

200501059A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

新規培養細胞系を用いた
アレルギー性評価試験法に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書
(H17-食品-014)

主任研究者 中村 亮介

平成 18 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

新規培養細胞系を用いたアレルギー性評価試験法に関する研究

中村 亮介

..... 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 29

新規培養細胞系を用いたアレルギー性評価試験法に関する研究

主任研究者 中村 亮介 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部主任研究官

研究要旨 本研究は、アレルギー反応において重要な役割を果たすマスト細胞が発現する高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) の架橋に基づくユニークな活性化メカニズムに着目し、IgE の結合量を調べる従来の試験法とは全く異なる原理に基づいた新しいアレルギー性評価試験法を開発し、これにより食品の加熱・消化等の加工によるアレルギー性の変化を定量的に解析できる系を確立することで、食品の安心・安全確保に貢献しようというものである。平成 17 年度は、ラット培養マスト細胞株 RBL-2H3 細胞にヒト FcεRIα 鎖を発現させた系、ならびに、ヒト FcεRIα とヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) のキメラ受容体 (IgE/EGFR) を発現させた系を開発し、その有用性を検討した。作製した RBL-hEla-2B12 細胞は、おそらくは内在性のラット FcεRI の各サブユニットと複合体を形成して細胞膜上にヒト FcεRIα 鎖を安定的に発現し、ヒト IgE および抗ヒト IgE 抗体により受容体を架橋することによって、細胞内 Ca²⁺応答および脱顆粒反応を誘導できることが分かった。また、アレルギー患者血清中 IgE を 56°C で 30 分間加熱して補体を非働化し、RBL-hEla-2B12 細胞を 18 時間感作した上で架橋したところ、脱顆粒反応が惹起された。これに基づいて IgE 量を測定したところ、酵素免疫法によって得られた値とよく相関する結果が得られた。一方、IgE/EGFR cDNA を作製し転写因子 Elk1 によりルシフェラーゼ遺伝子の発現が誘導される HeLa 細胞に発現させたところ、細胞表面へのヒト IgE の結合が観察され、感作 IgE 量に応じたルシフェラーゼの発現が認められた。

A. 研究目的

わが国における食物アレルギーの患者数は年々増加の一途をたどり、近年では国民の 14 人に 1 人が何らかの食物アレルギーを抱えているといわれている。食物アレルギーは、日々栄養源として摂取しなければならない食品中にその原因物質となるアレルギーが含まれているという点が他のアレルギーと大きく異なっ

ている。その種類や量は膨大で、時に人類が未だ食したことのないものが含まれる。

このような状況から、厚生労働省が平成 14 年 4 月より、食品中に含まれるアレルギーとなりうる特定原材料等の表示を義務化したということはよく知られているところである。これを受け、現在特定原材料等のアレルギー性評価試験法

の確立が望まれているが、アレルゲンの食品加工に伴う分解・変性および修飾に応じたアレルゲン性評価試験法は未だ十分なものがないというのが現状である。

たとえば、ピーナッツのアレルゲンである Ara h 2 は、加熱処理によりそのアレルゲン性（患者 IgE との結合性）が増加することが知られているが¹⁾、このようなアレルゲン性の変化が患者の臨床症状に影響を及ぼすかどうかを感度よく定量的に解析する方法は未だ確立されていないといつてよい。

また近年、人類が未だ食したことのない新規タンパク質が導入された遺伝子組換え作物も開発されており、新規タンパク質のアレルゲン性を予測することも、食品の安心・安全を確保する上で重要な課題となっている。

本研究は、より臨床症状を反映できるアレルゲン性評価試験法を新規に確立し、既存および新規アレルゲンによるアレルギー危害を防止することを目指すものである。具体的には、アレルギー反応において中心的な役割を果たしているマ

