

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460082

研究課題名(和文) EXiLE法と質量分析法とを用いたアレルゲンエピトープの網羅的解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of comprehensive allergenic epitope exploring method by means of EXiLE and mass spectrometry

研究代表者

中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号：50333357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が近年開発したIgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法に基づき、新しいアレルゲンエピトープの網羅的解析技術を開発することを目指した。卵白アルブミン(OVA)をモデル抗原とし、OVAが液相と固相にある時である種のIgEの架橋活性が異なることを示すとともに、ペプチドをキャリアアタンパク質に結合させることにより、極めて微量(数十pM)のエピトープペプチドをEXiLE法で検出できることを示した。今後、本エピトープ解析技術は、低アレルゲン化食品の開発や、より安全なバイオロジクス医薬品の開発等への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to develop a new allergenic epitope exploring method by means of the EXiLE (IgE crosslinking-induced luciferase expression) testing method. The EXiLE test is based on the luciferase assay using humanized rat basophilic leukemia cells (RS-ATL8) that express human high-affinity IgE receptor (Fc γ RI). E-C1 and E-G5 are murine monoclonal IgE antibodies against ovalbumin (OVA), with and without degranulation activity, respectively. RS-ATL8 cells sensitized with E-C1 were reactive to OVA in the liquid phase, but not in the case of E-G5. However, immobilized OVA reacted to both E-C1 and E-G5. We next tried to detect EXiLE responses to epitope peptide of E-C1. It was impossible to detect directly-immobilized epitope peptide with ELISA or EXiLE assay. However, when the peptide was conjugated to a carrier protein, the IgE response was observed, particularly with EXiLE assay.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルゲン EXiLE法 質量分析法 IgE ルシフェラーゼ エピトープ 抗原抗体反応

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーや薬物アレルギーなどのアナフィラキシーショックは、時に患者を死に至らしめる深刻なアレルギー反応である。アレルギー反応の惹起は、アレルゲン特異的 IgE が患者のマスト細胞や好塩基球が発現する高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に Fc 部を介して強固 (解離定数 $10^{-10}M$) に捕捉される「感作」から始まる。続いて、アレルゲンが体内に侵入すると、マスト細胞上で IgE とアレルゲンとの「結合」がおきる。このとき、アレルゲン分子上に多価の IgE エピトープが存在すると、この結合は FcεRI の「架橋」を誘導し、これがヒスタミン放出等の引き金となる。我々は最近 (研究開始時の 2 年前)、ヒト FcεRI 遺伝子とルシフェラーゼレポーター遺伝子とを安定的に導入した培養マスト細胞株 (RS-ATL8 細胞) を用い、抗原依存的な IgE/FcεRI の架橋を検出する新しいアレルギー試験法「EXiLE (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression) 法」を開発した。EXiLE 法の検出感度は極めて高く、溶液中のアレルゲンタンパク質をアトグラムオーダー (50 ag/50 μl/well) で検出することができる。一方、IgE のエピトープ解析技術としては、短い合成ペプチドを少しずつしながらアレルゲンの全長配列をカバーし、各ペプチドへの IgE 結合性をドットプロットの要領で検出する、という手法 (SPOTs 法) が主に用いられていた。しかし、この手法はペプチドの合成コストが高いことなどから、あまり長い配列の解析には適用しづらく、IgE エピトープの網羅的解析技術としては不向きであった。

2. 研究の目的

我々の独自技術である EXiLE 法の特長の一つである超高感度を活かし、IgE エピトープの網羅的解析技術を開発することを目的とした。すなわち、限定分解と質量分析によって容易に得られるペプチド配列の情報と、極微量のペプチドへの IgE の EXiLE 応答性とを組み合わせることにより、全く新しいエピトープ同定技術の開発を実現できるのではないかと考えた。通常の液体クロマトグラフィーで得られるペプチドはナノグラムレベル程度であり、感度に劣る ELISA 等では検出が非常に難しい。さらに、患者血清中には中和抗体である IgG 等が豊富に含まれており、これが測定を妨害することも予想された。EXiLE 法を用いることにより、これらの問題が一気に解決できると期待された。このとき、ペプチド断片が小さくなりすぎると、1 つのペプチドあたりのエピトープの数が 1 つになってしまう、IgE の架橋が誘導できなくなるおそれがある。そのため、本研究では、ペプチド 1 つあたりのエピトープの数によらずに IgE の架橋刺激を誘導できる系の開発にも取り組み、その評価を行なう。

