

様式 C - 19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659027

研究課題名（和文） 培養細胞とキメラ分子を用いたタンパク質のアトグラム検出システムの開発に関する研究

研究課題名（英文） Development of the attogram protein detection system using cultured cell lines and chimeric molecules

研究代表者

中村 亮介（NAKAMURA RYOSUKE）

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官

研究者番号：50333357

研究成果の概要（和文）：高親和性 IgE 受容体をヒト化したラット培養マスト細胞株に、さらにルシフェラーゼのレポーター遺伝子を安定的に組み込んだ RS-ATL8 細胞を用い、加水分解小麦由来アレルゲンの検出を試みて、アトグラムレベルのタンパク質の検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：Using a rat mast cell line that has been stably integrated with human high-affinity IgE receptor cDNAs and also with NF-AT-driven luciferase reporter gene, attogram-level of hydrolyzed wheat protein-derived allergenic protein was detected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	700,000	0	700,000
2012年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	2,600,000		2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：食品衛生学

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質の微量分析は、承認済みおよび国内未承認の遺伝子組換え作物の混入試験や牛肉中のプリオンタンパク質の検出など、国民の食の安心・安全確保に大きく貢献している。通常、このような分析法にはウェスタンブロットが広く用いられており、理想的な条件下ではアトグラム（ 10^{-18} g）オーダーという超高感度の検出が可能とされている。しかし、よく知られているようにウェスタンブロットには用いる抗体と検出する抗原との「相性」の問題があり、どのような抗原・抗体の組み合わせでも超高感度測定が可能なのではない。このことは、一般に、ウェスタンブロットの原理上不可避なタンパ

ク質の変性過程により抗体の高次構造やエピトープに質的な変化が起きるためであると広く理解されていた。

(2) 申請者はこれまで、培養細胞を用いた新規アレルギー試験法の開発に取り組んできた。ごく最近、ラットの培養マスト細胞株にヒトの高親和性 IgE 受容体（FcεRI）遺伝子および転写因子 NF-AT 依存的にホタルルシフェラーゼの発現が誘導されるレポーター遺伝子をそれぞれ安定的に組み込んだ細胞株 RS-ATL8 細胞を樹立した（特願 2009-168530）。この細胞を用いると、培地など液相に添加した非変性の抗原を感度よく検出することができることから、タンパク質の微量検出システムへの応用が期待された。

2. 研究の目的

申請者の開発した、培養細胞とルシフェラーゼアッセイを用いるアレルギーの微量検出技術 (IgE crosslinking-induced luciferase expression; EXiLE 法) を転用し、タンパク質のアトグラムレベルの検出技術として改良し、未承認 GM 作物や食品・医薬品の微量アレルギーの混入試験、さらに、加水分解小麦 (HWP) を含む石鹸の使用者が経皮・経粘膜的に感作され、小麦による食物アレルギーを発症するようになったという近年関心の高まっている原因抗原の検出などへの様々な応用を通じ、もって国民の食の安心・安全確保に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HWP を含む石鹸「(旧)茶のしずく石鹸」によって感作された患者血清は、書面によるインフォームド・コンセントの後、国立病院機構相模原病院において採取され、匿名化の後、国立医薬品食品衛生研究所に送付された。患者血清は、使用直前まで -80℃ で冷凍保存された。

(2) 酸加水分解小麦 (HWP) グルパール 19S® (Glp19S) は、片山化学工業より供与された。実験には、これを粉末乾燥重量ベースで 100 mg/ml (w/v) となるよう 1M Tris (pH11.4) に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を作製したものをを用いた。

(3) Glp19S のサイズ分画には、限外ろ過 (ミリポア社 Ultracel 10k および 3k) を用いた。すなわち、未分画の Glp19S (上記ストック溶液を PBS にて 0.5mg/ml に希釈したもの) をまず分画分子量 10kDa の限外ろ過で分画し、高分子量側と低分子量側 (ろ液) とに分け、ろ液をさらに分画分子量 3kDa の限外ろ過で分画した。各画分は、分画後に分画前と同量にまでメスアップした。すなわち、各画分の分画後の濃度は、分画前の総タンパク量の濃度に換算した値である。これを、FCS を 10% 含む MEM 培地 (Gibco) により 96 ウェル中で段階希釈し、抗原検体とした。

(4) ヒト化ラットマスト細胞株 (RS-ATL8) の培養は、既報 (Nakamura et al. Allergy 65:1266-73, 2010) の条件をやや変更して行なった。すなわち、細胞を 1.0×10^6 cells/ml に懸濁し、ここに患者血清を 1/100 量加え、 5.0×10^4 cells/50 μ l/well でクリアボトム白色 96 ウェルプレート (パーキンエルマー社 ViewPlate) に播種し、一晚感作した。これを Tecan Hydrospeed を用いて PBS により 3 回洗浄し、各種濃度の抗原溶液を加え、37℃、5% CO₂ 存在下で 3 時間刺激を行なった。測定は、基質液として Promega 社の ONE-Glo を用い、パーキンエルマー社の EnVision ルミノメータにより発光を測定した (n=2)。データは、刺激前のバックグラウンドレベルの

発光量に対する相対値として表した。

4. 研究成果

(1) 「(旧)茶のしずく石鹸」によって感作された症例は、本品が美容石鹸であるという事情から、成人女性が大半を占めている。以下に示す症例は典型例の一つである。

年齢 / 性別: 42 歳 / 女性

総 IgE: 4050 IU/ml

小麦 IgE: 23.4 UA/ml

グルテン IgE: 31.4 UA/ml

5 グリアジン IgE: 2.06 UA/ml

以下に示す実験では、この患者血清を用いた。

(2) RS-ATL8 細胞を 100 倍に希釈した上記患者血清で一晩感作し、翌日 PBS で洗浄後、種々の濃度の Glp19S で 3 時間刺激した。すると、図 1 の青線に示した応答が観察された。

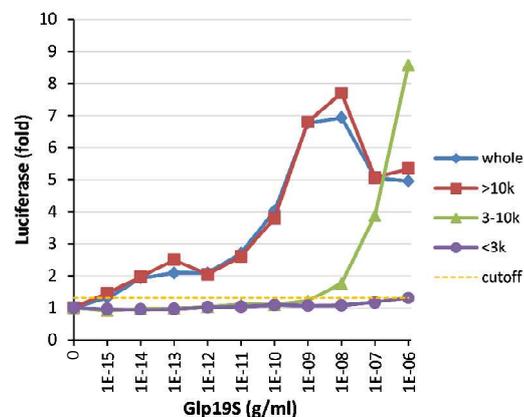


図 1. サイズ分画した Glp19S を、種々の濃度で培地に懸濁または溶解し、感作済みの RS-ATL8 細胞に添加して 3 時間刺激した。青: 分画前、赤: 10kDa 以上、緑: 3-10kDa、紫: 3kDa 未満、黄色の破線: カットオフ値 (1.311)。抗原濃度ゼロ時のルシフェラーゼ発現を 1 とする相対値で表した。

ここで、本研究とは別に申請者らが遂行している研究課題 (厚生労働科研費) において、約 140 例の「(旧)茶のしずく石鹸」感作患者および健常人の血清を用いた実験を行ない、Glp19S の皮膚プリック試験による確定診断結果とよく一致するためのルシフェラーゼ発現増加レベルの至適カットオフ値を ROC 曲線解析により算出したところ、刺激前に対して 1.311 倍をカットオフとしたとき試験法のパフォーマンスが最大になることが分かったため、本研究でもその値を用いた (data not shown)。

図 1 の場合、Glp19S 添加時にこのカットオフ値 (黄色の破線) を初めて超えた濃度は、 1×10^{-14} g/ml (10fg/ml) であった。刺激時、

マイクロウェルには1ウェルあたり50 μ lの溶液を添加しているため、抗原の絶対量としては500ag/50 μ l/wellに相当する。

次に、Glp19Sの10kDa以上(赤)、3-10kDa(緑)および3kDa未満(紫)の各画分について応答性を調べたところ、3kDa未満については本実験の濃度範囲ではすべての点で陰性となり、3-10kDaでは 1×10^{-8} g/ml(10ng/ml)以上で陽性となった。そして、10kDa以上については、少なくとも 1×10^{-15} g/ml(1fg/ml)で陽性となった。これは、50ag/50 μ l/wellに相当する。

これらの結果は、本研究の目的であった、溶液中のネイティブな状態におけるタンパク質のアトグラムレベルでの検出が達成されたことを意味している。また、研究の方法(3)でも述べた通り、分画後の各フラクションは、分画前の容量にまでメスアップをしているため、ここで示した「濃度」は、分画前の総タンパク質濃度に換算した値であることに注意を要する。すなわち、実際にウェル中に添加されたGlp19S由来タンパク質の量は、50アトグラムを確実に下回ることが予想される。さらに、本試験系は10%のFCSという大量の非特異的タンパク質の存在下で行なっており、非常に頑健性が高いといえる。これは、多種多様なマトリクスが抱負に存在する食品に含まれる微量の目的タンパク質を検出するための試験法に求められる非常に重要な特徴であろう。

図1は、生物学的・臨床的にも興味深い事実を示唆している。すなわち、本患者のIgEが応答するGlp19S中の成分は、10kDa以上のものが大半であるが、3-10kDaの画分中にも量は少ないが確かに存在し、3kDa未満にはほとんど含まれない、ということである。このような知見は、今後のHWPに起因する食物アレルギー-危害を防止する上でも有用であろうと思われる。

(3) 本研究により得られた成果が国内外に与えたインパクトは小さくない。まず、申請者は、本研究の遂行期間中に2つの国内学会より表彰を受けた。すなわち、2010年11月に東京で行われた第60回日本アレルギー学会秋季学術大会において発表した「培養細胞を用いた新規アレルギー試験法の開発」は、同学会より第7回日本アレルギー学会学術大会賞を受賞した。さらに、日本免疫毒性学会からは第1回奨励賞を受賞し、2011年9月に千場で行われた第18回日本免疫毒性学会学術大会において奨励賞受賞講演「子どもと免疫: 小児食物アレルギー試験の観点から」を行なった。その他、2011年3月の日本薬学会ではハイライト講演にも選出された。海外からも大いに注目され、2012年3月に米国サンフランシスコで行なわれたThe 51st meeting of Society of Toxicologyにおいては、

Immunotoxicology Speciality Section が開催した国際ワークショップ「The allergenicity and immunomodulatory effect of food substances」に招待演者として参加し、講演「In vitro provocation study」を行なった。(4) このように、本研究課題は当初の期待以上の進展を遂げたが、動物由来のIgEを用いる検出法としては、融合遺伝子の発現等に課題を残した。しかし、ネイティブな状態の溶液中のタンパク質をアトグラムレベルで検出するための基礎技術としての価値は十分確認することができたものと思われる。

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13件)

Nakamura, R., Nakamura, R., Adachi, R., Itagaki, Y., Fukutomi, Y., Teshima, R. Evaluation of allergenicity of acid-hydrolyzed wheat protein using an in vitro elicitation test. *International Archives of Allergy and Immunology*, 160: 259-264 (2013). (査読有)

DOI: 10.1159/000341671

中村亮介、手島玲子. 特集「アレルギー疾患における特異抗体の意義」. II. アレルゲン特異IgE抗体の新しい測定方法「4. EXiLE法」. *アレルギー・免疫*, 20: 63-73 (2013). (査読無)

Nakamura, R., Ishiwatari, A., Higuchi, M., Uchida, Y., Nakamura, R., Kawakami, H., Urisu, A., Teshima, R. Evaluation of the luciferase assay-based in vitro elicitation test for serum IgE. *Allergology international*, 61: 431-437 (2012). (査読有)

DOI: 10.2332/allergolint.11-OA-0407

Teshima, R., Nakamura, R., Satoh, R., Nakamura, R. 2D-DIGE analysis of rice proteins from different cultivars. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 58: S30-35 (2010). (査読有)

DOI: 10.1016/j.yrtph.2010.05.010

Nakamura, R., Uchida, Y., Higuchi, M., Nakamura, R., Tsuge, I., Urisu, A., Teshima, R. A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy*, 65(10): 1266-1273 (2010). (査読有)

DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02363.x

Nakamura, R., Nakamura, R., Watanabe, K., Oka, K., Ohta, S., Mishima, S., Teshima, R. Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis. *International Immuno-*

pharmacology, 10: 1107-1112 (2010). (査読有)

DOI: 10.1016/j.intimp.2010.06.013

[学会発表](計 27 件)

中村亮介, 中村里香, 手島玲子. EXiLE 法における抗原の固相化の影響. 日本薬学会第 133 年会 (2013.3)

中村亮介, 中村里香, 酒井信夫, 安達玲子, 福富友馬, 手島玲子. EXiLE 法による加水分解小麦のアレルゲン性における分子サイズの影響の解析. 第 85 回日本生化学会 (2012.12)

Nakamura, R. In vitro provocation study. The 51st meeting of Society of Toxicology. (2012.3) (招待講演)

Nakamura, R., Ishiwatari, A., Nakamura, R., Kawakami, H., Tsuge, I., Urisu, A., Teshima, R. EXiLE: a novel reporter assay-based allergy test. Joint Congress of APAPARI 2011 & 48th JSPACI (2011.10)

中村亮介, 石渡亜耶乃, 川上 浩, 手島玲子. 培養細胞のルシフェラーゼ発現を指標とするアレルギー試験法. 第 4 回食品薬学シンポジウム (2011.10)

中村亮介. 子どもと免疫: 小児食物アレルギー試験の観点から. 第 18 回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9) (奨励賞受賞講演)

中村亮介, 石渡亜耶乃, 樋口雅一, 中村里香, 川上 浩, 手島玲子. 新しいアレルギー試験法 EXiLE 法による加熱卵白アレルゲンの IgE 応答性の解析. 日本薬学会第 131 年会 (2011.3) (ハイライト講演)

中村亮介, 樋口雅一, 内田好海, 中村里香, 柘植郁哉, 宇理須厚雄, 手島玲子. 培養細胞を用いた新規アレルギー試験法の開発. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2010.11) (学術大会賞)

中村亮介, 樋口雅一, 中村里香, 近藤康人, 宇理須厚雄, 手島玲子. EXiLE 法を用いたアレルゲン交差反応性の解析. 第 17 回日本免疫毒性学会学術大会 (2010.9)

Nakamura, R., Uchida, Y., Higuchi, M., Nakamura, R., Teshima, R. IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) as a sensitive indicator for serum-based allergy test. EAACI2010 (2010.6)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 亮介 (NAKAMURA RYOSUKE)

研究者番号 : 5 0 3 3 3 3 5 7

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)協力研究者

中村 里香 (NAKAMURA RIKA)

研究者番号 : 4 0 6 4 3 3 3 3