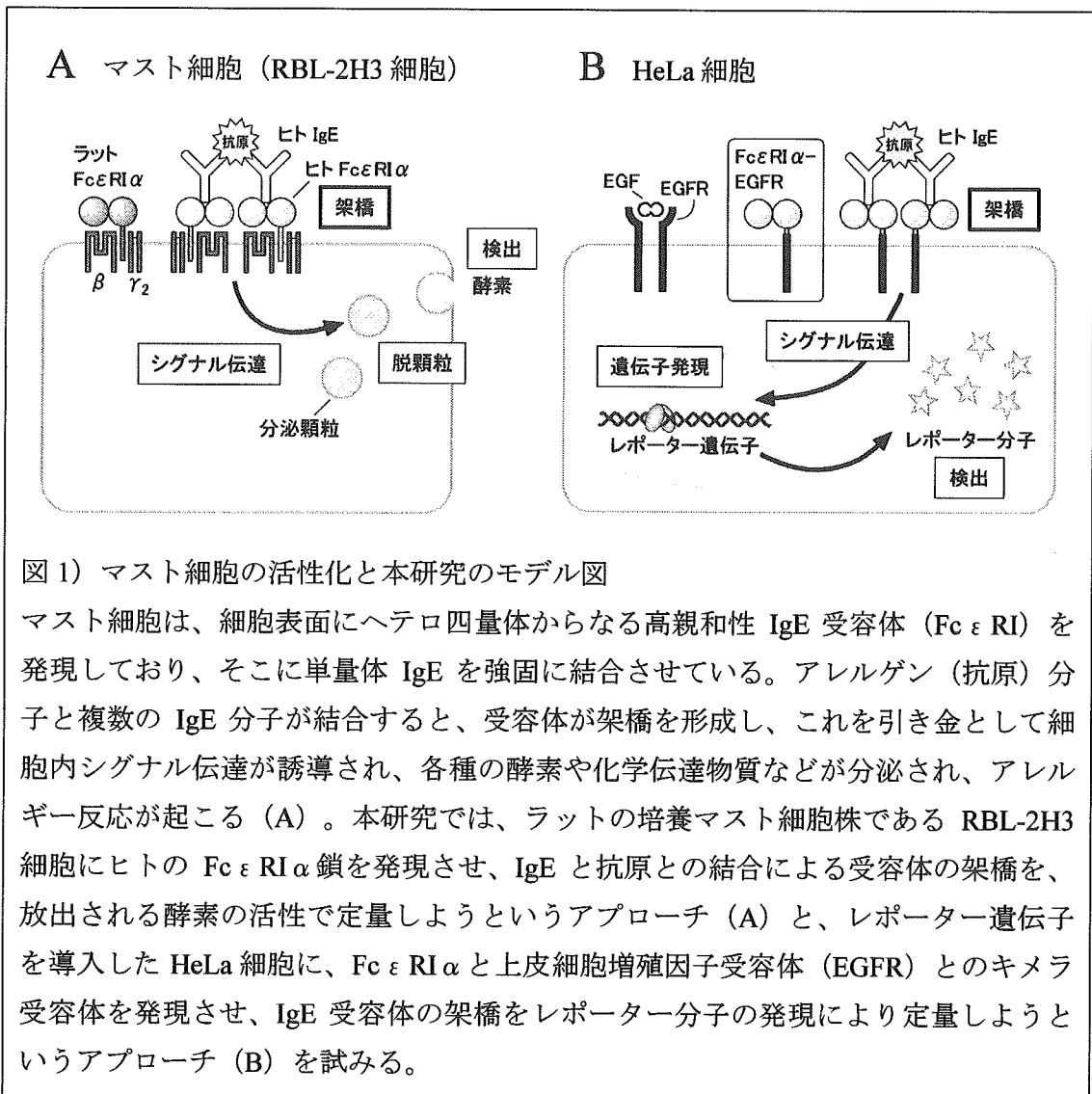


図 1) マスト細胞の活性化と本研究のモデル図

マスト細胞は、細胞表面にヘテロ四量体からなる高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) を発現しており、そこに単量体 IgE を強固に結合させている。アレルゲン (抗原) 分子と複数の IgE 分子が結合すると、受容体が架橋を形成し、これを引き金として細胞内シグナル伝達が誘導され、各種の酵素や化学伝達物質などが分泌され、アレルギー反応が起こる (A)。本研究では、ラットの培養マスト細胞株である RBL-2H3 細胞にヒトの FcεRIα 鎖を発現させ、IgE と抗原との結合による受容体の架橋を、放出される酵素の活性で定量しようというアプローチ (A) と、レポーター遺伝子を導入した HeLa 細胞に、FcεRIα と上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) とのキメラ受容体を発現させ、IgE 受容体の架橋をレポーター分子の発現により定量しようというアプローチ (B) を試みる。

スト細胞の活性化シグナル伝達に着目し、新たなアレルギー性評価試験法を確立することをめざす。

マスト細胞は細胞表面高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) を発現しているが、アレルギー特異的 IgE が一分子のアレルゲンに対し複数分子結合することで Fc ϵ RI が架橋され、これを引き金として様々な細胞内情報伝達が誘導され、最終的にはマスト細胞が活性化され、ヒスタミンやセロトニンなどの炎症性科学伝達物質や各種のサイトカインやケモカインなどの免疫調節因子が放出される (図 1)。

ここで重要なことは、マスト細胞の活性化のためには IgE とアレルゲンとが結合するだけでは不十分で、受容体の架橋が形成される必要がある、という点である。これはすなわち、RAST (radioallergo-sorbent test) 法などの IgE とアレルゲンとの結合を調べる従来法では、食品の加工等によって生じたタンパク質断片などのアレルゲン性を正しく評価できない可能性があるということの意味する。

そこで本研究では、細胞膜上でのヒト IgE による Fc ϵ RI の架橋を検出する系を構築し、より生理的なアレルギー性評価試験法を確立することを試みた。

実験に用いた系は二つあり、一つはラットの培養マスト細胞株にヒト Fc ϵ RI α 鎖を発現させたもので、もう一つはヒト Fc ϵ RI α と上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) とのキメラ受容体を用いた系である (図 1)。

B. 研究方法

1) 細胞

ラット培養マスト細胞株 (RBL-2H3) は、カナマイシンおよび 10% の FCS を添加した DMEM にて、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した²⁾。細胞は 3 乃至 4 日に 1 回の間隔でラバーポリスマンにより回収し、新しいフラスコに植え継いだ。

ヒト子宮頸部癌細胞 HeLa 細胞は、ペニシリン-ストレプトマイシンおよび 10% の FCS を添加した DMEM にて、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。細胞は 3 乃至 4 日に 1 回の間隔で、トリプシン-EDTA により回収し、新しいフラスコに植え継いだ。

転写因子 Elk1 によりレポーター遺伝子ホタルルシフェラーゼの転写が活性化される遺伝子を組み込んだ HeLa 細胞 (HLR-Elk1 細胞) は、グルタミンの供給源として GlutaMAX-1 (Invitrogen) を用い、ペニシリン-ストレプトマイシンおよび 10% の FCS を添加した DMEM に、250 μ g/ml Geneticin および 100 μ g/ml Hygromycin B を添加したものをを用いた³⁾。細胞は 3 乃至 4 日に 1 回の間隔で、トリプシン-EDTA により回収し、新しいフラスコに植え継いだ。

2) 遺伝子の調製とプラスミド構築

ヒト Fc ϵ RI α の cDNA は ATCC より購入 (pGEM-3-110B-1) し、これを鋳型として後述のプライマーを用いて ExTaq (TaKaRa) による PCR (94°C3 分の後、94°C1 分・52°C1 分・72°C1 分を 30 サイ

クル、72°Cで7分)により全長 cDNA の両末端に EcoRI および Sall サイトを導入した遺伝子断片を増幅した。上流: GAA TTC GAA GAA GAT GGC TCC TGC、下流: GTC GAC TAA ATC CTT GAG CAC AGA C。配列を確認し、哺乳動物発現ベクター pCI-neo (Promega) に組み込んだ⁴⁾。

ヒト EGFR の部分 cDNA は、HeLa 細胞の全 mRNA を逆転写した 1st strand cDNA を鋳型として、後述のプライマーを用いて、非常に高い校正活性を持つことが知られている DNA ポリメラーゼである Pwo (Roche) による PCR (95°C2 分の後、95°C0.5 分・48°C1 分・72°C1.5 分を 30 サイクル、72°Cで7分)により調製した。上流: GAA GGC TGT CCA ACG AAT GG、下流: TGC TCC AAT AAA TTC ACT GCT TTG。

ヒト Fc ϵ RI α とヒト EGFR のキメラ受容体 (IgE/EGFR) の作製は、splice overlapping extension (SOE) 法によった。これは、ヒト Fc ϵ RI α の細胞外ドメインとヒト EGFR の細胞膜および細胞内ドメインとを SOE プライマーにより cDNA レベルで融合させる方法である。酵素は Pwo (Roche) を用い、両末端のプライマーを加え、PCR (95°C2 分の後、95°C0.5 分・58°C1 分・72°C2 分を 30 サイクル、72°Cで7分)により全長 cDNA を得た。配列を確認し、哺乳動物発現ベクター pcDNA3.1 D-TOPO (Invitrogen) に組み込んだ。