3. 研究の方法

(1) 抗原・抗体

モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を、その特異的 IgE として、OVA との反応性が異なることが知られている 2 種類のマウスモノクローナル抗体 (E-C1、E-G5) を用いた。抗体は、Chondrex 社より購入した。E-C1 抗体は、マスト細胞を感作すると OVA の添加により架橋を介してマスト細胞の脱顆粒を誘導するが、E-G5 抗体は、OVA と結合はするものの脱顆粒は誘導できないことがメーカーの情報として知られていた。

(2) 細胞

EXiLE 法に用いる RS-ATL8 細胞は、過去の報告の通りに培養した。すなわち、10% のウシ胎児血清を含む MEM 培地に、ペニシリン・ストレプトマイシン、ジェネティシン、ハイグロマイシンを添加した培地を用い、セルスクレイパーにより週に 1 回継代を行なった。

(3) EXiLE 法

EXiLE 法のプロトコルは、既報の条件を基にして行なった。すなわち、 1×10^6 cells/ml に懸濁した RS-ATL8 細胞を 10 ng/ml の IgE モノクローナル抗体で一晩感作し、PBS で 3 回洗浄後、培地に溶解した OVA または 100 ng/ml の抗マウス IgE 抗体により 37 °C で 3 時間刺激した。刺激後、ONE-Glo 基質液を添加して発光強度を測定し、刺激前に対する Fold Change により架橋活性を評価した。

(4) 固相 EXiLE 法

種々の濃度の抗原を炭酸バッファーに溶解し、ELISA の要領でプレートにコートした。別の容器で一晩 IgE で感作した RS-ATL8 細胞を抗原コートプレートに播種し、37 °C で 3 時間刺激した。その後、ONE-Glo で細胞を溶解後、別プレートに移し、発光を測定した。

(5) エピトープペプチド

Chondrex が開示する E-C1 および E-G5 のエピトープペプチドはそれぞれ下記の通り。

E-C1 : ⁶¹DKLPGFGD⁶⁸

E-G5 : ³⁶³HPFLFCIKHIAT³⁷⁴

これらのペプチドを MBL に委託して合成した。また、Peptide Immobilizing Kit (Beacle) を用いてウシ血清アルブミン (BSA) に共有結合させた。検出は、E-C1 および E-G5 抗体を用いた ELISA または EXiLE で行なった。

4. 研究成果

(1) EXiLE 法による 2 種の抗 OVA IgE の架橋活性の評価

RS-ATL8 細胞を E-C1 抗体および E-G5 抗体で一晩感作し、MEM 培地に溶解した OVA で 3 時間刺激を行なった。すると、図 1 に示すように、E-C1 では明瞭な応答が観察されたが、E-G5 では全く応答が誘導されなかった。データは示さないが、いずれの抗体も、固相化した OVA に対する結合性は ELISA によって確認している。これらの結果は、メーカー等が示す両抗体の性質に矛盾しない。

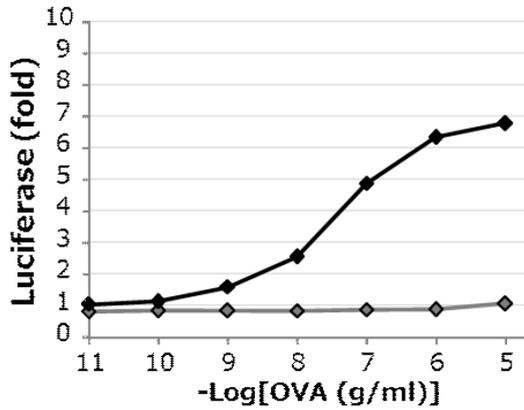


図1 . EXiLE 法による E-C1 および E-G5 抗体の応答性の評価
 , E-C1 ; , E-G5.

(2) 固相 EXiLE 法による両抗体の応答性評価

次に、ELISA の要領で OVA をプレートに固相化し、これらの抗原に対する感作 RS-ATL8 細胞の応答性を調べた (図 2)。すると、抗原が液相中にあった場合と異なり、E-G5 抗体による OVA 依存的な FcεRI の架橋が認められた。このことは、たとえ抗原が 1 価であっても、固相化された場合は FcεRI を架橋することができ、ひいてはアレルギー試験の偽陽性結果を引き起こしうることを示唆している。

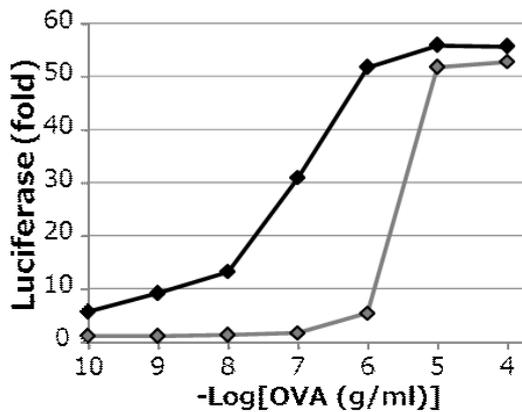


図2 . 固相 EXiLE 法による E-C1 および E-G5 抗体の応答性の評価
 , E-C1 ; , E-G5.

