEに特異的に結合するペプチドの配列を得た。一方、OVA感作型のアレルギー疾患のモデルマウスを用いた検討において、IgE結合ペプチドを予め投与したものの、血清IgE量に統計的有意差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of patients with allergic diseases such as pollen allergy have been increasing. Immunoglobulin E (IgE) is a main cause of those allergic diseases. In this study, we applied phage display system to determine the peptide sequences having the affinity to IgE. When we screened against IgE from human myeloma U266 cells, we obtained peptides with highly shared sequences. In contrast, total IgE was not changed in vivo when the allergic mice were injected with IgE-binding peptides.

研究分野：免疫学、ケミカルバイオロジー

キーワード：アレルギー ファージディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は患者数が急増しており、現在では国民の4人に1人が悩まされている。アレルギー疾患は、抗原提示細胞による抗原の取り込み、ヘルパーT細胞のTh1細胞への活性化、IgE抗体産生型のB細胞の分化促進から始まる。その後、分泌されたIgEは肥満細胞や好塩基球のIgE受容体上に保持され、アレルゲンがそれらIgEに結合するとヒスタミンなどのケミケルメディエーターが放出され、アレルギー症状を引き起こす。これまで、アレルギー疾患に対しては抗ヒスタミン薬やステロイド薬などの炎症を抑える治療法が主流であった。一方で、アレルギー疾患の病理メカニズムとしてイムノグロブリンE (IgE)が重要な働きをすることが知られており、IgEの機能を生体内で抑制することができればアレルギー症状を改善できるものとして、作用機序の研究が行われている。一例として、最近では抗原特異的免疫療法(減感作療法)が注目されている。これは、花粉の抽出液を患者に注射することで体内の抗アレルゲン中和抗体(IgG)の産生を高め、花粉症の元凶であるIgEの働きを競合的に阻害させようという治療法である。この試みはスギ花粉症患者において一定の成果を上げている(平成22年度厚生省報告)。さらに2014年には舌下投与による免疫療法の効果も認められ保険適用となった。しかしながら、最新の舌下免疫療法も従来型の注射療法と比較して100倍量の抗原を必要とすることや、長期投与の問題等も残されており、改善の必要がある。また、以前の臨床試験において、抗IgE抗体(Omalizumab)が体内のIgEを直接的に中和することで、アレルギー性鼻炎を改善したことが報告された[S. Masieri, et al., Eur Rev Med Pharmacol Sci, 20: 5249-5255, 2016]。アレルギー治療に用いるにはコストの問題が残されているが、今後、このようなIgEの機能抑制を目的とした研究が加速するものと考えられる。

ファージディスプレイ法[GP Smith, Science, 228: 1315-1317, 1985]は、ランダムに生合成させたペプチド断片を、T7ファージの頭部に提示させることで、標的分子に結合するペプチドを同定することができる。研究代表者が過去に所属した研究室では、T7ファージディスプレイ法を駆使し、腫瘍血管標的ペプチド[S Hatakeyama, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 19587-19592, 2011]や子宮内膜症組織標的ペプチド[K Sugihara, et al., Nature Commun, 5: 4478, 2014]を同定してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ファージディスプレイ法を利用してアレルギー疾患に対する治療効果を検討することにある。すなわち、まずIgEに特異的に結合するペプチドを、ファージデ

ィスプレイ法を用いて単離し、ヒト骨髄腫細胞株U266およびマウスモデルを用いて、アレルギー症状の緩和を検討することである。

3. 研究の方法

1) IgE結合ファージの取得

ヒト骨髄腫細胞株U266はATCCより購入した。U266細胞の培養には、10% FBS (fetal bovine serum), 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地を使用した。IgEのアフィニティー精製には、抗IgE抗体(Bethyl社)をHiTrap NHS-activated HP column (GE Healthcare社)にクロスリンクしたものをを用いた。実際にU266細胞培養上清よりIgEをアフィニティー精製する際にはAKTA startシステム(GE Healthcare社)を用いた。得られたIgEをMaxisorp wellに固相化し、7残基ランダムアミノ酸を提示したT7ファージライブラリー(1.2×10^{10} pfu)を加え反応させた。ウェルに結合しなかったファージをPBSTを用いて洗浄後、大腸菌(BL21)を加えIgEに結合したファージを大腸菌に感染させた。感染した大腸菌を2時間37°Cにて培養しファージを増殖させ大腸菌を溶菌させた。この操作を3回程繰り返しIgEに特異的に結合するファージを濃縮した。得られたファージのベクトル配列を取得した。