3) 遺伝子導入

安定発現株の作製にはエレクトロポレーション法を用いた。RBL-2H3 細胞を HBS (50 mM Hepes buffer pH 7.4 containing 180 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 6 mM glucose) により二度洗浄し、K-PBS (30 mM NaCl, 120 mM KCl, and 10 mM MgCl₂ を含む 10 mM PBS) に 2 x 10⁷ cells/ml となるよう懸濁し、1 x 10⁷ 個の RBL-2H3 細胞に対し 20 μ g のプラスミドを加え、GenePulser II (Bio-rad) により 250V, 950 μ F の電気パルスを与えて導入した。安定発現株の選択には 500 μ g/ml の geneticin (Invitrogen) を用い、後に限界希釈を行った。

一過性発現には Lipofectamine 2000 (Invitrogen) によるリポフェクション法を用いた。1 x 10⁵ 個の細胞を 24 ウェルプレートに播き、一晚培養して接着させた。血清および抗生物質を含まない DMEM 200 μ l で 2 回洗浄した。その間にプラスミド 200 ng および Lipofectamine 2000 を 1.5 μ l をそれぞれ 25 μ l の Opti-MEM I (Invitrogen) に溶解して室温で 5 分放置し、両者を混合してさらに 20 分放置して複合体を形成させた。この複合体 50 μ l を各ウェルに添加し、37°Cで 6 時間培養したのち、10% FCS を含む DMEM に置換して一晚培養した。実験は導入開始より 48 時間後に行なった。

4) 試薬

RBL-2H3 細胞を用いた実験には、ヒト IgE としてミエローマ由来 IgE を Chemicon 社より購入した。抗ヒト IgE 抗

体は American Qualex Antibodies 社より購入した。卵白タンパク質は Greer Laboratories 社より購入した。コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*; Df) 抽出物は LSL 社より購入した。

HLR-Elk1 細胞を用いた実験には、標準ヒト IgE を Immunology Consultants Laboratory 社より購入した。抗ヒト IgE 抗体 (FITC 標識および非標識) は Bethyl 社より購入した。FITC 標識抗 V5 タグ抗体は Invitrogen 社より購入した。

5) 脱顆粒の測定

ヒト Fc ϵ RI α 発現 RBL-2H3 細胞の活性化の測定には、分泌顆粒に含有される β -hexosaminidase 酵素の活性により定量した⁵⁾。24 ウェルプレートに細胞を播き、ミエローマ由来 IgE は 3 時間、患者血清は 18 時間、37°C で感作した。細胞を 2 回洗浄し、PIPES buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM MgCl₂, 1.0 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, 10 mM PIPES, pH 7.4) に溶かした抗ヒト IgE 抗体により、37°C、30 分間刺激した。上清を採取し、*p*-nitrophenyl-2-deoxy- β -glucopyranoside を基質とする酵素反応を、吸光光度計にて測定した。活性値は、0.2% Triton X-100 で細胞を溶解させた場合の値を 100 とおいた相対値で表した。

6) 単一細胞内 Ca²⁺濃度測定

RBL-2H3 細胞をガラスボトムディッシュ (Meridian Instruments) に一晚培養して接着させた。これを 6 μ M の fura-2AM (Dojindo) により 37°C、15 分間処理して Pipes buffer で洗浄してさらに 15

分間静置し、Pipes buffer で 2 回洗浄したうえで、蛍光顕微鏡を用いた画像解析システム Argus-50 により測定した⁶⁾。細胞は 340 nm および 380 nm で交互に励起され、500 nm の蛍光を計測した。

7) 細胞内 Ca²⁺濃度測定

RBL-2H3 細胞を 1 μ g/ml の IgE または患者血清により感作し、6 μ M の fura-2AM (Dojindo) により 37°C、15 分間処理して Pipes buffer で洗浄してさらに 15 分間静置し、Pipes buffer で 2 回洗浄したうえで、PIPES buffer に再懸濁して、100 μ g/ml の抗原または 10 μ g/ml の抗ヒト IgE 抗体により刺激した。その際の fura-2 の蛍光強度変化を蛍光分光光度計 RF-5000 (島津製作所) により経時的に測定した。

8) 酵素免疫法 (EIA)

ヒト患者血清中の全 IgE 量の測定には蛍光酵素免疫法 (UniCAP System、ファルマシア) または比色法 (Mesacup IgE Test、MBL) を用いて行なった。

9) フローサイトメトリー

HLR-Elk1 細胞を 6 ウェルプレートでリポフェクションして 48 時間後に、細胞をラバーポリスマンで剥がし、2% FCS を含む PBS (F-PBS) で 2 度洗浄し、10 μ g/ml ヒト IgE を氷中で 30 分感作し、2 度洗浄し、10 μ g/ml の FITC 標識抗ヒト IgE 抗体によりさらに 30 分氷中に置いた。これを 2 度洗浄し、FACSCalibur (ベクトン・ディッキンソン社) により測定を行なった。解析には、システム付属の解析ソフト CellQuest を用いた。

10) 共焦点レーザー顕微鏡

35mm グラスボトムディッシュ (Mat Tek 社) に一晚培養した HLR-Elk1 細胞に各種受容体遺伝子またはコントロール遺伝子を導入し、48 時間後に試料作成を開始した。導入タンパク質の発現の確認実験には、細胞を PBS で 2 度洗浄した後、 -20°C に冷却したメタノールで 2 分間固定の後、PBS で 2 度洗浄して F-PBS に置換して 4°C で 15 分間ブロッキングを行なった。その後、FITC 標識抗 V5 抗体 (200 倍希釈) を 4°C で 30 分間作用させ、F-PBS で 2 度洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 Digital Eclipse C1 (ニコン社) により光学的断層像の観察を行なった。また、ヒト IgE の結合実験には、細胞を F-PBS で 2 度洗浄した後、200 ng/ml ヒト IgE で 4°C 、30 分間感作し、F-PBS で 2 度洗浄し、 $10\mu\text{g/ml}$ の FITC 標識抗ヒト IgE 抗体で 4°C 、30 分間染色を行なった。F-PBS で 2 度洗浄した後、Digital Eclipse C1 により共焦点観察を行なった。

11) ルシフェラーゼアッセイ

受容体遺伝子 (400 ng/well) および参照となるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (Renilla; 20 ng/well) を導入して 30 時間後に、血清を含まない DMEM に置換した上、 $0\sim 200\text{ ng/ml}$ のヒト IgE を無菌的に添加した。これをさらに 18 時間培養後、血清を含まない DMEM で 2 回洗浄し、抗ヒト IgE 抗体 $10\mu\text{g/ml}$ により刺激し、 $5\%\text{ CO}_2$ 存在下で 37°C で 3 時間培養した。細胞を冷 PBS で 2 度洗浄し、Dual Luciferase Assay System (Promega

