

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年4月28日現在

機関番号：13701
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2008～2010
課題番号：20380172
研究課題名（和文） イヌのアトピー性皮膚炎に対するイヌキメラ抗IgE抗体を用いた新規治療法の開発
研究課題名（英文） Development of a novel therapy for canine atopic dermatitis with chimera IgG of anti-canine IgE antibody
研究代表者
前田 貞俊（MAEDA SADATOSHI）
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：50377694

研究成果の概要（和文）：イヌのアトピー性皮膚炎に対する新規治療法を開発する目的としてイヌ IgE と肥満細胞の結合を阻害する抗イヌ IgE 抗体の作製を試みた。イヌ IgE の肥満細胞結合部位の遺伝子組み換え体を免疫源として 10 クローンのモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は肥満細胞と IgE の結合およびアレルギー介在性の脱顆粒を阻止できなかった。

研究成果の概要（英文）：We tried to produce anti-canine IgE antibodies that could inhibit a binding of IgE to mast cells in order to develop a novel therapy for canine atopic dermatitis. Ten clones of the antibodies were generated by immunization of recombinant protein of the mast cell binding sites of IgE. The present results indicated that the antibodies could not inhibit a binding IgE to mast cells and also an allergen-mediated degranulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：臨床獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：アトピー性皮膚炎、動物モデル、イヌ、IgE

1. 研究開始当初の背景

(1)イヌのアトピー性皮膚炎(AD)は臨床現場で一般的な疾患であり、その患者数も増加しているにも関わらず、治療は副腎皮質ステロイド剤の投薬による対症療法に終始している。そのため、ステロイドによる副作用発現を予防する観点からも、ステロイドに替わる

有効な治療法の開発が急務である。

(2)ADを有するイヌの約70%がハウスダストマイトに対するアレルギー特異的IgEを保有しており、これらのアレルギー特異的IgEは皮膚に存在する肥満細胞と結合することによってI型過敏症を引き起こす。これらのアレルギー特異的IgEの多量産生はIL-4や

IL-13 などのサイトカインを産生する Th2 型細胞数の増加に起因していることが明らかとなっている。したがって、T 細胞活性化の特異的な抑制によって臨床症状を軽減できるが、AD 病変の迅速な寛解導入のためには、T 細胞の不活化により IgE 産生 B 細胞クローンを減少させるだけでなく、すでに存在する B 細胞から産生される IgE のエフェクター機能を阻害することが重要である。したがって有効性の高い治療を実践していくためには、T 細胞をターゲットとした治療のみならず、体内にすでに存在する IgE の肥満細胞への結合を阻害させる治療を併用する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は肥満細胞の脱顆粒を抑制できる抗イヌ IgE 抗体を作製し、イヌ AD に対する新規治療法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 抗イヌ IgE モノクローナル抗体の作製

イヌ IgE に対する認識特異性の向上および $Fc\epsilon RI$ への結合阻害能を付加させるために、イヌ IgE CH3 領域のリコンビナント蛋白および同領域をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクター (pCAGGS) を用いてマウスおよびラットを 3 回 ($100\mu g$ を 1 回筋肉内注射/2 週間) 免疫した。抗体価上昇の認められたマウスおよびラットから脾臓を摘出し、定法に従ってモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体クローンの IgE 認識能およびエpitepをマッピングするために、精製イヌ IgE (Bethyl Laboratories) およびイヌ IgE CH3 領域のアミノ酸配列を網羅するように設計したオーバーラッピングペプチド (それぞれ 15 残基を含むペプチドを 19 種類) を用いて ELISA を行った。精製イヌ IgE またはオーバーラッピングペプチドを固相化バッファーを用いて $1\mu g/mL$ に調整し、それぞれをマイクロプレートに $100 ng$ ずつ固相化した ($4^{\circ}C$ で一晩)。固相化したマイクロプレートにはハイブリドーマの培養上清をブロッキング液 (1%BSA を含む DPBS) を用いて 10 倍に調整したものを添加し、室温で 2 時間反応させ