2) ペプチド配列の決定

濃縮されたファージの提示ペプチド部位をコードする塩基配列を次世代DNAシーケンサー(MiSeq, illumina社)によって同定した。MiSeq v2 試薬キット nano (リード長150 bp x2)を用いた。DNA配列をアミノ酸配列に変換し、出現配列のカウントを行い、上位にスコアリングされかつ高い相同性配列を持つペプチドを選択した。得られたペプチドを化学合成した。

3) アレルギーモデルマウスの作製

6週齢のBALB/c雌マウスにオボアルブミン(OVA)を1、8、15日目に皮下投与し感作させた。次に同アレルゲンを連日(22~28日)点鼻投与した。29日目に血清総IgE量を測定した。

4) IgE結合ペプチドの合成

OVA感作マウス由来の既知のIgEエピトープ配列[Mine et al., Biochimica et Biophysica Acta 1774: 200-212, 2007]のペプチドを合成し、アレルギーモデルマウス由来のIgEとの結合をELISA kit (Bethyl社)によって調べた。

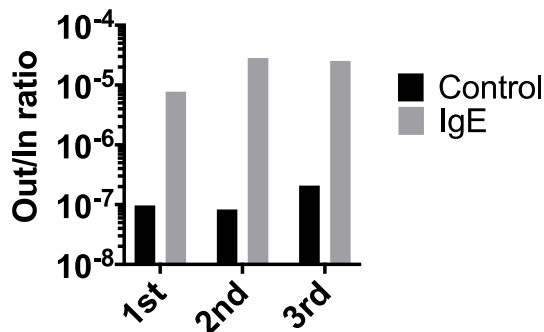
5) KLAKE ペプチドの活性

U266細胞の培養液にKLAKEペプチド[Ellerby et al., Nat Med, 5: 1032-8, 1999]を添加し、生細胞の割合をCellTiter-Gloを用いて定量した。

4. 研究成果

1)本研究ではまず、IgE に対するファージディスプレイ法の条件検討を行うために、ヒト骨髄腫細胞株 U266 [Ikeyama, et. al., Mol Immunol, 23: 159-167] 由来の IgE を用いてスクリーニングを行った。U266 細胞の培養上清 20 ml から、抗 IgE 抗体 (Bethyl lab 社) を用いたアフィニティー精製により 7.4 μ g の IgE が得られた。次に精製 IgE を Maxisorp well に固相化し、ファージライブラリーのスクリーニングを行った。ライブラリーとしては、7 アミノ酸残基よりなるランダムペプチド提示ファージを用いた。ライブラリーを添加後、結合しなかったファージを洗い除き、大腸菌液を加えて、ファージを回収した。この作業を 3 ラウンド行った。その結果、2 ラウンド目で大幅な Titer の上昇が見られた (図 1)、3 ラウンドではさらなる濃縮は認められなかったものの、Control と比較して十分な数のファージが得られたことから DNA シーケンスへと進んだ。

図1 IgEに対するスクリーニング



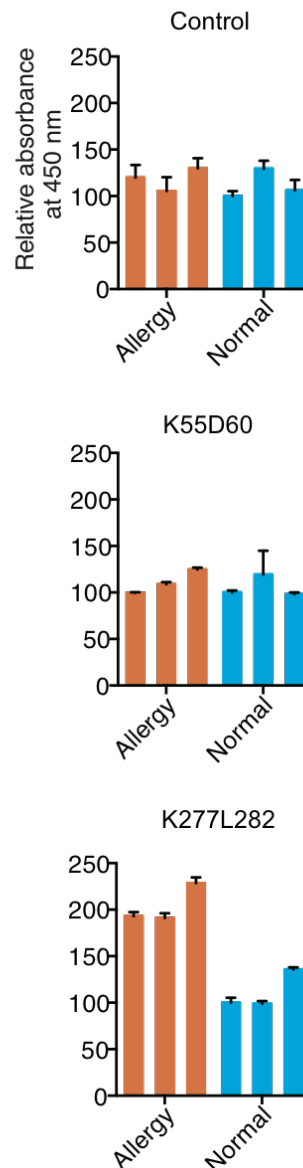
2)上記 U266 細胞由来の IgE に結合したペプチドとして、26 種類を取得し、配列の中から複数の相同性を見出すことができた。さらに、より網羅的にペプチド配列を調べる目的で、次世代 DNA シーケンサー (Miseq, illumina 社) を用いて、取得したファージのランダム DNA 配列の deep sequencing を行った。その結果、C 末端側の 3 アミノ酸配列に高い相同性をもつ配列が検出された。