社) により同社のプロトコルに従って試料を調製した。測定には、ARVO SX (Perkin Elmer 社) を用い、ホタルおよびウミシイタケ由来ルシフェラーゼの化学発光をそれぞれ 10 秒間自動的に計測した。

12) 血清試験に伴う研究倫理

本研究で使用されたアレルギー患者血清は、すべてアレルギー解析等に用いられる旨のインフォームドコンセントを得ている。また、PlasmaLab International より販売されている血清は、同様にインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果・考察

(1) ヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 発現 RBL-2H3 細胞の作製

薬剤耐性マーカー (Geneticin) により得られたヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 発現 RBL-2H3 細胞に、ヒト IgE (1 および $0.1\mu\text{g/ml}$) を作用させ、 $10\mu\text{g/ml}$ の抗ヒト IgE 抗体により刺激したところ、受容体を発現させた RBL-2H3 細胞においては、IgE 濃度それぞれに応じて 3.91% および 2.75% の β -hexosaminidase の放出が観察され、弱いながらも受容体の架橋によるマスト細胞の活性化を定量することができた (表 1)。一方、発現ベクター (pCI-neo) のみを導入した場合には、酵素放出はそれぞれ 1.09% および 1.11% と、変化はなかった。RBL-2H3 細胞はラットの $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を元々発現しているため、この細胞はマウス IgE を結合することが知られている⁶⁾。よって、これらの細胞を

dinitrophenyl (DNP) 基特異的なマウス IgE により感作し、DNP 化した BSA を抗原として刺激したところ、受容体遺伝子およびベクター遺伝子のみを導入した RBL-2H3 細胞において、それぞれ 13.34% および 20.75% の β -hexosaminidase 放出が観察された。これらの結果は、導入したヒト Fc ϵ RI α 遺伝子がラットの培養マスト細胞株である RBL-2H3 細胞において正常に発現し、おそらくはラット由来の Fc ϵ RI のその他のサブユニット (β および γ) と複合体を形成し、細胞膜上で機能していることを示唆している。また、発現したヒト Fc ϵ RI α は、期待された通りヒトの IgE の抗体による架橋によって活性化シグナル伝達を誘導しているものと考えられた。

マスト細胞における Fc ϵ RI の活性化シグナル伝達においては、細胞内 Ca²⁺ の濃度変化が非常に重要な役割を担っていることが知られている⁶⁾。すなわち、架橋された受容体はまず数々のチロシンリン酸化酵素を活性化し、これにより活性化を受ける脂質代謝酵素 PLC- γ によりイノシトール三リン酸 (IP3) が切り出され、これが小胞体膜上に存在する IP3 受容体に作用して、細胞内 Ca²⁺ ストアである小胞体より細胞質への Ca²⁺ 流出を誘導するが、一方で小胞体の Ca²⁺ 枯渇をシグナルとして細胞膜上の CRAC チャネルとよばれる Ca²⁺ チャネルが活性化して細胞外からの Ca²⁺ 流入を促進し、これにより劇的な細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を引き起こす⁷⁾。これは最終的には分泌顆粒と細胞

膜との融合を促進すると考えられており、事実細胞外の Ca²⁺ を EGTA によりキレートすると脱顆粒反応は起こらなくなることが知られている⁸⁾。よって、次に、これらのトランスフェクタントの IgE 架橋による細胞内 Ca²⁺ 応答を、単一細胞レベルで解析することにした。

図 2 に示したように、これらのトランスフェクタントのうち多くの細胞は、抗体ヒト IgE 抗体による架橋から数十秒のラグタイムの後、劇的な細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を引き起こした。これは、よく知られている RBL-2H3 細胞の特異的抗原による Fc ϵ RI を介する刺激時のパターンとほぼ同様である⁹⁾。いくつかの細胞は応答しないことが分かったが、これは、導入した受容体遺伝子がすべての細胞において高レベルには発現していないこと、細胞周期による応答性の相違、などが原因として考えられた。このうち、細胞周期によるものは仕方がないが、発現レベルによる応答性の相違は、今後の定量的実験において不都合があると思われるので、これらのトランスフェクタントを限界希釈法 (0.6 cells/well) によりクローニングすることにした。クローンの選択は、ヒト IgE および抗ヒト IgE 抗体による β -hexosaminidase 酵素の放出活性に基づいて行なった。その結果、いくつかのクローンがヒト IgE の濃度に依存して高い酵素放出活性を示すことが分かった。これらのクローンは、RBL-hEla-2B12、RBL-hEla-1G4、RBL-hEla-1C10 と名付けられ、図 3 に示したような濃度依

存性を示した。なお、データは示していないが、これら 3 者とも、マウス抗 DNP-IgE および DNP-BSA による刺激には同程度の応答を示した。また、陰性対照のため、発現ベクターのみを導入した細胞もクローニングを行なったが、これらの細胞は当然ながら IgE を架橋しても β -hexosaminidase 酵素を放出することはなかった。陰性対照として得られたクローンの一つ (RBL-pCI-1C5) についてのデータを図 3 に示した。また、酵素放出に関するデータを表 2 にまとめた。

これらの結果は、ヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ を安定的かつ機能的に発現する RBL-2H3 細胞のクローン細胞が複数種得られたことを示している。これらの細胞は、少なくとも培地中に規定量 (500 $\mu\text{g/ml}$) の Geneticin を加えている限りは安定して受容体分子を発現し続け、継代している間に発現がなくなってしまうような問題は観察されなかった。

(2) ヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ トランスフェクタントの細胞内 Ca^{2+} 応答

細胞内 Ca^{2+} は脱顆粒反応をはじめとするマスト細胞の活性化において非常に重要な役割を果たしている。特に脱顆粒反応においては、カルシウムイオノフォアによる強制的な Ca^{2+} の流入のみで脱顆粒反応が起こることや、細胞を懸濁させているバッファー中の Ca^{2+} を EGTA 等のキレーターにより除去してやることでまったく脱顆粒反応が起こらなくなることなどからも、その重要性が理解できる¹⁰⁾。そこで、次に、これらのトランス