(3) ペプチド固定化 BSA の結合性を指標とするエピトープ解析

E-C1 および E-G5 については、近年、メーカーからエピトープ情報が公開された。そこで、両抗体のエピトープペプチドを合成し、プラスチックプレートに固相化し、ELISA により結合性を調べたが、いずれの抗体も結合を検出することはできなかった (非開示)。

これは、ペプチドの固相化効率が低すぎたか、あるいはプラスチック表面への吸着によりエピトープがマスキングされた、などの可能性が考えられた。

そこで、これらの問題を回避するため、ペプチドをまず可溶性タンパク質である BSA に共有結合させ、これをプラスチックプレートに固相化し、ELISA を行なった (図 3)。すると、E-C1 のエピトープペプチドは E-C1 抗体と特異的に結合したが (図 3 A)、E-G5 ペプチドはいずれにも結合しなかった (図 3 B)。このことは、メーカーが提供するエピトープ情報のうち、E-C1 については正しい配列が示されていると思われるが、E-G5 については誤っている可能性があることを示唆している。また、E-C1 の用量依存性曲線をシグモイド曲線にフィッティングし、50% 効果濃度 (EC50) を求めたところ、696 nM となった。

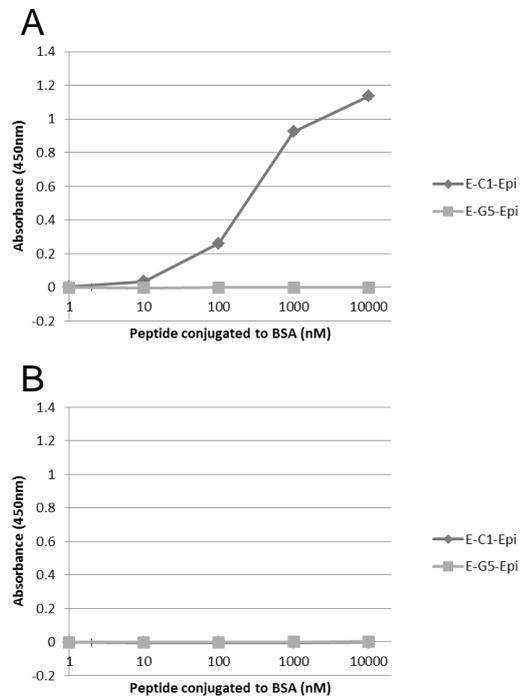


図3 . ELISA によるペプチド化 BSA に対する E-C1 および E-G5 の結合性の解析
 A , E-C1 ; B , E-G5

(4) ペプチド固定化 BSA の架橋活性を指標とするエピトープ解析

ELISA の場合と同様に調製した E-C1 のエピトープペプチド化 BSA を、E-C1 抗体で感作した RS-ATL8 細胞に液相で添加し、その応答性を調べた (図 4)。すると、E-C1 ペプチドは特異的な応答を誘導することができた。このとき、同様に EC50 を求めると 58.5 pM で、ELISA の場合の 1 万分の 1 以下であった。EXiLE 法が 50 ag/50 μl/well (1 fg/ml) の抗

原濃度で十分な応答を検出することができることを考えると、今回用いたペプチドは約 4 pg/50 µl/well (83 pg/ml) に相当するため、検出できたのは当然といえるであろう。

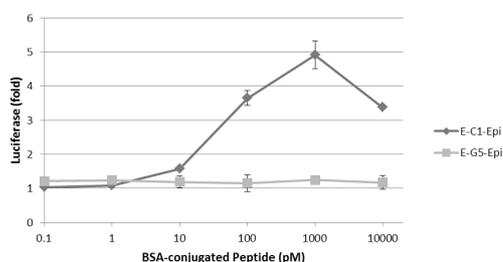


図4 . EXiLE 法によるペプチド化 BSA に対する E-C1 の架橋活性の解析

今後、タンパク質の未知エピトープを検出するため、限定分解により解析対象タンパク質を 10 残基程度のペプチドに断片化し、LC-MS/MS により配列を決定すると同時に、これを BSA に結合させて EXiLE 法で応答性を解析することにより、網羅的なエピトープ探索技術としての応用が可能であると期待できる。

