

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658291

研究課題名(和文) 感作ダニアレルゲン特異的 IgE ミモトープ抗体誘導体の開発

研究課題名(英文) Development of IgE mimotope-antibody fusion derivatives specific for sensitized allergens

研究代表者

小埜 和久(Ono, Kazuhisa)

広島大学・先端物質科学研究科・名誉教授

研究者番号：10144883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ダニアレルギーは大きな社会問題となっており、根治療法の確立が我が国でも急務となっている。本研究では、ダニアレルギーのテーラーメイド型免疫療法への応用が期待される感作アレルゲン特異的IgE ミモトープ-ヒトIgG抗体重鎖定常領域(Fc γ)融合体の創製へ向けた基盤技術を開発することを目的とした。まず、ダニアレルギー患者由来アレルゲン特異的IgGを用いたスクリーニング系の導入により、再現性の高いIgEミモトープペプチドの新規同定法を開発した。更に、同定された感作ダニアレルゲン特異的IgE ミモトープとFc γ との融合キメラ分子を組換えタンパク質として動物細胞で生産させるための要素技術も開発した。

研究成果の概要(英文)：House dust mite allergy is a serious social problem, and establishment of its curable therapy is an urgent issue also in our country. Objective of this study is to develop basic technologies for the generation of sensitized allergen-specific IgE mimotope-human IgG antibody constant region (Fc γ) chimeric molecules for patient-tailored specific immunotherapy against dust mite allergy. We first developed a new and highly-reproducible method for identification of the IgE mimotope peptides by introducing a pre-screening procedure using allergen-specific IgG from mite-allergic patients. We also developed basic technical strategies for production of recombinant IgE mimotope-Fc γ chimeras using animal cell expression systems.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：アレルギー ミモトープ抗体誘導体 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

我が国の3人に1人は何らかのアレルギー症状で悩まされているといわれており、その半数以上の人々がダニに対するIgE抗体が陽性反応を示すことから、ダニアレルギーはスギ花粉症と並んでアレルギー性疾患の双壁となっている。アレルギーの最も有効な対策は抗原からの回避、あるいはその除去であるが、ダニなどの吸入性アレルギーではそれが極めて困難であることから、本疾患の治療は対症療法が主体となっている。しかしながら、対症療法は多くの問題点を含んでおり、特に、ステロイド抵抗性の難治性アレルギー患者の問題は極めて深刻である。

アレルギー特異的な免疫療法を推奨するWHO position paper (1998年)の発表以来、欧米ではアレルギー性鼻炎や結膜炎および喘息において、特異的な免疫療法が治療法の一つの選択肢として普及しているが、現行法では依然として粗アレルゲンエキスをワクチンとして処方していることから、治療の長期化をはじめ、新たな感作の危険性や副作用など多くの課題を抱えており、これらの早急な解決が望まれている。

筆者らの研究グループは、1986年からホヤ喘息研究で培ったアレルゲン解析技術を用いてダニアレルギー疾患の克服を目指した研究を続ける間に、その抜本的な対策として、患者固有の感作アレルゲンを特定する新たな分子診断技術を開発すること、および、同分子診断情報に基づいたテーラーメイド型のワクチンを創製することが極めて有効であることに気付いた。更に筆者らは、ダニアレルギー患者由来IgEとの結合活性を指標として23種類のダニアレルゲン分子種をコードする遺伝子を網羅的にライブラリー化すると共に、当該組換え型アレルゲンを駆使した分子診断法の基盤技術開発を進めている。

感作アレルゲンを分子レベルで把握するにあたり、上記のアレルゲン分子種レベルでの診断を更に補完するもう一つの技術として感作分子情報を患者固有のIgE抗原決定基にまで還元したエピトープレベルでの診断技術があげられる。特にペプチドミメティクスを用いたIgEミモトープは有望な創薬シーズとなりうることが期待される。しかしながら現行の技術ではアレルギー患者血清由来のIgE抗体が極めて微量であることが大きな障壁となっており、創薬展開に資する実用的なIgEミモトープの取得が極めて困難な状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、感作ダニアレルゲン特異的なIgEミモトープの同定、および同ミモトープペプチドを用いた特異的な免疫療法の実現に資するIgEミモトープ-ヒトIgG抗体重鎖定常領域(Fc γ)キメラ誘導体の創製に向けた基

盤技術を整備することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感作ダニアレルゲン特異的なIgGミモトープペプチドの単離・同定