フェクタントのヒト IgE による刺激応答を解析するため、細胞集団レベルにおける細胞内 Ca^{2+} 応答を指標にして解析を行なった。

トランスフェクタントとしては、選択した際の β -hexosaminidase 酵素の放出活性が最も高かった RBL-hE1a-2B12 を、陰性対照としては RBL-pCI-1C5 を用いた。これらの細胞を 1 $\mu\text{g/ml}$ ヒト IgE で 3 時間感作し、fura-2 AM で標識したうえで蛍光分光光度計にて 335 nm および 362 nm で交互に励起した場合の 500 nm の蛍光強度の比をもって細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。その結果、RBL-hE1a-2B12 細胞においては、抗ヒト IgE 抗体で刺激をすると、すばやく細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇し、その後緩やかに減少していくことが分かった (図 4A)。一方、陰性対照としての RBL-pCI-1C5 細胞ではこのような応答は見られなかった (図 4B)。いずれにおいても、陽性対照であるイオノマイシン添加による応答は同程度に観察された。なお、データは示していないが、マウス抗 DNP-IgE で感作して DNP-BSA で刺激した場合は、このような Ca^{2+} 応答は観察されなかった。これらの結果は、クローニングされた RBL-hE1a-2B12 細胞が極めて効率よくヒト IgE の架橋によって細胞内 Ca^{2+} 応答を惹起し、蛍光分光光度計によりモニタすることが可能であることを示している。また、RBL-pCI-1C5 においては同様の応答が全く観察されなかったことは、この Ca^{2+} 応答がヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ に特異的に依存していることを

示している。

(3) アレルギー患者血清中 IgE を用いての抗原特異的 Ca^{2+} 応答

次に、精製されたヒト IgE ではなく、アレルギー患者血清中の IgE とその患者が反応する抗原とによってトランスフェクタントを活性化した場合の細胞内 Ca^{2+} 応答を調べた。

しかし、予想しなかったことであるが、患者および健常人の血清を希釈して RBL-hE1a-2B12 細胞を感作したところ、多くの細胞が死んでしまうことが分かった。そこで血清を $56^{\circ}C$ で 30 分間処理をして補体を不活性化したところ、このような細胞傷害性はみられなくなった。よって、この細胞傷害性は、ラットの培養マスト細胞株である RBL-2H3 細胞にヒトの血清を作用させたために起こった、種特異的な補体反応であろうと想像された。そのため、今後のヒト血清を用いた実験には、すべて補体の非働化処理を施してある。

用いた患者血清は二種類で、一つは卵白に反応する患者由来で、もう一つはダニ (*Dermatophagoides farinae*, Df) に反応する患者由来である。全 IgE レベルを EIA 法で定量したところ、それぞれ 1500 および 2900 IU/ml であった。一方、健常人由来の血清では、260 IU/ml であった。RBL-hE1a-2B12 細胞を、様々に希釈されたこれらの患者血清で感作して 18 時間後に、蛍光分光光度計を用いて細胞内 Ca^{2+} 応答を調べた。精製ヒト IgE を用いた場合は感作時間は 3 時間で十分で

あったが、患者血清を用いる場合は 18 時間を要した。Fc ϵ RI は IgE が結合するとその細胞表面への発現量が増加することが知られており¹¹⁾、精製 IgE の場合は効率よく感作ができたものの、血清を用いた場合はこのメカニズムによる受容体のアップレギュレーションが必要であった、という可能性があると思われる。RBL-hE1a-2B12 細胞を $10\mu g/ml$ の抗ヒト IgE 抗体により刺激したところ、図 5A および B に示したような Ca^{2+} 応答が観察された。また、健常人由来血清を用いた場合には Ca^{2+} 応答は観察されなかった (図 5C)。イオノマイシンにより刺激した場合は、いずれの場合も最大の Ca^{2+} 応答を誘導した。また、データは示していないが、発現ベクターのみを導入した RBL-pCI-1C5 細胞においては、抗ヒト IgE 抗体で刺激をしても何も反応が起らなかった。ダニ患者血清を 5 倍・25 倍・125 倍に希釈して感作したところ、希釈倍率に応じた Ca^{2+} 応答が観察され、この応答が感作に用いた IgE の濃度に依存することが示唆された。しかし、患者血清で感作をした際にそれぞれの患者が反応する特異抗原 ($100\mu g/ml$ 卵白タンパク質、Df 抽出物) で刺激をした場合には、有意な Ca^{2+} 応答は観察されなかった。

抗ヒト IgE 抗体による受容体架橋では RBL-hE1a-2B12 を活性化することができたが、特異抗原を用いた場合ではうまく活性化を検出することができなかったという結果は、この受容体が α 鎖のみヒト由来であり、残りの β および γ 鎖はも

ともとのラット由来のサブユニットを持つ、いわばキメラ混成の受容体であったことが関係あるかもしれない。親株である RBL-2H3 細胞にはもともとラット由来の α 鎖が発現しており、細胞膜上ではヒト α 鎖を含む 4 量体と、すべてラット由来分子からなる 4 量体とが混在していると推定される。このうち、ヒト IgE を結合できるのは前者のみであるから、特異抗原での刺激によって十分な受容体架橋が起こるには、ヒト α 鎖を含む受容体の数が十分でなかったのではないかと考えられる。抗ヒト IgE 抗体を用いた活性化の実験でさえ、精製 IgE の場合とは異なり、18 時間もの感作時間を必要としたこともそれと関係があるかもしれない。いずれにせよ、患者血清とその特異抗原を用いた受容体架橋を検出するには、さらなる実験系の改良が必要と思われた。

(4) β -hexosaminidase 酵素放出と全 IgE 濃度との相関性

β -hexosaminidase 酵素の放出は IgE 濃度に依存するということが報告されており、次に、RBL-hE1a-2B12 細胞の脱顆粒反応に基づいてヒト血清中 IgE を感度よく定量することを試みた。RBL-hE1a-2B12 細胞を 96 ウェルプレートに培養し、希釈した患者血清を 18 時間作用させ、抗ヒト IgE 抗体で刺激をしたときの細胞外へ放出された β -hexosaminidase の活性を定量した。すなわち、各種濃度の精製ヒト IgE で感作して刺激を行なった場合の酵素放出量の標準曲線を描き (図 6B)、患者血清を用いた場合の酵素放出

量から、血清中全 IgE 量を計算した。なお、血清の希釈倍率によっては、酵素の放出活性と EIA 法との相関が悪くなることがあったため、希釈倍率としては、用いた 5 倍・25 倍・125 倍のうち、最も酵素放出活性の高かった一点を用いた。

その結果、EIA 法で求めた患者血清中全 IgE 量と β -hexosaminidase 酵素放出量との間には良好な相関が認められ、その相関係数は $R=0.857$ であった (図 6A)。

(5) ヒト $Fc\epsilon RI\alpha$ 発現 RBL-2H3 細胞の利点と改善すべき点

本実験系は、ラットの培養マスト細胞株である RBL-2H3 細胞にヒトの高親和性 IgE 受容体の α 鎖を発現させ、ヒトとラットのキメラ混成となる受容体の IgE による架橋を、 Ca^{2+} 応答および脱顆粒反応によって定量的に解析しようという画期的な系であった。だが、結果として、ヒトの IgE と抗ヒト IgE 抗体による受容体架橋の定量は可能であることを示したものの、アレルギー患者血清とその特異抗原を用いた場合は、マスト細胞活性化を定量するには至らなかった。これには、本文中でふれたように、混成受容体の細胞膜上への発現量が十分ではなかった可能性があると思われた。また、用いる患者血清はヒトのものであり、培養細胞系はラットのものであるという点も、測定を困難にする一因となっていた。これらの問題点は、細胞系をヒトに移行させることによって大幅に改善できると期待された。