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 6 件)

- 1) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R.: Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;**133**: 1436-1438.
DOI: 10.1016/j.jaci.2013.07.017
- 2) Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H.: Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth *J Allergy Clin Immunol.* 2014;**133**: 904-905.
DOI: 10.1016/j.jaci.2013.09.034
- 3) Hino M, Shimojo N, Ochiai H, Inoue Y, Ando K, Chikaraishi K, Ota S, Okimoto Y, Sunami S, Nakamura R, Teshima R, Sato Y, Kohno Y.: Expression of CD203c on basophils as a marker of immunoglobulin E-mediated l-asparaginase allergy. *Leuk Lymphoma.* 2014;**55**: 92-96.
DOI: 10.3109/10428194.2013.794944
- 4) Iwamoto S, Yonekawa T, Azuma E, Fujisawa T, Nagao M, Shimada E, Nakamura R, Teshima R, Ohishi K,

Toyoda H, Komada Y.: Anaphylactic transfusion reaction in homozygous haptoglobin deficiency detected by CD203c expression on basophils. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;**61**: 1160-1161.
DOI: 10.1002/pbc.24965

- 5) Wan D, Ludolf F, Alanine DG, Stretton O, Ali Ali E, Al-Barwary N, Wang X, Doenhoff MJ, Mari A, Fitzsimmons CM, Dunne DW, Nakamura R, Oliveira GC, Alcocer MJ, Falcone FH.: Use of humanised rat basophilic leukaemia cell line RS-ATL8 for the assessment of allergenicity of Schistosoma mansoni proteins. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;**8**: e3124.
DOI: 10.1371/journal.pntd.0003124
- 6) Falcone FH, Alcocer MJ, Okamoto-Uchida Y, Nakamura R.: Use of humanized rat basophilic leukemia reporter cell lines as a diagnostic tool for detection of allergen-specific IgE in allergic patients: Time for a reappraisal? *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;**15**: 67.
DOI: 10.1007/s11882-015-0568-3

[学会発表](計 24 件)

- 1) 中村亮介, 中村里香, 酒井信夫, 安達玲子, 宇理須厚雄, 福富友馬, 手島玲子.: 第 25 回アレルギー学会春季臨床大会. 2013 (横浜)
- 2) 相馬愛実, 中村亮介, 中村里香, 斎藤嘉朗, 川上 浩, 手島玲子.: 第 19 回日本食品化学学会. 2013 (名古屋)
- 3) 中村亮介, 中村里香, 酒井信夫, 安達玲子, 斎藤嘉朗, 宇理須厚雄, 福富友馬, 手島玲子.: 第 20 回日本免疫毒性学会学術大会. 2013 (東京)
- 4) 宇梶真帆, 杉山永見子, 中村亮介, 斎藤嘉朗, 打田光宏, 土屋敏行, 黒瀬光一.: 第 20 回日本免疫毒性学会学術大会. 2013 (東京)
- 5) 唐澤未来, 中村亮介, 酒井信夫, 安達玲子, 斎藤嘉朗, 最上知子, 山崎 壮, 手島玲子.: 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会. 2013 (沖縄)
- 6) 中村亮介, 中村政志, 矢上晶子, 酒井信夫, 中村里香, 安達玲子, 斎藤嘉朗, 相原道子, 秀 道広, 千貫祐子, 森田栄伸, 松永佳世子, 手島玲子.: 第 63 回アレルギー学会秋季学術大会. 2013 (東京)
- 7) 中村亮介, 相馬愛実, 中村里香, 斎藤嘉朗, 最上知子, 川上 浩, 手島玲子.: 日本薬学会第 134 年会. 2014 (熊本)
- 8) Nakamura R, Kaniwa N, Ueta M, Sotozono C, Sugiyama E, Maekawa K, Yagami A, Matsukura S, Ikezawa Z, Matsunaga K, Tokunaga K, Aihara M, Kinoshita S, Saito Y.: Drug Hypersensitivity Meeting 2014. 2014 (Bern)