ダニ主要抗原Der f 2をモデルアレルゲンとしてDer f 2特異的なIgGミモトープのスクリーニングを行った。まず、天然型Der f 2あるいは大腸菌コールドショックタンパク質発現系を用いて作製した組換え型Der f 2を固定化したイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより、ダニアレルギー患者血清からDer f 2特異的なIgG抗体を精製した。本特異IgGをプローブとして、環状7アミノ酸あるいは直鎖12アミノ酸からなるランダムペプチドを提示したM13系ファージディスプレイライブラリーを複数ラウンドのバイオパニングに供し、陽性ファージを濃縮・単離した。単離ファージとDer f 2特異的なIgGとの結合活性については、同IgGを抗ヒトIgG抗体を介して固相化したイムノプレートにファージ検体を添加・洗浄した後に、Der f 2特異的なIgG結合ファージを酵素標識抗M13抗体にて検出するサンドイッチELISA法によって評価した。取得されたIgGミモトープペプチドの一次構造をファージDNAの塩基配列解析により決定すると共に、Der f 2との一次構造比較を行った。

(2) ダニアレルゲン特異的なIgEミモトープペプチドの同定

上記のDer f 2特異的なIgGミモトープを提示したファージクローンをDer f 2特異的なIgE抗体をプローブとした競合ELISAによる二次スクリーニングに供した。具体的には、固相化Der f 2に対するDer f 2特異的なIgEの結合を候補ファージクローンの外来添加が競合阻害できるか否かを確かめることにより、Der f 2特異的なIgEミモトープを有する陽性クローンを選抜した。

(3) ダニアレルゲン特異的なIgEミモトープ-Fc γ 融合キメラ分子の創製

まず、Der f 2特異的なIgEミモトープペプチドをコードするオリゴヌクレオチドの上流にヒトFc γ 分泌シグナル配列を配置すると共に、当該オリゴヌクレオチドの下流にリンカー配列としてグリシンペンタマー配列を導入した融合遺伝子をfusion PCR法により作製した。続いて、本融合遺伝子の下流にFc γ (hinge-CH2-CH3)遺伝子を繋いだDer f 2特異的なIgEミモトープ-Fc γ キメラ誘導体遺伝子をfusion PCR法によって作製し、これを動物細胞発現ベクターpCEP4に挿入した。本コンストラクトをチャイニーズハムスター卵巣細胞亜株Freestyle CHO-Sにトランスフ

エクトし、目的とする組換え型 IgE ミモトープ-Fc γ 融合タンパク質の一過性分泌発現を試みた。培養上清および細胞内（可溶性画分・不溶性画分）における融合タンパク質の発現については抗ヒト Fc γ 抗体を用いたイムノプロット解析により評価した。

4. 研究成果

(1) 感作ダニアレルゲン特異的 IgE ミモトープの取得に向けた要素技術の開発

ダニアレルゲン特異的 IgE ミモトープ取得への端緒として、ダニ主要抗原 Der f 2 をモデルアレルゲンとした要素技術の開発を試みた。ダニアレルギー患者血清中のアレルゲン特異的 IgE 抗体が極めて微量であることが本研究のボトルネックとなっていることに鑑み、まず、一次スクリーニングとしてアレルゲン特異的な IgG ミモトープペプチドを取得した後に、同ペプチド群より交差反応性を有する IgE ミモトープペプチドを特定する戦略の有効性を検証することとした。

最初に Der f 2 固定化アフィニティーカラムを用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーによりダニアレルギー患者血清より Der f 2 に特異的なポリクローナル IgG 抗体画分を精製した。本 Der f 2 特異的 IgG をプローブとしてランダムペプチドを提示したファージディスプレイライブラリーを複数ラウンドのバイオパニングに供したところ、7 アミノ酸からなる環状ランダムペプチドを提示できるファージライブラリーを用いた際に、Der f 2 特異的 IgG ミモトープペプチドを提示していると予想されるファージ群がラウンド数に依存して効率的に濃縮されている所見が確認された。一方、12 アミノ酸からなる直鎖状のランダムペプチドライブラリーを用いた検討では、陽性ファージの濃縮が一切認められないことも判明した。以上の検討結果から、アレルゲン特異的 IgG をプローブとした本系においては、環状ペプチドライブラリーを使用することがミモトープの取得に有効であることが示唆された。

上記の陽性ファージ群と Der f 2 特異的 IgG との結合活性をサンドイッチ ELISA により追認した後に、Der f 2 特異的 IgG との結合活性を有するミモトープペプチド提示ファージを複数クローン取得した。

(2) 感作ダニアレルゲン特異的 IgE ミモトープの同定

次に、前項の検討により得られた Der f 2 特異的 IgG ミモトープ提示クローンからの Der f 2 特異 IgE との結合活性を有するクローンの取得を試みた。固相化した Der f 2 とダニアレルギー患者 IgE との結合活性を競合阻害する系に Der f 2 特異的 IgG ミモトープ

発現クローンを competitor として供したところ、IgE 交差反応性を有するファージクローンが顕著な割合で存在していることが明らかとなった。

以上の結果から、アレルギー患者由来のアレルゲン特異的 IgG を一次スクリーニングプローブとする本法がアレルゲン特異的 IgE ミモトープの同定に有用であることが強く示唆された。