た。その後 PBST を用いて洗浄した後、二次抗体として HRP-Goat Anti Mouse IgG、(ZYMED) を添加し、さらに 2 時間反応させた。発色は $100\mu l$ の OPD 試薬によって行い、 $1.5N$ の硫酸を用いて反応を停止した後、マイクロプレートリーダー (Dual: 測定 $490nm$ 、対照 $655nm$) を用いて吸光度を測定した。

(2) 抗イヌ IgE モノクローナル抗体によるイヌ IgE と $Fc\epsilon RI$ の結合阻害能の評価

イヌ IgE としてハウスダストマイト抗原 (Der f 2) を用いて感作したイヌより得た血清を使用した。血清はフローサイトメーターシース液 (BD FACS Flow、BD Biosciences) を用いて 20% (IgE 量として約 $5\mu g/ml$) に調整した。また、抗イヌ IgE モノクローナル抗体 (CCH3-5、CCH3-12、CCH3-13、CCH3-14 はそれぞれ 5 、 10 、 20 および $40\mu g/ml$ 、CCH3-4、CCH3-15、CCH3-21、CCH3-22、X-1、X-2 はそれぞれ 5 および $40\mu g/ml$) は DPBS を用いてそれぞれの濃度に調整した。血清と各濃度に調整した抗イヌ IgE モノクローナル抗体を混和し、 $37^{\circ}C$ で 1 時間反応させ、これを試験サンプルとした。また、陰性対照として 1% ヤギ血清添加 DPBS のみ、陽性対照として同量のイヌ血清と 1% ヤギ血清添加 DPBS を含む反応液をそれぞれ作製した。 $Fc\epsilon RI$ の発現が明らかにされている肥満細胞株 (HRMC) に 1% ヤギ血清添加 DPBS を加え $4^{\circ}C$ で 30 分間静置し、ブロッキング処理を行った。遠心分離 ($1,500 rpm$ 、室温、5 分間) 後、上清を取り除き、作製した試験サンプルを添加し、 $4^{\circ}C$ で 1 時間反応させた。その後 1% ヤギ血清添加 DPBS を用いて HRMC を洗浄し、二次抗体として FITC 標識ヤギ由来抗イヌ IgE 抗体 ($10 mg/ml$ 、Bethyl Laboratories) を加え、 $4^{\circ}C$ で 1 時間、遮光して反応させた。1% ヤギ血清添加 DPBS を用いて洗浄後、フローサイトメーターを用いて IgE 結合の有無を評価した。陽性対照細胞集団のピークにおける蛍光強度と比較して、抗イヌ IgE モノクローナル抗体を添加した細胞集団のピークにおける蛍光強度が左方に変移にした場合、イヌ IgE と $Fc\epsilon RI$ の結合が阻害されたと判断した。

(3) 抗イヌ IgE モノクローナル抗体-イヌ IgE

複合体の検出

1%ヤギ血清添加 DPBS を用いて各濃度に調整した精製イヌ IgE (0.125、0.25、0.5、1 および 5 μ g/ml, Bethyl Laboratories) および DPBS を用いて調整した抗イヌ IgE モノクローナル抗体 (5 μ g/ml, CCH3-5) を 37°C で 1 時間反応させ、これを試験サンプルとした。また、陰性対照として 1%ヤギ血清添加 DPBS のみ、陽性対照として精製イヌ IgE と 1%ヤギ血清添加 DPBS を含む反応液をそれぞれ作製した。これらの反応液を HRMC に添加し、4°C で 1 時間反応させた。二次抗体として FITC 標識ヤギ由来抗イヌ IgE 抗体 (20 μ g/ml) または R-フィコエリスリン (R-PE) 標識ヤギ由来抗マウス IgG 抗体 (50 μ g/ml, SouthernBiotech) を加え、4°C で 1 時間遮光して反応させた。その後、1%ヤギ血清添加 DPBS を用いて HRMC を洗浄し、フローサイトメーターによって、Fc ϵ RI に結合したイヌ IgE と抗イヌ IgE モノクローナル抗体の複合体を検出した。FITC 標識ヤギ由来抗イヌ IgE 抗体の検出において抗イヌ IgE モノクローナル抗体を添加した細胞集団のピークにおける蛍光強度が陽性対照細胞集団におけるものと同様な傾向を示した場合、イヌ IgE が Fc ϵ RI に結合したと判断した。さらに、R-PE 標識ヤギ由来抗マウス IgG 抗体の検出においては、抗イヌ IgE モノクローナル抗体を添加した細胞集団のピークにおける蛍光強度が陰性対照細胞集団におけるもの比較して右方に変移にした場合、マウス由来抗イヌ IgE モノクローナル抗体-イヌ IgE 複合体が Fc ϵ RI に結合していると判断した。

(4) 抗イヌ IgE モノクローナル抗体による肥満細胞の脱顆粒抑制効果の評価

Der f 2 で感作したイヌから血清を採取し、Der f 2 特異的 IgE 量が 5 μ g/ml になるよう Tyrode' s buffer を用いて調整した。抗イヌ IgE モノクローナル抗体 (CCH3-5) は 40 μ g/ml になるよう Tyrode' s buffer を用いて調整した。これらを 37°C で 60 分反応させたものをサンプルとした。この際、抗イヌ IgE モノクローナル抗体を含まないものを陰性対照とした。HRMC は Tyrode' s buffer を用いて洗浄後、サンプルおよび陰性対照を添加して

37°C で 12 時間感作させた。感作後、HRMC を回収し、リコンビナント Der f 2 (10 μ g/ml) を添加して脱顆粒を誘起した。陽性対照としては Ca²⁺イオノフォア A23187 (Sigma, 10 μ M) を用いた。37°C で 60 分間培養した後、細胞および培養上清を回収した。細胞は triton X を含む Tyrode' s buffer を用いて再懸濁した。5 μ l の細胞懸濁液および培養上清のそれぞれに 50 μ l の p-nitrophenyl N-acetyl- β -glucopyranoside (Sigma) を添加し 37°C で 40 分間反応させた。それぞれに 150 μ l の反応停止液を添加した後、プレートリーダーを用いて吸光度を測定し、 β -hexosaminidase release (%) を算出した。

4. 研究成果

(1) 抗イヌ IgE モノクローナル抗体の作製 (図 1)

今回の研究において、6 クローンのマウス由来 (CCH3-4、CCH3-5、CCH3-12、CCH3-13、CCH3-14 および CCH3-15) およびラット由来 (CCH3-21、CCH3-22、X-1 および X-2) のモノクローナル抗体を作製することができた。いずれの抗体もイヌ IgE に対して高い特異性を示し、これらのエピトープはある特定の領域に集中する傾向にあった (peptide 3、11、16 および 17)。また、Fc ϵ RI との結合部位であると予想される領域 (peptide 4 および 10) に対してエピトープを有する抗体 (CCH3-5) も得ることができた。

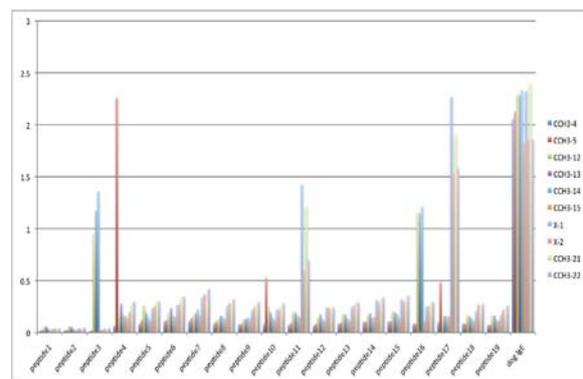


図 1

(2) イヌ IgE と Fc ϵ RI の結合阻害能の評価 代表例として CCH3-5 のフローサイトメト

りの結果を図 2 (紫の領域は陰性対照で、その他の色線はそれぞれの抗体濃度の結果である) に示す。その他の抗体も含めて、いずれの濃度においても IgE と肥満細胞の結合阻害効果は認められなかった (表 1)。

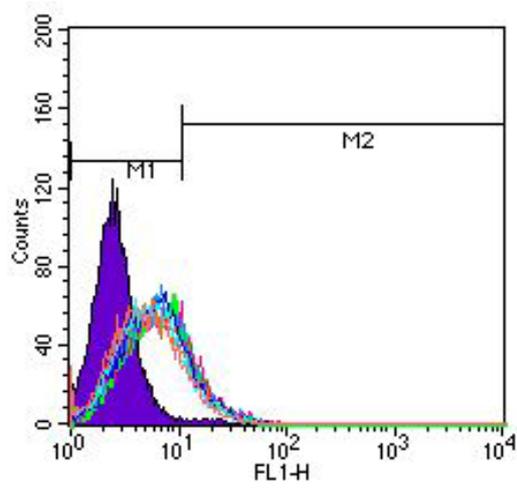


図 2

表 1 モノクローナル抗体によるイヌ IgE と FcεR1 の結合阻害能

抗体クローン	抗体濃度			
	5 μg/ml	10 μg/ml	20 μg/ml	40 μg/ml
CCH3-4 (マウス)	-	NA	NA	-
CCH3-5 (マウス)	-	-	-	-
CCH3-12 (マウス)	-	-	-	-
CCH3-13 (マウス)	-	-	-	-
CCH3-14 (マウス)	-	-	-	-
CCH3-15 (マウス)	-	NA	NA	-
CCH3-21 (ラット)	-	NA	NA	-
CCH3-22 (ラット)	-	NA	NA	-
X-1 (ラット)	-	NA	NA	-
X-2 (ラット)	-	NA	NA	-

(-) : 阻害効果なし ; NA : 実施せず

(3) 抗イヌ IgE モノクローナル抗体-イヌ IgE 複合体の検出

FITC 標識ヤギ由来抗イヌ IgE 抗体の検出結果を図 3 に示す (IgE: 5 μg/ml; 紫の領域は陰性対照、緑線は陽性対照、赤線は試験サンプルである)。試験サンプルの蛍光強度は陽性対照と同様であったことから、抗イヌ IgE モノクローナル抗体存在下においても精製 IgE は肥満細胞に結合していることが明らかとなった。

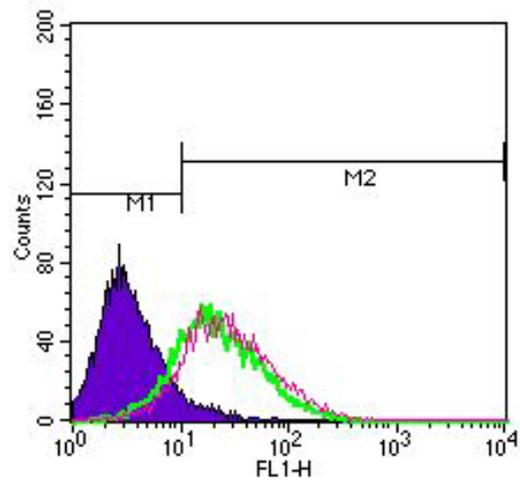


図 3

さらに、R-PE 標識ヤギ由来抗マウス IgG 抗体の検出結果を図 4 に示す (IgE: 5 μg/ml; 灰色の領域は陰性対照、緑線は陽性対照、赤線は試験サンプルである)。試験サンプルの蛍光強度のピークは陽性対照よりも高いことから、抗イヌ IgE 抗体は肥満細胞に結合していることが明らかとなった。以上の結果より、抗イヌ IgE モノクローナル抗体は IgE と複合体を形成した状態で肥満細胞に結合している可能性が示された。

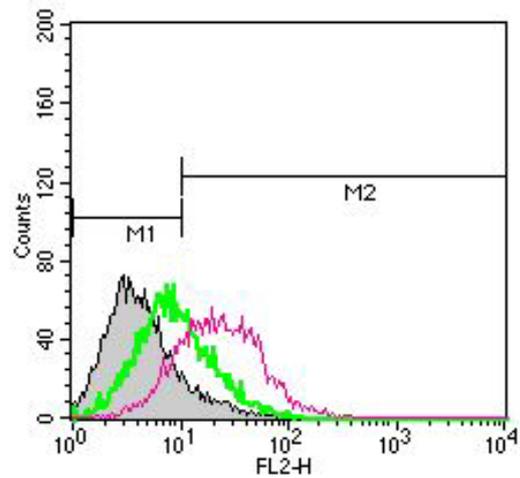


図 4

(4) 肥満細胞の脱顆粒抑制効果の評価

抗イヌ IgE モノクローナル抗体は IgE と複合体を形成して肥満細胞に結合している可能性が示されたことから、本抗体がアレルギー介在性の脱顆粒を抑制できるかどうかを検討した。本実験で用いた肥満細胞は Der f 2 の添加によって脱顆粒したが、抗イヌ IgE モ