また、実際のアレルギー患者血清中全 IgE 量は、かならずしも臨床症状を反映しないということが知られている。これは、血清中には様々な IgE と Fc ϵ RI との結合を阻害する因子があることがその理由の一つと考えられている。すなわち、抗 Fc ϵ RI 自己抗体や抗 IgE 自己抗体の存在がそれである¹²⁾。逆に、非常に高いレベルの血清中 IgE が存在するにもかかわらず、パッチテストで陰性の反応を示す患者の存在も知られている¹³⁾。このように、血清中 IgE の量をただ測定するだけでは、実際に IgE 受容体に結合できる IgE、言い換えればアレルゲンとして有効に働く IgE の量がどの程度か、を知ることができない可能性があることを示していると考えられる。本実験系は、実際にマスト細胞上の IgE 受容体に結合可能な IgE の量を測定するシステムであり、この意味では、EIA や RAST 法など従来の手法に比べてより臨床症状を反映できる系を確立することができたと考えられる。

しかし、前述したいくつかの欠点を補うため、細胞系をヒトに移し、かつキメラ混成が問題とならないような新しい系を次に構築した。

(6) IgE/EGFR キメラ受容体遺伝子の作製

RBL-hE1a-2B12 細胞を用いた上記の実験系の欠点を克服すべく、次に、高親和性 IgE 受容体と、上皮増殖因子 (EGF) 受容体とのキメラ受容体 (IgE/EGFR) を用いる実験系を考案した (図

1B)。EGFR はほとんどすべての体細胞に発現しており、細胞の増殖を制御する EGF の結合によって二量体が形成され、これにより受容体の細胞内ドメインに存在するチロシンキナーゼが互いの分子をチロシンリン酸化することによって活性化し、Grb2、Sos、Ras、Raf、MEK、Erk などの活性化を経て、転写因子である Elk1 の活性化にいたり、細胞増殖に関わる様々な因子の転写を誘導することが知られている^{14,15)}。主任研究者は、このメカニズムに着目し、これを Fc ϵ RI の架橋を検出する目的に使えないだろうか考えた。すなわち、細胞外が Fc ϵ RI α であり、細胞内に EGFR を持つというキメラ受容体を作製すれば、この受容体は細胞外で IgE を高親和性に結合し、さらに抗原によって IgE が架橋されることによって受容体の細胞内ドメインに存在するチロシンキナーゼが活性化され、シグナル伝達を誘導することが期待された。また、用いる培養細胞をヒト由来細胞にすることによって、患者血清を用いる際の補体による細胞傷害性から逃れることを狙った。さらに、細胞に前もって転写因子 Elk1 の活性化によって転写が誘導されるレポーター遺伝子を導入しておくことによって、受容体の架橋による活性化を、簡便かつ極めて高感度に測定できる系を確立することを考えた。これは、主任研究者独自のアイデアに基づく新システムである。具体的には、外来遺伝子の導入実績に優れる、ヒト子宮頸部癌由来細胞株である HeLa 細胞に、レポーター

遺伝子として Elk1 の活性化に応じてホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現が誘導されるようなトランス因子を安定に組み込んだ、HLR-Elk1 細胞を用いることにした³⁾。

まず、Fc ϵ RI α 鎖遺伝子の細胞外ドメインを PCR により調製した。この際、cDNA の 3'側は SOE 法により EGFR 遺伝子と融合できるような配列を付加しておいた。一方で、HeLa 細胞の全 mRNA より RT-PCR によって EGFR 遺伝子の細胞膜及び細胞内ドメインの遺伝子を調製した。この cDNA も、同様に 5'側を SOE 法による融合配列を付加してある。両遺伝子を混合し、両末端プライマーによって SOE 法を行なった。図 7 に示した通り、期待通りの分子サイズの遺伝子を増幅することができたため、これを哺乳動物発現ベクター pcDNA3.1 D-TOPO に組み込んだ。また、陰性対照となる、キメラ受容体の細胞内ドメインを持たないもの (IgE/dICR) の遺伝子を PCR により調製した。これらのキメラ受容体遺伝子は、シーケンスを解析し、予想配列と 100% マッチしていることを確認したうえで大量調製し、それぞれ約 0.3 mg を得ることに成功した。

(7) HLR-Elk1 細胞へのキメラ受容体遺伝子の導入および IgE 結合性の解析

まず、これらの遺伝子および発現ベクターのみをリポフェクション法により HLR-Elk1 細胞に導入し、48 時間後に単量体ヒト IgE を導入細胞に氷中で 30 分間感作し、FITC 標識抗ヒト IgE 抗体により

IgE のこれら細胞への結合性をフローサイトメトリーにより計測した。その結果、大部分の細胞は IgE を結合していなかったが、結合している細胞の割合は、キメラ受容体を発現させた場合の方が高い傾向にあることが分かった (表 3)。この結果は、目的のキメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトの IgE を高親和性に結合できることを示唆している。

しかし、予想よりもその割合が低かった (3.75% および 3.91%) のは、細胞をラバーポリスマンで剥がす際に細胞に加わった物理化学的侵襲が原因である可能性が推定されたため、次に、細胞を培養ディッシュに結合させたままの状態ですべて単量体 IgE の結合性を解析することを試みた。すなわち、共焦点レーザー顕微鏡による細胞の断層撮影である。

キメラ受容体遺伝子または発現ベクターのみをリポフェクション法により HLR-Elk1 細胞に導入して 48 時間後に、ディッシュ内でヒト IgE および FITC 標識抗ヒト IgE 抗体により染色し、共焦点レーザー顕微鏡により HLR-Elk1 細胞の光学的断層像を取得した。この方法により、フローサイトメトリーでは調べることができなかった、IgE の細胞への結合が細胞内を含めた非特異的結合であるのか、細胞膜上の受容体に対する特異的な結合であるのかについても、ある程度示唆を与える情報を得ることができると期待された。

まず、キメラ受容体の C 末端側には V5 タグが付加されているため、FITC 標

識抗 V5 タグ抗体により、HLR-Elk1 細胞内のキメラ受容体タンパク質の分布を可視化することを試みた。メタノール固定により細胞を固定するとともに細胞膜を可溶化してキメラ受容体の細胞内分布を調べたところ、2 種のキメラ受容体を発現させた場合には、細胞内の小胞体と思われる網状の構造物および細胞膜への受容体の発現を確認することができた (図 8)。なお、この方法では、小胞体やゴルジ体などにおいて生合成過程にある受容体分子も可視化されているということに注意されたい。発現ベクターのみを導入した細胞では、明確な構造は観察されなかった。これらの結果は、目的のキメラ受容体タンパク質が細胞膜上に正常に発現していることを示している。

次に、これらのキメラ受容体とヒト IgE とが特異的に結合できるかどうかについて、ヒトポリクローナル IgE および FITC 標識抗ヒト IgE 抗体を用いて調べた。その結果、IgE/EGFR および IgE/dICR のキメラ受容体遺伝子をトランスフェクトした場合のみ、ヒト IgE の細胞膜表面への特異的な結合が観察された (図 9)。IgE を結合している細胞の割合は 7~8 割であった。当然ながら、すべての細胞が一過性に導入された遺伝子を発現するわけではないので、これは期待された範囲の受容体発現量 (IgE 結合量) であるといえよう。また、発現ベクターのみをトランスフェクトした細胞ではほとんど IgE の結合が観察されなかったことは、IgE の細胞への結合が完全にこれらキメ

ラ受容体の発現に依存していることを示している。

以上の結果は、本研究によって作成したヒト高親和性 IgE 受容体と EGF 受容体とのキメラ受容体およびその細胞内ドメイン欠失型陰性対照受容体をエンコードするプラスミドが、HLR-Elk1 細胞にリポフェクション法により効率よく導入されて細胞膜上に発現し、単量体ヒト IgE を高親和性に結合できることを示している。

(8) HLR-Elk1 細胞の IgE 架橋によるルシフェラーゼ発現の定量

上記 HLR-Elk1 細胞にキメラ受容体を発現させた系が実際に IgE の架橋によりレポーター遺伝子であるホタルルシフェラーゼを発現するかどうかを確認するため、次に、キメラ受容体 (IgE/EGFR および IgE/dICR) 遺伝子をリポフェクション法により導入し、0~200 ng/ml のヒト IgE を 18 時間感作後に抗ヒト IgE 抗体により架橋した際のルシフェラーゼの発現を解析した。なお、プラスミドの導入効率の差とホタルルシフェラーゼの発現量の差とを区別するため、リポフェクションの際に、各ウェルあたりキメラ受容体遺伝子 400 ng と同時に、発光基質の異なるルシフェラーゼであるウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼの遺伝子 20 ng を添加しており、これらの発光強度比をもって相対的なレポーター遺伝子の発現量とするデュアルレポーターアッセイを行なった。また、通常の培地に添加する FCS には EGF 等が含まれており、

Elk1 活性化のバックグラウンドが上昇してしまうため、IgE の添加と時を同じくして、FCS を含まない DMEM に置換してある。抗ヒト IgE 抗体は、やはり FCS を含まない DMEM 中に $10 \mu\text{g/ml}$ で調製し、これにより 37°C 、3 時間刺激を行なって、Passive Lysis Buffer により細胞を可溶化し、上清中のホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を ARVO SX により自動測定した。

その結果、IgE/EGFR を導入した細胞においては、すべての条件において IgE/dICR を導入したものよりも高いルシフェラーゼ活性を示した (図 10)。ルシフェラーゼ活性は用いた IgE の濃度に依存する傾向を示し、 200 ng/ml において最大の値を示した。しかし、抗ヒト IgE 抗体による架橋の効果は明確でなく、受容体架橋を定量的に解析するには、遺伝子の導入条件・感作条件・刺激時間等の実験の諸条件を改良していく必要があると思われた。だが、この系が少なくともヒト IgE の検出系として使用できる可能性を示すことができたと考えられる。

D. 結論

IgE とアレルゲンとの結合は、I 型アレルギー反応の惹起において最も重要なステップであるといえる。だが、その結合が真にマスト細胞の活性化を誘導し、アレルギー反応を惹起するためには、一分子のアレルゲンに対して複数の IgE 分子が結合し、高親和性 IgE 受容体が架橋される必要がある。その意味で、従来の

抗原特異的 IgE の検出系である RAST 法等は、臨床症状を反映した検出系であるとは言い切ることにはできないと思われる。また、アレルギー患者血清中の抗原特異的 IgE 濃度と臨床症状とは必ずしも相関しないが、その一因として、血清中に存在する IgE と受容体との結合を阻害する種々の因子 (抗 IgE 抗体や抗 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 抗体など) が考えられている¹²⁾。

本研究の最初で述べたラット培養マスト細胞株 (RBL-2H3 細胞) を用いる方法は、ヒト血清中に存在する IgE のうち、マスト細胞の細胞表面に存在する $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ に実際に結合できるものを検出することのできる優れた系として利用できる可能性が示された。ごく最近になって、上記の系とほぼ同様のシステムが、ドイツ Paul Ehrlich Institut のグループにより報告された¹⁶⁾。彼らの系では、ヒト血清で感作する際に補体を非働化する必要がないという点が本実験系と異なっているが、その違いが何に起因するのかは判明しなかった。筆頭著者の Vogel 博士に問い合わせたが、本実験系と彼らの実験系における本質的な差はなく、用いた血清のロットの違いによるものであるかもしれないと思われた。だがいずれにせよ、ヒトの $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ を RBL-2H3 細胞に発現させる系は、ヒト IgE の架橋によるマスト細胞の活性化を定量するのに適しているという結論であり、本研究の結論としても同様に考えている。

一方、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ と EGFR とのキメラ受容体を用いる系は、主任研究者の独自

のアイデアに基づく本研究の最大の特徴であるが、本年度の研究計画において、目的のキメラ受容体遺伝子の作製に成功し、この受容体を HLR-Elk1 細胞の細胞表面に発現させ、ヒト IgE を高親和性に結合できることを示すことができた。受容体架橋をルシフェラーゼの活性により定量する系については現在開発中であるが、全く新しいメカニズムに基づく新規アレルギー性評価試験法の開発に一步近づいたことを示す成果であった。

E. 参考文献

- 1) Maleki, S.J., et al.: The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J Allergy Clin Immunol.*, **112**, 190-195, 2003
- 2) Barsumian, E.L., et al.: IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol.*, **11**, 317-323, 1981
- 3) Hexdall, L. & Zheng, C.F.: Stable luciferase reporter cell lines for signal transduction pathway readout using GAL4 fusion transactivators. *Biotechniques.* **30**, 1134-1138, 2001
- 4) Takagi, K., et al.: Application of human FcεRIα-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE. *Biol Pharm Bull.*, **26**, 252-255, 2003
- 5) Aketani, S., et al.: Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs. *Immunol Lett.*, **75**, 185-189, 2001
- 6) Teshima, R., et al.: Effects of herbimycin A and ST638 on Fcε receptor-mediated histamine release and Ca²⁺ signals in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochim Biophys Acta.*, **1221**, 37-46, 1994
- 7) McCloskey, M.A. & Zhang, L.: Potentiation of Fcε receptor I-activated Ca²⁺ current (I_{CRAC}) by cholera toxin: possible mediation by ADP ribosylation factor. *J Cell Biol.*, **148**, 137-146, 2000
- 8) Pombo, I., et al.: IgE receptor type I-dependent regulation of a Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes. *J Biol Chem.*, **276**, 42893-42900, 2001
- 9) Nakamura, R., et al.: Effect of dialkyl phthalates on the degranulation and Ca²⁺ response of RBL-2H3 mast cells. *Immunol Lett.* **80**, 119-124, 2002
- 10) Choi, O.H., et al.: Secretion from rat basophilic RBL-2H3 cells is associated with diphosphorylation of myosin light chains by myosin light chain kinase as well as phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem.*, **269**, 536-541, 1994
- 11) Borkowski, T.A., Jouvin, M-H., Lin, S-Y. and Kinet. J.P. (2001) Minimal requirements for IgE-mediated regulation

- of surface FcεRI. *J Immunol.*, **167**, 1290-1296.
- 12) Wada, N., et al.: Evaluation of Fc ε RI-bindable human IgE with an enzyme-linked immunosorbent assay using a recombinant soluble form of the human FcεRIα ectodomain. *Allergol Intern*, **46**, 173-180, 1997
- 13) Imayama, S., et al.: Combination of patch test and IgE for dust mite antigens differentiates 130 patients with atopic dermatitis into four groups. *J Am Acad Dermatol.*, **27**, 531-538, 1992
- 14) Hodge, C., et al.: Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem.* **273**, 31327-31336, 1998
- 15) Wong, L., et al.: A differential requirement for the COOH-terminal region of the epidermal growth factor (EGF) receptor in amphiregulin and EGF mitogenic signaling. *J Biol Chem.* **274**, 8900-8909, 1999
- 16) Vogel, L., et al.: Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system. *Allergy.* **60**, 1021-1028, 2005
- F. 健康危険情報
特になし
- G. 研究発表
(論文発表)
なし
(学会発表)
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
次年度において、IgE/EGFR 遺伝子、IgE/dICR 遺伝子、ならびにこれらの安定発現細胞について、知的財産権の出願を予定。

表 1

RBL-2H3 細胞トランスフェクタントの β -hexosaminidase 酵素放出

Stimulation	RBL-2H3	RBL-hEla ^{*1}	RBL-pCI ^{*2}
Control	1.07	0.50	1.25
Human IgE (1.0 μ g/ml) /anti-human IgE	1.21	3.91	1.09
Human IgE (0.1 μ g/ml) /anti-human IgE	1.15	2.75	1.11
Mouse anti-DNP IgE /DNP-BSA	18.91	13.34	20.75

^{*1} human α -chain cDNA transfected cells^{*2} empty-vector transfected cells

RBL-2H3 細胞トランスフェクタントを 1.0 または 0.1 μ g/ml のヒト IgE またはマウス抗 DNP IgE により 37°C で 3 時間感作し、10 μ g/ml の抗ヒト IgE 抗体または DNP-BSA により刺激した。数値は 2 回の平均値である。

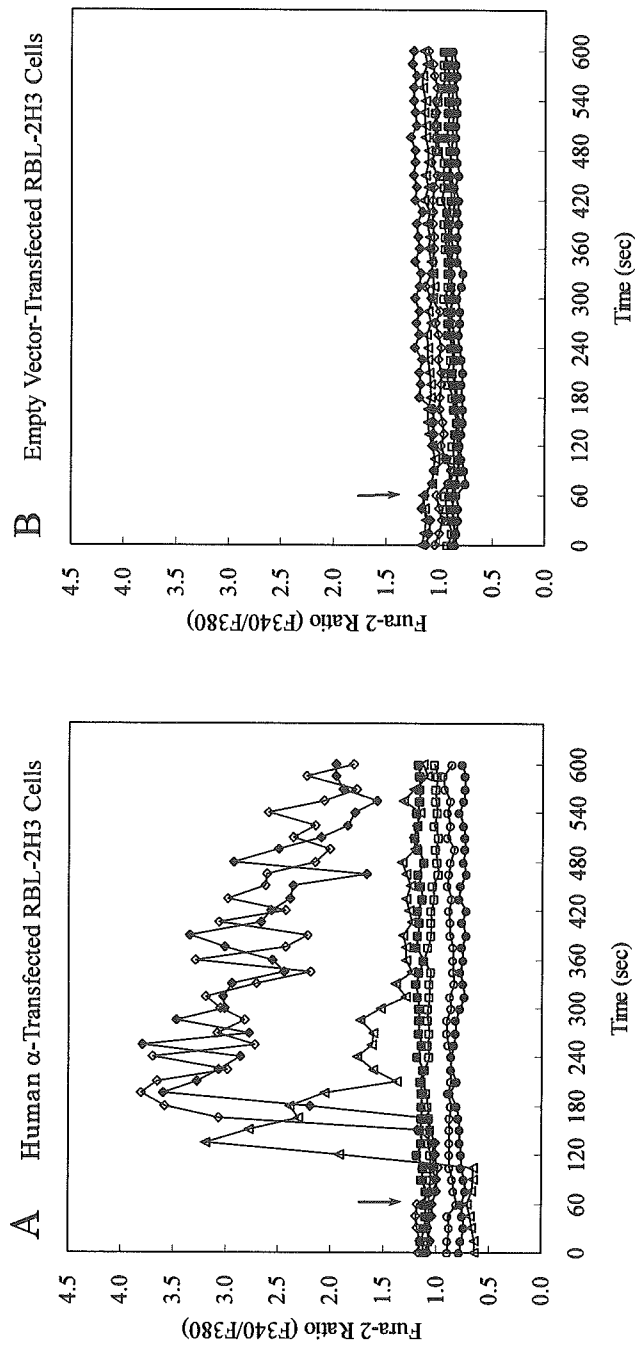


図2
 単一細胞レベルで解析したRBL-2H3細胞トランスフェクタントのヒトIgEおよび抗ヒトIgE抗体刺激による細胞内Ca²⁺応答

ヒトFc ϵ RI α (A) または空の発現ベクター (B) 遺伝子をトランスフェクトし、ヒトIgEおよび抗ヒトIgE抗体刺激による細胞内Ca²⁺応答をfura-2 AMおよび蛍光顕微鏡を用いて単一細胞レベルで可視化解析した。