(3) 感作ダニアレルゲン特異的 IgE ミモトープの構造解析

前項の試験により得られた Der f 2 特異的 IgE ミモトープ提示クローンを DNA sequencing に供して、同ミモトープペプチドの構造解析を試みた。その結果、取得されたミモトープペプチドのうち、過半数以上に Der f 2 ポリペプチドとの一次構造上の相同性とアミノ酸レベルでの類似性が認められること、また、当該ミモトープが相当すると考えられる Der f 2 上のリニアエピトープ部位がいずれも本アレルゲンの分子表面上に局在していることが示唆された。

一方、取得された IgE ミモトープペプチドの中には、Der f 2 の一次構造との相同性を全く示さないものも含まれていることが判明した。この結果は、当該ペプチドミモトープが Der f 2 のコンフォメーションな IgE エピトープを構造的に模倣している可能性を示唆するものであり、本法が患者固有の感作アレルゲン特異的 IgE エピトープの包括的同定にも有用であることが示唆された。

更に、この新たなアレルゲン特異的 IgE ミモトープ同定法の再現性についても検証したところ、異なる試験セットにおいて全く同一の一次構造を有する IgE ミモトープペプチドの同定が可能であること、また、本法によりリニアエピトープおよびコンフォメーションエピトープに相当すると考えられる一連の IgE ミモトープペプチドの効率的同時取得が可能であることが確認された。

(4) ダニアレルゲン特異的 IgE ミモトープ-ヒト Fc γ 融合キメラ分子の作製

続いて前検討にて同定された Der f 2 特異的 IgE ミモトープペプチドとヒト Fc γ とを融合させた組換えタンパク質の作製を試みた。ヒト Fc γ 分泌シグナル配列を付した同キメラ遺伝子を動物細胞発現ベクター（pCEP4）に搭載して Freestyle CHO-S 細胞にトランスフェクトしたところ、IgE ミモトープ-Fc γ 融合キメラ分子を組換えタンパク質として発現させることに成功した。一方、本分子の発現は細胞内の不溶性画分において認められること、また、培養上清への分泌発現ならびに可溶性画分における当該発現が認められないことも判明した。IgE ミモトープ-Fc γ 融合タンパク質の分泌発現が認められなかった

一因として、フォールディング不全の組換えタンパク質の蓄積に起因する分泌遮断が形質転換体の小胞体内にて起こっているケースがまず考えられる。この可能性については小胞体ストレス関連分子群の発現亢進の有無を確かめることにより容易に検証できるものと思われるが、小胞体ストレスチェックポイントに感知された組換えタンパク質を良好に分泌発現させることは技術的に容易ではない可能性も想定される。これを解決する一法としては、抗体のフォールディングにも機能していると思われる小胞体分子シャペロン (GRP78/Bip 等) や小胞体ストレスシグナルおよび形質細胞機能に関連した転写因子群 (XBP-1 や Blimp-1 等) との共発現による分泌発現促進の検討が有望であるかもしれない。他方、本分子の可溶性発現が難しい場合にはリフォールディングによる可溶化ステップをその生産工程に導入する必要も出てこよう。

以上、本研究ではダニアレルギーのテーラード型免疫療法の実現に資する感作アレルゲン特異的 IgE ミモトープの同定のみならず、当該 IgE ミモトープ-Fc γ 融合分子を創製するための基盤技術を確立することができた。今後は、これらの要素技術を駆使して感作ダニアレルゲン特異的 IgE ミモトープライブラリーの網羅的な整備を引き続き進めると共に、IgE ミモトープ-Fc γ 融合分子の薬理活性検証と特異的免疫療法への展開を推進していく予定である。

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)

[学会発表](計3件)

- (1) Majima M., Okuyama S., Aki T., Kawamoto S., Asaoku Y., Hayashi T., Ono K. (2013) Development of Molecular diagnostic system with cedar pollen IgE mimotope. EAACI-WAO Congress 2013 (2013年6月22日-6月26日, ミラノ, イタリア)
- (2) Kishikawa Y., Kawamoto S., Nakahara H., Watakabe Y., Ota Y., Aki T., Asaoku Y., Hayashi T., Tanaka A., Ono K. (2013) Component-resolved molecular diagnosis of house dust mite allergy using a comprehensive repertoire of recombinant mite allergens. EAACI-WAO Congress 2013 (2013年6月22日-6月26日, ミラノ, イタリア)
- (3) 中原輝、河本正次、渡壁徳治、岸川由季、秋庸裕、麻奥良子、林鷹治、田中明彦、小埜和久 (2012) ダニアレルギーの component-resolved diagnosis 実現に向けた基盤技術の開発 (第2報) 第62

回日本アレルギー学会秋季学術大会
(2012年11月29日-12月1日、大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小埜 和久 (ONO KAZUHISA)
広島大学大学院先端物質科学研究科・名誉教授
研究者番号：10144883

(2) 研究分担者

河本 正次 (KAWAMOTO SEIJI)
広島大学大学院先端物質科学研究科・准教授
研究者番号：90294537