3)アレルギーモデルマウスを作製した (方法参照)。マウスより血清を調製し、血清に含まれている IgE を ELISA 法によって測定したところ、総 IgE 量がコントロールマウスでは 25 ng/ml 以下であったのに対し、アレルギーモデルマウスでは 150 ng/ml 以上であり、IgE 量が上昇したことを確認した。

4) Mine らの報告 (Biochimica et Biophysica Acta 1774: 200-212, 2007) では、エピトープマ

ッピングにより OVA 感作マウス由来の IgE エピトープ配列が複数同定されている。そのうち、K55D60、K277L282 ペプチドを化学合成し、本研究で作製したモデルマウス由来の IgE との結合を調べた。その結果、K277L282 配列が我々のモデルマウスの IgE に最も高い親和性を示した一方で、K55D60 配列は結合しないことを明らかにした (図 2)。

図2 OVAエピトープペプチドのIgEへの結合



5)OVA 感作マウスより血清を調製し、IgE を精製した。IgE に対するファージライブラリーのスクリーニングを行い、複数のペプチドを取得したものの、全てのアレルギーモデルマウスに共通して結合する配列は得られなかった。

6) OVA アレルギー性鼻炎モデルマウスにおいて K277L282 ペプチドによる炎症の軽減効果を確認する実験を行った。6 週齢 BALB/c 雌マウスに OVA を皮下投与し感作させた。

その後、OVA を連日点鼻投与し炎症を惹起すると同時に、K277L282 ペプチド或いはコントロールペプチド (50 µg/day) を腹腔投与した。その結果、K277L282 ペプチド投与群ではコントロールペプチド投与群に比べてわずかながらの total IgE 量の減少傾向がみられたものの、統計的有意差は得られなかった。

7) U266 細胞に対する KLAKE ペプチド (Sugihara et al Nature Commun 5: 4478, 2014) の感受性を調べた。U266 細胞では、KLAKE ペプチドの低濃度存在下 (50-100 µM) において細胞死が認められた。以前の報告から、この濃度では A314 細胞では細胞死がほとんど認められなかったことから U266 細胞は KLAKE ペプチドに対して高い感受性を示すことが示唆された。

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)

M Nonaka

Function of the glycosyltransferase GnT-V in colitis

J Gastroenterology, 51, 406-408, 2016

doi: 10.1007/s00535-015-1156-y

[学会発表](計 2 件)

野中元裕、赤間智也、中山淳、福田道子
糖鎖模倣ペプチドを用いた悪性脳腫瘍の
治療戦略

第 36 回日本糖質学会年会

M Nonaka, Michiko N. Fukuda

Chemotherapy against malignant brain cancer by tumor-targeting peptide

第 76 回日本癌学会学術総会

[図書](計 3 件)

野中元裕、Minoru Fukuda

IBD 病態理解に約立つ糖鎖機能の基礎

IBD Research, 11, 7-12 (2017).

福田道子、野中元裕: 『ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術 (糖鎖模倣ペプチドによる悪性腫瘍治療薬の開発)』、[株] 技術情報協会、第 6 章、229-236 (2017)

M. Nonaka, M. Fukuda:

Glycosignals in Cancer: Mechanisms of Malignant Phenotypes (Expression and Function of Poly-N-Acetylactosamie Type Glycans in Cancer)

Springer Japan, 141-161 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 元裕 (Motohiro Nonaka)

京都大学・大学院薬学研究科・特定研究員

研究者番号: 70514173