- 9) Kaniwa N, Ueta M, Nakamura R, Sugiyama E, Maekawa K, Takahashi Y, Furuya H, Yagami A, Matsukura S, Ikezawa Z, Matsunaga K, Sotozono C, Aihara M, Kinoshita S, Yoshiro S.: Drug Hypersensitivity Meeting 2014. 2014 (Bern)
- 10) Nakamura R.: Drug Information Association. 2014 (Bethesda)
- 11) 木戸 博, 亀村典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸.: 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014 (京都)
- 12) 中村亮介.: 第 41 回日本毒性学会学術年会. 2014 (神戸)
- 13) 中村亮介, 鹿庭なほ子, 上田真由美, 外園千恵, 杉山永見子, 前川京子, 内田好海, 矢上晶子, 松倉節子, 池澤善郎, 松永佳世子, 徳永勝土, 相原道子, 木下 茂, 齋藤嘉朗.: 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会. 2014 (徳島)
- 14) 内田好海, 鹿庭なほ子, 上田真由美, 中村亮介, 杉山永見子, 高橋幸利, 古谷博和, 矢上晶子, 松倉節子, 池澤善郎, 松永佳世子, 外園千恵, 相原道子, 木下 茂, 齋藤嘉朗.: 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会. 2014 (徳島)
- 15) 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 下条直樹, 深尾敏幸, 木戸 博.: 第 51 回日本小児アレルギー学会. 2014 (四日市)
- 16) 秋山晴代, 河又小夏, 中村亮介, 福富友馬, 甲斐茂美, 松藤 寛, 宮澤眞紀.: 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 (横浜)
- 17) 岡本(内田)好海, 中村亮介, 相馬愛実, 石井明子, 最上知子, 川崎ナナ, 川上 浩, 手島玲子, 齋藤嘉朗.: 日本薬学会第 135 年会. 2015 (神戸)
- 18) 秋山晴代, 河又小夏, 政岡智佳, 中村亮介, 福富友馬, 甲斐茂美, 松藤 寛, 宮澤眞紀.: 日本薬学会第 135 年会. 2015 (神戸)
- 19) 秋山晴代, 政岡智佳, 中村亮介, 小野佳代, 田中裕, 甲斐茂美, 栗原和幸, 宮澤眞紀.: 第 64 回日本アレルギー学会学術大会. 2015 (東京)
- 20) 中村亮介, 鹿庭なほ子, 上田真由美, 岡本(内田)好海, 杉山永見子, 高橋幸利, 古谷博和, 矢上晶子, 松倉節子, 池澤善郎, 松永佳世子, 徳永勝土, 外園千恵, 相原道子, 木下茂, 齋藤嘉朗.: 第 64 回日本アレルギー学会学術大会. 2015 (東京)
- 21) 佐井君江, 中村亮介, 今任拓也, 岡本好海, 梶波康二, 松永佳世子, 相原道子, 齋藤嘉朗.: 第 42 回日本毒性学会学術年会. 2015 (金沢)
- 22) 中村亮介, 岡本(内田)好海, 松澤由美子, 石井明子, 齋藤嘉朗.: 第 22 回日本免疫毒性学会学術年会. 2015 (京都)
- 23) Nakamura R, Kaniwa N, Ueta M, Okamoto-Uchida Y, Sugiyama E, Maekawa K, Takahashi Y, Furuya H, Yagami A, Matsukura S, Ikezawa Z,

Matsunaga K, Tokunaga K, Sotozono C, Aihara M, Kinoshita S, Saito Y.: 1st International Stevens-Johnson Syndrome Symposium. 2016 (京都)

24) 岡本(内田)好海, 中村亮介, 千貫祐子, 若林翼, 打田光宏, 土屋敏行, 齋藤嘉朗, 森田栄伸.: 日本薬学会第 136 年会. 2016 (横浜)

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Edited by Gibbs BF and Falcone FH.: Basophils and Mast Cells. 2014:177-184.
- 2) 監修: 森山達哉, 穂山 浩.: 食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発. 2015:138-143.

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 1 件)

名称: I 型アレルギーの検査方法
発明者: 中村亮介、手島玲子
権利者: 国立医薬品食品衛生研究所長
種類: 特許
番号: 特許第 5386691 号
取得年月日: 平成 21 年 7 月 17 日
国内外の別: 国際 (C 1 2 Q 1/02、C 1 2 N 5/10、C 1 2 N 15/09)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)
国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長
研究者番号: 5 0 3 3 3 3 5 7
- (2) 研究分担者
中村 里香 (NAKAMURA, Rika)
国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・研究員
研究者番号: 4 0 6 4 3 3 3 3

(3) 連携研究者
()

研究者番号: