

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08782

研究課題名（和文）IgEの架橋活性を指標とする新規セルフリーアレルギー試験法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Cell-Free Allergy Testing Method Based on IgE Crosslinking Activity

研究代表者

秋山 晴代（Akiyama, Haruyo）

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：50420229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：in vitroアレルギー試験法であるEXiLE法の最大の強みであるIgE間の架橋活性を検出する特徴を残したまま細胞を使用しないEXiLE法の開発に成功した。具体的には、ルシフェラーゼ相補システムを利用してFc RIの鎖に2種類の発光タグ(SmBiT及びLgBiT)を付加することで、セルフリー条件下でIgEと抗原の結合により導かれるIgE-Fc RI同士の架橋をルシフェラーゼ活性により評価する新しい試験法である。今後はさらなる条件検討を行い、実際のアレルギー患者血清について、既存のEXiLE法との応答性の違いについて比較検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した「セルフリーEXiLE法」は、培養の手間が省け利便性が増すだけでなく、既存のEXiLE法唯一の弱点である細胞毒性の問題を取り除くことができ、多くの抗原に対応可能なin vitroアレルギー試験法として非常に有益だと考えられた。さらなる検討が必要であるが、既存のEXiLE法と同様に、抗原特異的IgEのセカンドスクリーニングとして、生物学的に意義のあるIgEかどうかの評価や、IgEとFc RIとの結合阻害物質探索など、セルフリー系であることを活かしたハイスループットなドラッグスクリーニングにも応用出来る可能性があり、患者・医療者にとって極めて有用な知見がもたらされると期待される。

研究成果の概要（英文）：We have successfully developed a novel cell-free allergy testing method utilizing the basic concept of IgE-Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) method, i.e., detection of crosslinking activity between IgE molecules. Specifically, this cell-free EXiLE method utilizes a luciferase complementation system by adding two types of luminescent tags (SmBiT and LgBiT) to the chain of Fc RI. In the assay, the binding of IgE and antigen under cell-free conditions induces the crosslinking between IgE-Fc RI molecules, which is evaluated through luciferase activity. Hereafter, we will further investigate optimal conditions and compare the responses of actual allergic patients' sera with that of the original EXiLE method using genetically modified mast cells.

研究分野：アレルギー、生物系薬学、免疫学

キーワード：EXiLE法 架橋 Fc RI セルフリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では、アレルギー疾患は増加の一途を辿っており、人口の約2分の1が何らかのアレルギー疾患を持つといわれる。現在臨床で一般的に用いられているアレルギー試験法は、*in vivo*、*ex vivo*、*in vitro*の3種に分類でき、それぞれに一長一短がある。患者負担が少なく最も頻繁に利用されているアレルギー試験法 ImmunoCAP 法(*in vitro*)は、患者の血清や血漿を用いて測定でき、簡便で高感度ではあるが、偽陽性が多いという問題が知られている。このことから、患者負担が少なく信頼性の高い試験法の開発が待ち望まれていた。

我々は新しい *in vitro* アレルギー試験法として IgE-Crosslinking-induced Luciferase Expression(EXiLE)法を開発している。本法は、ヒトの高親和性 IgE 受容体(FcεRI)を発現させたラットの培養マスト細胞株(RS-ATL8)を、アレルギー患者血清により受動的に感作し、抗原の添加による細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイにより高感度に検出する手法で、保存された患者血清と培養細胞株により簡便かつ高感度に IgE の「架橋活性」を評価できる画期的な試験法である。本法を用いてシラカバとリンゴなど、*in vitro* で感度良く交差反応性を解析する手法を開発したほか、EXiLE 法が各種加工食品のアレルゲン性評価(加工に伴う抗原性の変化解析)法として有用であることを明らかにしている。ただ、本法にも患者血清や抗原添加による RS-ATL8 細胞への細胞障害性という弱点がある。細胞培養の手間や抗原の種類を選ばずに検査することが出来れば、アレルギー試験法としてより有用性を増すと考えられた。そこで申請者は、EXiLE 法の最大の特徴である架橋活性を検出するという強みを活かしつつ、細胞を使用しない「セルフリー-EXiLE 法」の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro* 試験法 ImmunoCAP 法よりも生理的な解析が可能で、かつ架橋活性を評価可能な EXiLE 法の唯一の弱点である細胞障害性を克服した新しいアレルギー試験法の開発を目指す。具体的には「ルシフェラーゼ相補システム」を利用して FcεRI の α 鎖に2種類の発光タグをつけ、セルフリー条件下で IgE と抗原の結合により導かれる FcεRI の架橋(タンパク質間相互作用)をルシフェラーゼ活性により評価する。タンパク質相互作用解析は多くの手法が開発されているが、近年目覚ましい発展を遂げている発光レポーターアッセイに着目した。NanoLuc®ルシフェラーゼの大きな断片である Large BiT(LgBiT)と、LgBiT に相補性を持つが親和性の低いペプチド断片 Small BiT(SmBiT)(Kd=190 μM)をそれぞれ FcεRI α 鎖との融合体として発現させて使用し、患者血清中 IgE 及び抗原共存下で、「架橋」が起こると断片が補完され発光する、というシステムを構築する。

3. 研究の方法

Fragment Complementation Assay のレポーターとしては NanoBit®を、リコンビナント FcεRI α 精製のタグとしては HaloTag(HT)を用いることとした。さらに最適な分子間相互作用実現のため、レポーター(SmBiT または LgBiT)とタグ(HT)は N 末端側・C 末端側双方の挿入位置に設置することとし(計4通り設計)-FcεRI α-レポーター配列を作製した(図1)。T7 プロモーターを有している HT 用ベクターの N 末端側と C 末端側に作製した配列(4通り)を挿入した遺伝子を作製した。作製した遺伝子を、T7 RNA 大腸菌プロテアーゼ等を含む大腸菌抽出液、アミノ酸、rNTP、tRNA 抽出液等を含む Premix 液と 37°C、1 時間の条件で反応させ、無細胞系によるタンパク質の誘導を行い、Halo レジンをを用いて精製を試みた。同様に PEI を用いた HEK293T 細胞へのトランスフェクションを行った。HT 用ベクターを用いて作製した FcεRI α-レポーター(NanoBit)配列の 5' 末端にプレプロトリプシンのリーダー配列を付加したベクターを新たに作製した。PEI を用いて HEK293T 細胞へのトランスフェクション後、培養上清を回収し、Halo レジンをを用いて目的タンパク質を精製した。10~20%ゲルを用いて CBB 染色および抗 FcεRIα 抗体を用いたウェスタンブロットングを行った。タンパク定量後、0.1-10,000 ng/mL の SmBit-FcεRI α (Sm-Fc)または LgBit-FcεRI α (Lg-Fc)にリコンビナントヒト IgE (最終濃度 100 ng/mL) を加え 37 °C で一晩感作した。Sm-Fc-IgE と Lg-Fc-IgE を 1:1 で混合し、そこに抗ヒト IgE(最終濃度 200 ng/mL)または陰性コントロールとして Halo バッファーを加え、37 °C で 3 時間刺激した。同様に陰性コントロールとして混合しない Sm-Fc-IgE 及び Lg-Fc-IgE も検討した。これらを 96 ウェル白色プレートに移し、基質として Nano-glo® Luciferase Assay System を加えルミノメーターで化学発光を測定した。

4. 研究成果

まず-Fc RI α-NanoBit 配列を得るために、HT 用ベクターの N 末端側と C 末端側に FcεRI α-NanoBit 配列(4通り)を挿入した遺伝子を作製した(図1)。無細胞系による発現後にタンパク質精製を行ったが、タグ標識 FcεRIα の収量は非常に少なかった。次に PEI を用いた HEK293T 細胞へのトランスフェクションを試みたが、目的タンパク質の収量は向上しなかった。そこで、目的タンパク質の発現量を増加させるため、HT 用ベクターで作製した FcεRI α-NanoBit 配列の 5' 末端にプレプロトリプシンのリーダー配列を付加したベクターを新たに作製し、分泌型で目的タンパク質を発現させた。PEI を用いて HEK293T 細胞へのトランスフェクション後、培養上清を回

収し、Halo レジンをを用いて目的タンパク質を精製した。なお、HEK293T 細胞 60 mL 培養で 105.1 ~ 289.2 μ g の Fc ϵ RI α -NanoBit タンパク質が得られた。CBB 染色したところ、分子量約 50 kDa に Sm-Fc、50 ~ 60 kDa に Lg-Fc のバンドを検出した。また抗 Fc ϵ RI α 抗体によるウエスタンブロットにより特異的なバンドを検出した(図 2)。

次に、精製した Sm-Fc 及び Lg-Fc を用いてルシフェラーゼアッセイの検討を行った。各種濃度の Sm-Fc または Lg-Fc に最終濃度 100 ng/mL になるようにヒト IgE を加え、それぞれ 37 °C で一晩感作した。Sm-Fc-IgE と Lg-Fc-IgE を 1:1 で混合し、抗ヒト IgE 抗体を加え刺激後、Nano-glo[®] Luciferase Assay System を加え化学発光を測定した。その結果、Sm-Fc-IgE と Lg-Fc-IgE を等量加えたもので(10,000 ng/mL)、高いルシフェラーゼ活性が認められた。Sm-Fc-IgE のみ、または Lg-Fc-IgE のみでは、応答が認められなかった(図 3)。

以上のことから、EXiLE 法の最大の特徴である架橋活性を検出するという強みを活かしつつ、細胞を使用しないセルフリー EXiLE 法の開発に成功した。今後は、得られた Sm-Fc 及び Lg-Fc の混合比率のほか、使用量の削減を目指してさらなる条件検討を行う。また、実際のアレルギー患者血清について、通常 EXiLE 法(RS-ATL8 または HuRa-40 細胞を使用)との応答性の違いについて比較検討する。

1) HT-Fc-Sm



2) HT-Fc-Lg



3) Sm-Fc-HT



4) Lg-Fc-HT



HT: HaloTag[®]
 TEV: プロテアーゼ認識配列
 SmBiT : NanoBit[®]の低分子量断片
 LgBiT : NanoBit[®]の高分子量断片

図 1. 分子設計

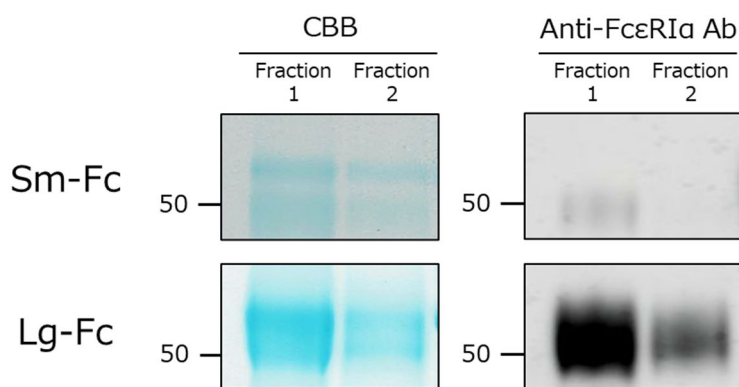


図 2. CBB 染色及び抗 Fc ϵ RI α 抗体を用いたウエスタンブロットティング

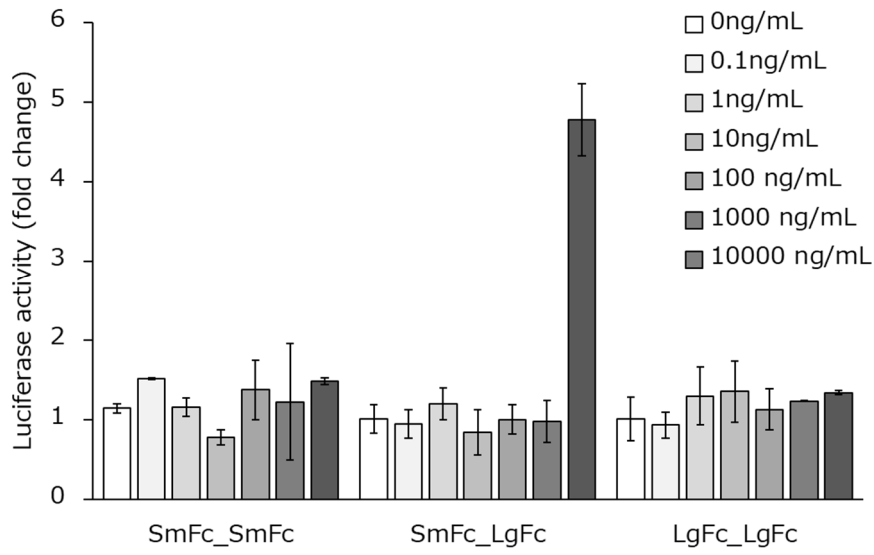


図3. Sm-Fc 及び Lg-Fc を用いたルシフェラーゼアッセイ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 栗坂知里、秋山晴代	4. 巻 577
2. 論文標題 スギ花粉舌下免疫療法実施時におけるEXiLE法を用いた治療奏効性の評価	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1047-1049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 渡邊裕子、秋山晴代、大澤伸彦、井村香織、伊関直美、植田壽美子、政岡智佳、赤星千絵	4. 巻 62
2. 論文標題 大豆タンパク質の定量に及ぼす調理・加工の影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 食衛誌	6. 最初と最後の頁 193-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3358/shokueishi.62.193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haruyo Akiyama, Konatsu Kawamata, Yuma Fukutomi, Hiroshi Matsufuji, Shigemi Kai, Maki Miyazawa, Ryosuke Nakamura	4. 巻 69
2. 論文標題 Novel in vitro test for pollen-related vegetable/fruit allergy using the EXiLE method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 459-461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.12.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 栗坂知里、秋山晴代	4. 巻 41
2. 論文標題 スギ花粉舌下免疫療法における奏効性予測法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 55-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haruyo Akiyama, Chisato Kurisaka, Kenichi Kumasaka, Ryosuke Nakamura	4. 巻 529
2. 論文標題 Novel IgE crosslinking-induced luciferase expression method using human-rat chimeric IgE receptor-carrying mast cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Immunol Methods	6. 最初と最後の頁 113682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jim.2024.113682	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 栗坂知里、石井巧、田所哲、中村亮介、熊坂謙一、秋山晴代
2. 発表標題 ヒトIgE受容体発現新規細胞株HuRa-40細胞の機能性評価
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山晴代、栗坂知里、石井巧、佐々木彩夢、原有彩、中村亮介
2. 発表標題 IgE架橋活性を評価するハイスループットスクリーニング系の確立
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗坂知里、中村梨乃、中村亮介、秋山晴代
2. 発表標題 食物アレルギーの架橋活性に及ぼすマイクロプラスチックの影響
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山晴代、栗坂知里、田所哲、熊坂謙一、中村亮介
2. 発表標題 高感度I型アレルギー試験法の開発を目的としたIgEキメラ受容体発現細胞の作製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 伽耶, 堀 雅之, 栗坂知里, 甲斐茂美, 小林征洋, 中村亮介, 宮澤真紀, 秋山晴代, 松原康策
2. 発表標題 加熱・加圧処理による魚肉アレルギーの変化: 魚アレルギー患者血清を用いたEXiLE法による評価
3. 学会等名 第57回日本小児アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗坂知里、甲斐茂美、小林征洋、堀雅之、中村亮介、宮澤真紀、松原康策、秋山晴代
2. 発表標題 加熱・加圧処理による魚肉低アレルギー化の検討～EXiLE法による応答性評価～
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020, September 17-20, 2020, Kyoto, Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山晴代、栗坂知里、渡部明日香、大橋知子、原田佳英、中村亮介
2. 発表標題 ヒトIgE架橋活性で評価する環境中アレルギー増悪物質のハイスループットスクリーニング法の開発
3. 学会等名 第30回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 キメラFcRI 鎖遺伝子、キメラFcRI 鎖タンパク質、細胞、分析用キット、及び分析方法	発明者 中村亮介、秋山晴代、田所哲、熊坂謙一	権利者 神奈川県他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-031757	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

IgEの架橋活性を指標とする新規アレルギー試験法の開発 https://www.thu.ac.jp/innovations/innovations-001 アレルギー疾患の病態解析及び疾患活動性の評価 https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/yakubutsuchiryougaku.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	栗坂 知里 (Kurisaka Chisato) (00846785)	帝京平成大学・薬学部・助教 (32511)	
研究分担者	中村 亮介 (Nakamura Ryosuke) (50333357)	国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長 (82601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------