ノクローナル抗体はこの脱顆粒を抑制することはできなかった (図 5)。

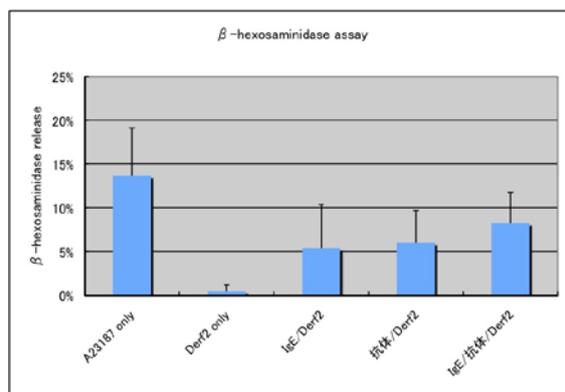


図 5

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 8 件)

- ①Naoki Chimura, Sanae Shibata, Tsuyoshi Kimura, Naho Kondo, Takashi Mori, Yuki Hoshino, Hiroaki Kamishina, Sadatoshi Maeda, Suitable reference genes for quantitative real-time RT-PCR in total RNA extracted from canine whole blood using the PAXgene™ system, *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有、in press.
- ②Sanae Shibata, Sadatoshi Maeda, Naho Kondo, Naoki Chimura, Akiko Inoue, Tsuneo Fukata, Identification of the signaling pathway of TNF-alpha-induced CCL17/TARC transcription in a canine keratinocyte cell line, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 査読有、139、90-98、2011.
- ③Sanae Shibata, Sadatoshi Maeda, Naho Kondo, Akiko Inoue, Naoki Chimura, Tsuneo Fukata, Effect of recombinant canine interferon-gamma on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, transforming growth factor-beta and CC chemokine ligand 17 mRNA transcription in a canine keratinocyte cell line (CPEK), *Vet. Dermatol.*, 査読有、22、24-30、2011.

④Sanae Shibata, Sadatoshi Maeda, Naoki Chimura, Naho Kondo, Tsuneo Fukata, Augmentation of CCL17 and CCL28 gene expression by TNF-alpha, IL-1beta, or IFN-gamma in cultured canine keratinocytes, *Res. Vet. Sci.*, 査読有、88、422-426、2010.

⑤Shingo Maeda, Sadatoshi Maeda, Sanae Shibata, Naoki Chimura, Tsuneo Fukata, House dust mite major allergen Der f 1 enhances proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in a cell line of canine epidermal keratinocytes, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 査読有、131、298-302、2009.

⑥Shingo Maeda, Sadatoshi Maeda, Sanae Shibata, Naoki Chimura, Tsuneo Fukata, Molecular cloning of canine protease-activated receptor-2 and its expression in normal dog tissues and atopic skin lesions, *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有、71、577-582、2009.

⑦ Takuya Mizuno, Satoshi Kanbayashi, Takumi Okawa, Sadatoshi Maeda, Masaru Okuda, Molecular cloning of canine interleukin-31 and its expression in various tissues, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 査読有、131、140-143、2009.

⑧Sanae Shibata, Sadatoshi Maeda, Hiromi Tsuchida, Tsuneo Fukata, Phenotypic analysis for a cell line of canine epidermal keratinocytes, *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有、70、853-855、2008.

[学会発表] (計 2 件)

- ①千村直輝 (前田貞俊)、イヌの上皮向性リンパ腫病変部におけるリンパ球遊走関連分子の遺伝子発現解析、第 150 回日本獣医学会学術集会、平成 22 年 9 月 16 日、帯広
- ②前田貞俊 (前田貞俊)、アトピー性皮膚炎の免疫病態におけるケラチノサイトの役割、第 6 回動物サイトカイン研究会学術集会、平成 21 年 9 月 26 日、宮崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 貞俊 (MAEDA SADATOSHI)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：50377694

(2) 研究分担者

水野 拓也 (MIZUNO TAKUYA)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：90398826

(3) 研究協力者

津久井 利広 (TSOHIHIRO TSUKUI)

日本全薬工業株式会社・主任研究員

研究者番号：