

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780092
 研究課題名（和文） B細胞機能に着目した食品アレルギーの発症機構の解明と新規予防法の確立
 研究課題名（英文） Prevention of allergy by the regulation of B cell functions
 研究代表者 好田 正（YOSHIDA TADASHI）
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・助教
 研究者番号：20302911

研究成果の概要：

本研究では、B細胞抗原レセプター（BCR）との親和性の異なる抗原でB細胞を刺激することによるB細胞の応答性の変化およびそのメカニズムを解析し、これをもとにアレルギーを起こさないようにB細胞の機能を制御する方法を確立することを目的とした。本研究の結果、表面構造を変化させた抗原はT細胞に依存せずにB細胞に直接作用することで異なったB細胞応答を誘導することが明らかとなった。この際、BCRとの親和性が高い抗原はIgEを、低い抗原はIgG1を誘導しやすいことが示唆された。また、BCRとの親和性が異なる抗原が異なったB細胞応答を誘導するメカニズムとして、Sykなどの細胞内シグナル分子の活性化能が異なっていることが一因であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：アレルギー，B細胞，抗原構造，親和性，細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

近年アレルギー疾患の患者は増加の一途をたどり日本のみならず全世界において大きな社会問題となっている。しかしながら、現状では依然としてアレルギー疾患の発症メカニズムの解明が不十分であり、効果的な治療法

が確立されていない。各アレルギー患者がどの抗原に対してアレルギーを発症するのか、また、個人によってアレルギーを起こす抗原が異なるのはなぜか、といった根本的な疑問は全く解明されていない。申請者はこれまでにアレルギー患者のアレルゲン特異性の決

定に、B細胞抗原レセプター（BCR）とアレルゲンとの親和性が関与している可能性を明らかにした。この成果は、立体構造を改変したタンパク質を用いてアレルギー疾患の発症に関わる免疫応答をアレルゲン特異的に修飾することで、より効果的に、より安全にアレルギーの予防や治療を行うことが可能であることを示唆している。一方で、このメカニズムが様々なアレルギー疾患において共通のメカニズムであるかどうか、また、立体構造を改変したタンパク質がIgE産生を抑制する分子レベルでのメカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

本研究ではB細胞の機能に着目し、アレルギー疾患のメカニズムの解明とともに新規の治療や予防法の確立に繋がる知見を得ることを目的とする。BCRとの親和性の異なる種々の抗原でB細胞を刺激することによるB細胞の応答性の変化をシグナルレベルで解析するとともに、これをもとにB細胞の機能を任意に制御し、アレルギーの原因となるIgE抗体の産生を抗原特異的に抑制する方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究ではB細胞を刺激するアレルゲンタンパク質として牛乳由来の主要なアレルゲンであるβラクトグロブリン(β-LG)および、鶏卵由来のアレルゲンである卵白リゾチーム(HEL)を用いた。これらの天然型アレルゲンタンパク質に対して、S-S結合の切断、または抗原性を持たない多糖であるデキストランの化学修飾などにより、タンパク質表面の構造を改変しBCRに対する親和性を変化させた。化学修飾の架橋剤には水溶性カルボジイミドを用いた。作出した修飾タンパク質はHPLCを用いたイオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

(2) 上記1で得られた化学修飾β-LGおよび天然型β-LGを用いて、BALB/cマウスを免疫した。免疫後2, 4, 6週目に採血を行い血清を得た。血清中のβ-LG特異的IgE, IgG1抗体価をELISA法で測定し、抗原構造の変化が産生される抗体のクラスに与える影響を解析した。さらに、それぞれのタンパク質を免疫したマ

ウスの血清より抗原特異的なIgM抗体を精製し、天然型と変異型タンパク質に対する親和性を競合ELISA法で測定した。

(3) 天然型β-LGを用いてBALB/cマウスを免疫した。免疫後3日目にマウスより脾臓細胞を採取し、ポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞株と細胞融合を行った。限界希釈の後、IgG1およびIgEを産生するモノクローナル抗体を得た。競合ELISA法によってこれらの抗体とβ-LGおよび化学修飾β-LGとの親和性を測定した。

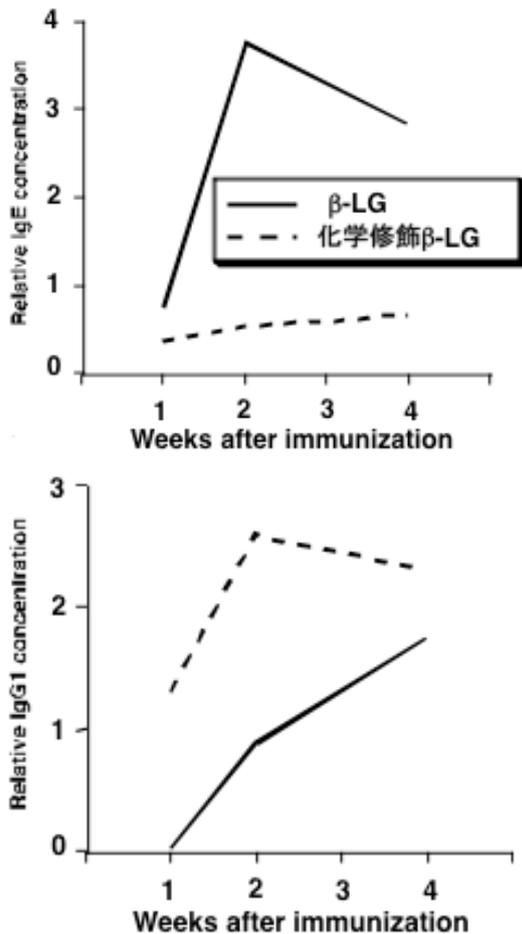
(4) 還元カルボキシメチル化(RCM)HELおよび天然型HELを用いて、抗HEL-BCR発現トランスジェニックマウス由来のB細胞を*in vitro*で刺激した。B細胞は未処理トランスジェニックマウスの脾臓よりMACS法により精製した。刺激後に増殖応答および上清を回収して抗体産生量をELISA法により測定した。

(5) 上記と同様にトランスジェニックマウス由来B細胞を刺激した。刺激の30分後に細胞を溶解し、細胞内に存在するタンパク質溶液サンプルを調製した。得られたサンプルをSDS-PAGE電気泳動、ウェスタンブロッティングに供することで、RCM-HELおよび天然型HELによって導入されるBCRシグナルの差異を解析した。解析の標的タンパク質としてはBCRシグナル伝達の上流に位置するSykに着目した。

4. 研究成果

(1) 本研究ではB細胞を刺激するタンパク質としてβ-LGおよびHELを用いる。まず、β-LGにカルボキシメチルデキストランを水溶性カルボジイミドを用いて付加した。次に、HELを還元およびカルボキシメチル化した。これにより、タンパク質の構造を改変しBCRに対する親和性を変化させたアナログ抗原を作出した。

(2) 上記1で得られたカルボキシメチルデキストランとβ-LGの複合体および天然型β-LGを用いて、BALB/cマウスを免疫した。免疫後2, 4, 6週目に採血を行い、血清中の抗原特異的IgEおよびIgG1抗体価を測定した。その結果、複合体は天然型と比較して、強いIgG1産生を誘導した。一方でIgE産生誘導能は弱かった。この結果は抗原構造の変化が誘導する抗

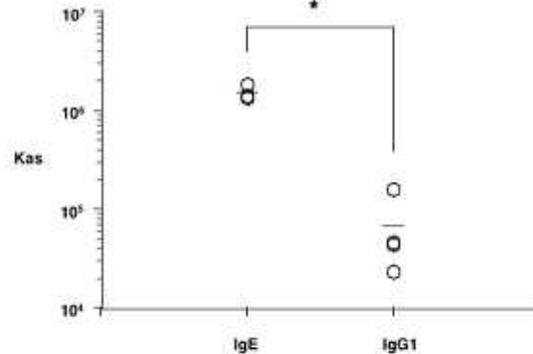


体のクラスに影響を与えたことを示唆している。さらに、それぞれのタンパク質を免疫したマウスの血清より抗原特異的なIgM抗体を精製し、天然型と修飾タンパク質に対する親和性を測定した。その結果、抗原と親和性の高いIgMを発現するB細胞はIgEを、親和性の低いIgMを発現するB細胞はIgG1を産生しやすい可能性が示唆された。

(3) 上記2より、複合体は天然型の β -LGと比較してIgEを誘導しにくく、IgG1を誘導しやすいことを明らかにした。このメカニズムを明らかにするために、両抗原で免疫したマウスのT細胞応答の差異を解析した。その結果、複合体は天然型と比較して、低いIL-4、IFN- γ 、TGF- β 、IL-10の産生能を持つT細胞を誘導した。この結果からは、なぜ複合体がIgEを誘導しにくく、IgG1を誘導しやすいのかを説明することが出来ず、複合体の抗体産生に対する影響はT細胞を介さないメカニズムにより制御されていることが示唆された。

(4) 上記の結果より、複合体はB細胞に直接働きかけてIgEとIgG1の誘導に影響を与えていることが示唆された。そこで、同じ抗原を

認識するIgEとIgG1の抗原に対する親和性の差異を解析した。天然型 β -LGを用いてBALB/cマウスを免疫した。免疫後3日目に脾臓細胞を採取し、ハイブリドマを作成した。限界希釈の後、IgG1およびIgEを産生するそれぞれ4および3株のモノクローナル抗体を得た。これらの抗体と β -LGとの親和性を測定した結果、IgEはIgG1よりも抗原に対する親和性が高かった。この結果は、上述の仮説を強く支持するものであった。



(5) 次に、BCRとの親和性の異なる抗原が、B細胞に与える影響を直接的に解析した。天然型のHELでHEL特異的B細胞を刺激すると増殖応答・抗体産生応答ともに濃度依存的に増加するのに対し、RCM-HELを用いて刺激した場合には高濃度で各応答が強く抑制された。この結果は、BCRとの親和性の異なる抗原は全く異なるB細胞応答を誘導することを示している。

(6) 最後に、HELおよびRCM-HELでB細胞を刺激し、細胞内に導入されるシグナルを解析した。HELがSykの持続的で強いリン酸化を誘導したのに対し、RCM-HELは一時的な活性化しか誘導できなかった。このシグナルの違いが上述のようなB細胞応答や抗体産生に異なった影響を与える一因であると考えられる。

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 2件)

Tadashi Yoshida, Yuko Shigihara, Manami Nakamura, Hattori Makoto; Conjugate of β -lactoglobulin with carboxymethyl dextran increased the

antigen-specific IgG1 production, while it decreased IgE production compared with native β -lactoglobulin, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects 16, in press.

好田正, 鳴原裕子, 中村麻菜美, 渡部耕平, 服部誠; B細胞レセプターの抗原に対する affinity と IgE 抗体産生, 臨床免疫・アレルギー科, 2008, 50, 632-639.

〔学会発表〕(計 2件)

岡田知拓, 佐藤隆寛, 中村麻菜美, 服部誠, 好田正; 抗原アナログによるクラススイッチ制御機構の解析, 日本農芸化学会, 2010, 東京

Tadashi Yoshida, Yuko Shigihara, Manami Nakamura, Hattori Makoto; Conjugate of β -lactoglobulin with carboxymethyl dextran increased the antigen-specific IgG1 production, while it decreased IgE production compared with native β -lactoglobulin, The Japanese Association of Animal Cell Technology, 2008, Fukuoka.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

好田 正 (YOSHIDA TADASHI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・助教

研究者番号: 20302911

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし