

図3 4種の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β-hexosaminidase 酵素放出

ヒトFcεRIαまたは空の発現ベクター遺伝子をトランスフェクトし、図に示した濃度のヒトIgEおよび抗ヒトIgE抗体刺激による脱顆粒反応をβ-hexosaminidase 酵素放出を指標に解析した。RBL-hEla-2B12、RBL-hEla-1G4、RBL-hEla-1C10の3者は受容体の、RBL-pCI-1C5は発現ベクターのみのトランスフェクタントである。

表 2

4種のRBL-2H3細胞トランスフェクタントの β -hexosaminidase酵素放出

Cell line	Control	Human IgE/ anti-human IgE	Mouse anti-DNP IgE / DNP-BSA
RBL-hE1a-2B12 ^{*1}	0.85	16.16	10.11
RBL-hE1a-1G4 ^{*1}	0.56	12.29	20.15
RBL-hE1a-1C10 ^{*1}	1.01	14.19	14.31
RBL-pCI-1C5 ^{*2}	0.45	0.31	11.56
Wild-type RBL-2H3	0.77	0.54	21.08

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

表中に示した4種のRBL-2H3細胞トランスフェクタントおよび野生型RBL-2H3細胞を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。

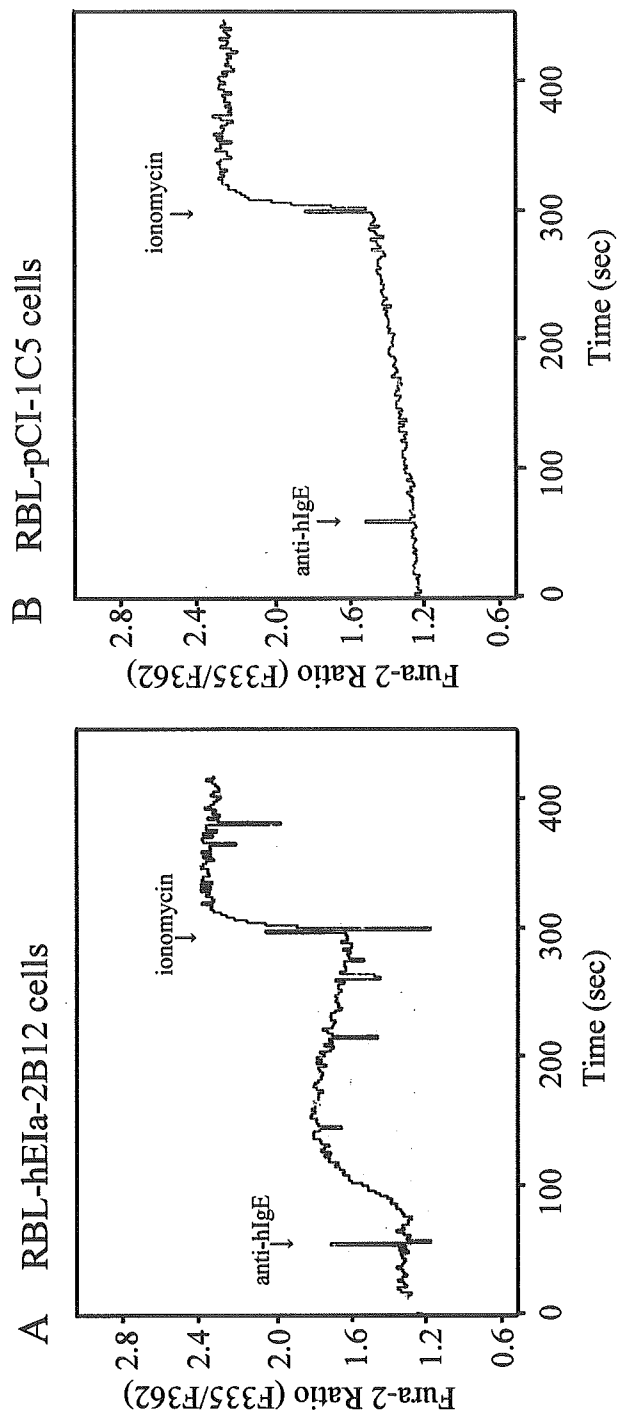


図4
細胞集団レベルで解析したRBL-2H3細胞トランスフェクタントのヒトIgEおよび抗ヒトIgE抗体刺激による細胞内Ca²⁺応答

ヒトFcεRIαトランスフェクタント(A)または空の発現ベクタートランスフェクタント(B)を、ヒトIgEおよび抗ヒトIgE抗体刺激により刺激した際の細胞内Ca²⁺応答をfura-2 AMおよび蛍光分光光度計を用いてクローニング細胞集団レベルで解析した。

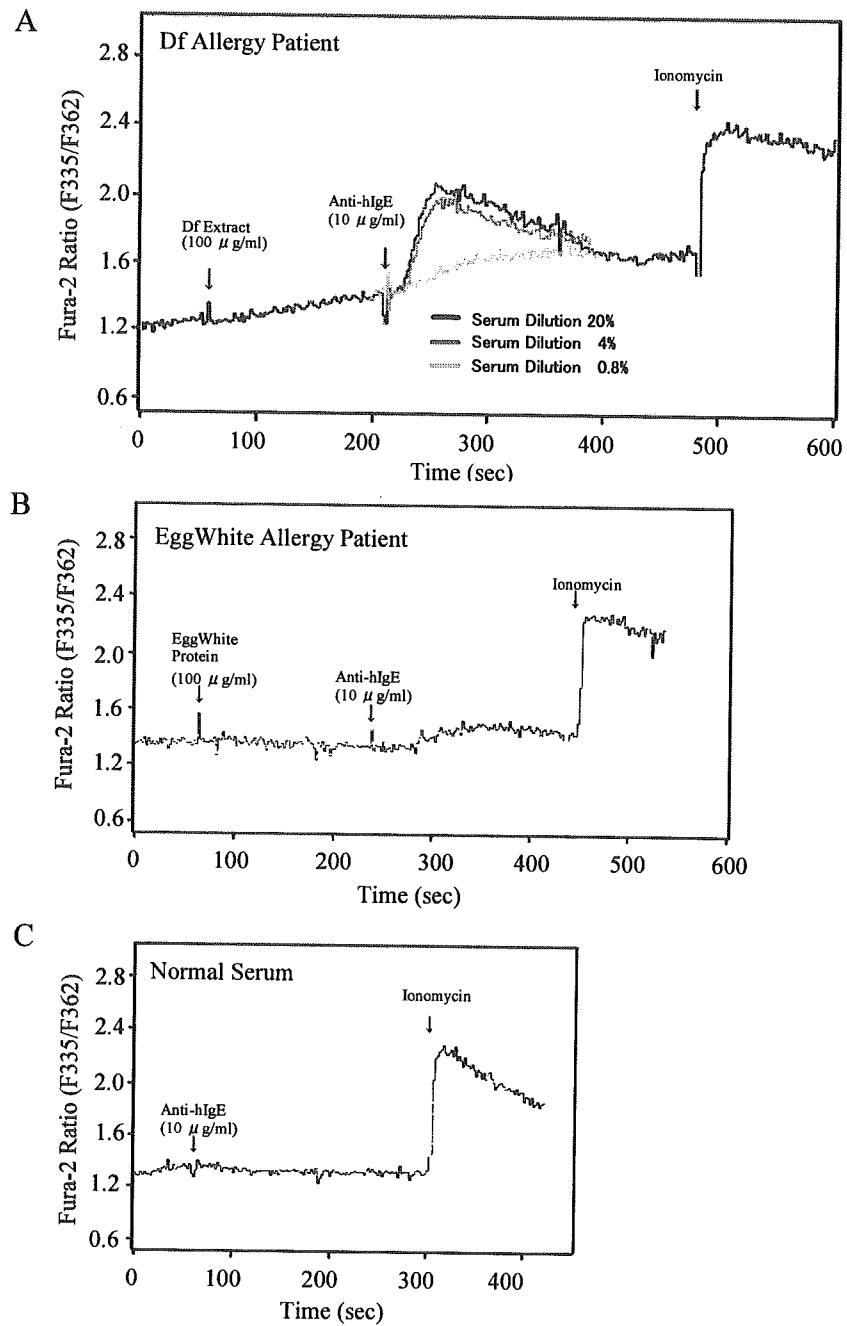


図 5

アレルギー患者血清で感作した RBL-2H3 細胞トランスフェクタントの特異抗原および抗ヒト IgE 抗体刺激による細胞内 Ca^{2+} 応答

RBL-hE1a-2B12 細胞を、補体を非働化した Df アレルギー患者血清 (A)、卵白アレルギー患者血清 (B) または健常人血清 (C) で感作し、特異抗原および抗ヒト IgE 抗体刺激により刺激した際の細胞内 Ca^{2+} 応答を fura-2 AM および蛍光分光光度計を用いて解析した。

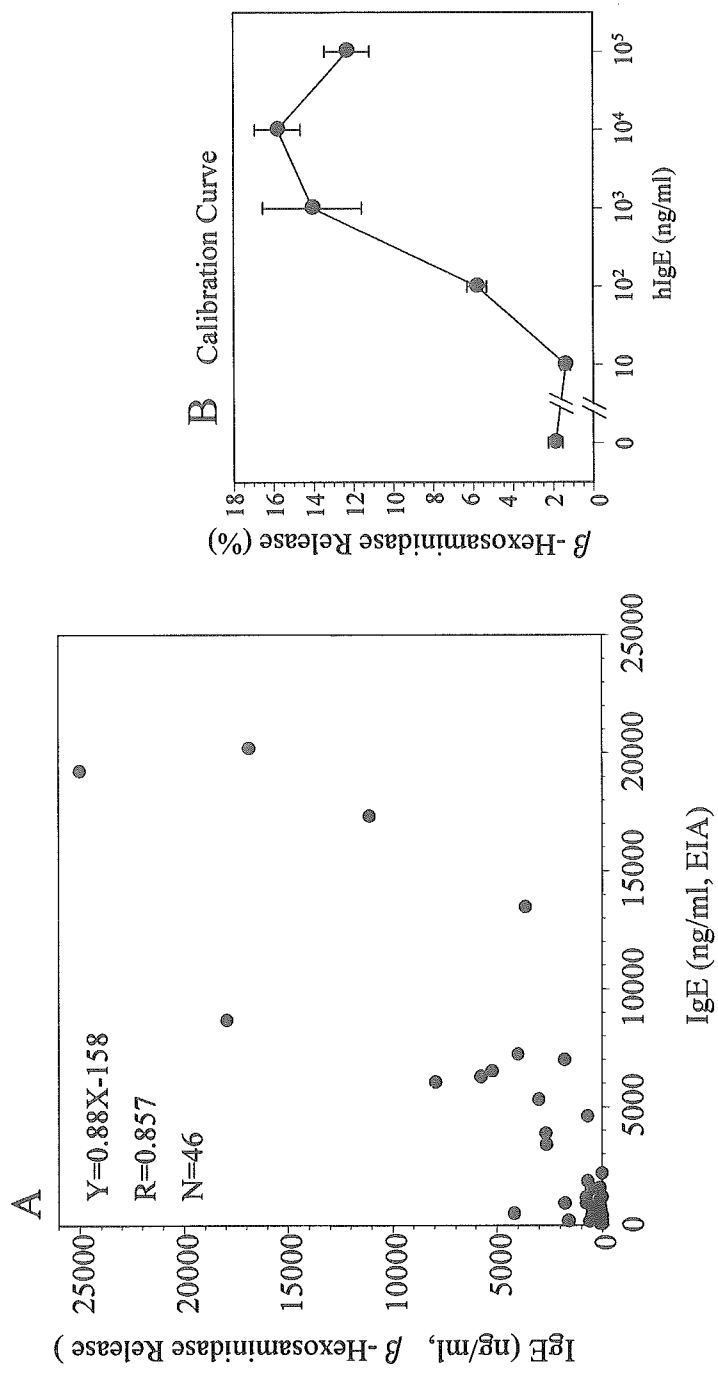


図 6

RBL-hE1a-2B12 細胞の β -hexosaminidase 酵素放出を用いたアレルギー患者血清中 IgE の定量的解析

EIA 法により定量したアレルギー患者血清中ヒト IgE と、RBL-hE1a-2B12 の脱顆粒反応を指標として計算されたヒト IgE とをプロットした (A)。希釈倍率は 5 倍・25 倍・125 倍の 3 点のうち、最も酵素放出活性の高かった一点を用いた。B は精製ヒト IgE を用いた場合の標準曲線。

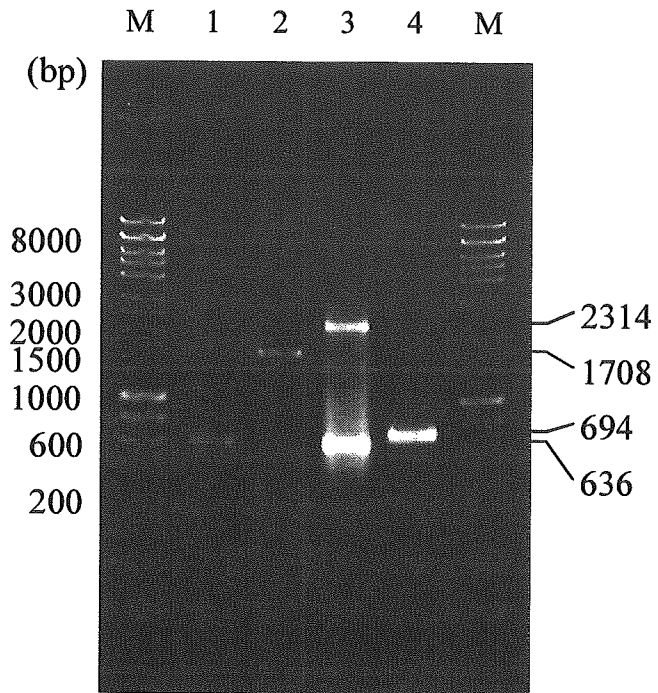


図 7

SOE 法によるキメラ受容体遺伝子の作製

ヒト $Fc\epsilon RI\alpha$ 鎖 cDNA (1; 636bp) およびヒト EGFR cDNA (2; 1708bp) の SOE 用 PCR 断片を用いて SOE を行なった。目的のキメラ受容体 IgE/EGFR cDNA のサイズは 2314bp (3)。600bp 付近の副生成物は不明。4 は 3 の細胞内ドメインを欠失した受容体 (IgE/dICR) で、サイズは 694bp である。M; 分子サイズマーカー。

表 3

HLR-Elk1 細胞トランスフェクタントのヒト IgE 結合性

Transfected gene	Human IgE (-)		Human IgE (+)	
	non-bound (%)	bound (%)	non-bound (%)	bound (%)
Vector	98.81	1.19	99.22	0.78
IgE/EGFR	98.97	1.03	96.25	3.75
IgE/dICR	99.30	0.70	96.09	3.91

HLR-Elk1 細胞に表中に示した遺伝子をトランスフェクトして 48 時間後に、 $10 \mu\text{g/ml}$ のヒト IgE またはバッファーのみで氷中で 30 分感作した。これを $10 \mu\text{g/ml}$ の FITC 標識抗ヒト IgE 抗体により染色し、ヒト IgE が結合した細胞の割合 (%) をフローサイトメトリーにより解析した。パーセンテージは、10,000 個の細胞を計測して求めた。

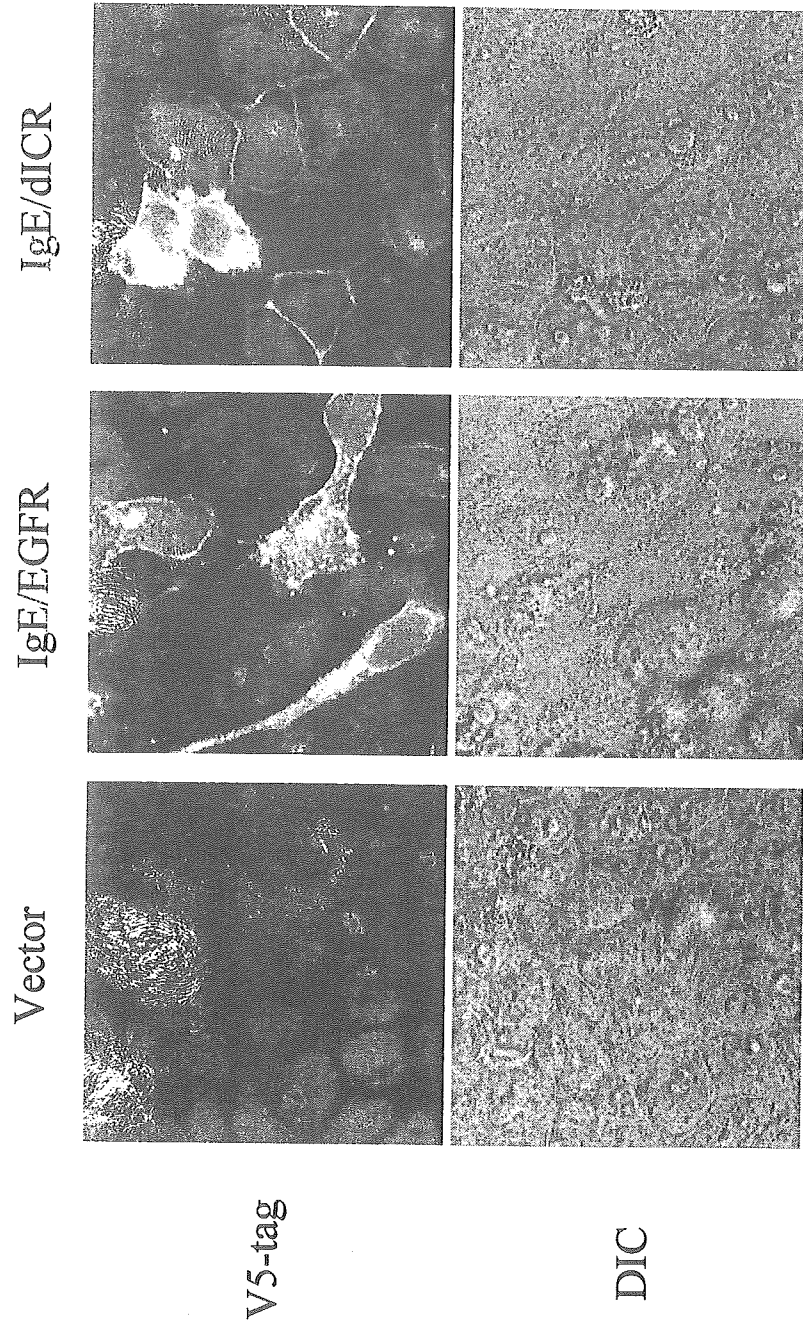


図 8

HLLR-Elk1 細胞におけるキメラ受容体の発現

HLLR-Elk1 細胞に、発現ベクターのみ、IgE/EGFR、および IgE/dICR をトランスフェクトし、48 時間後にメタノール固定した。キメラ受容体の発現および細胞内分布を FITC 標識抗 V5 タグ抗体と共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

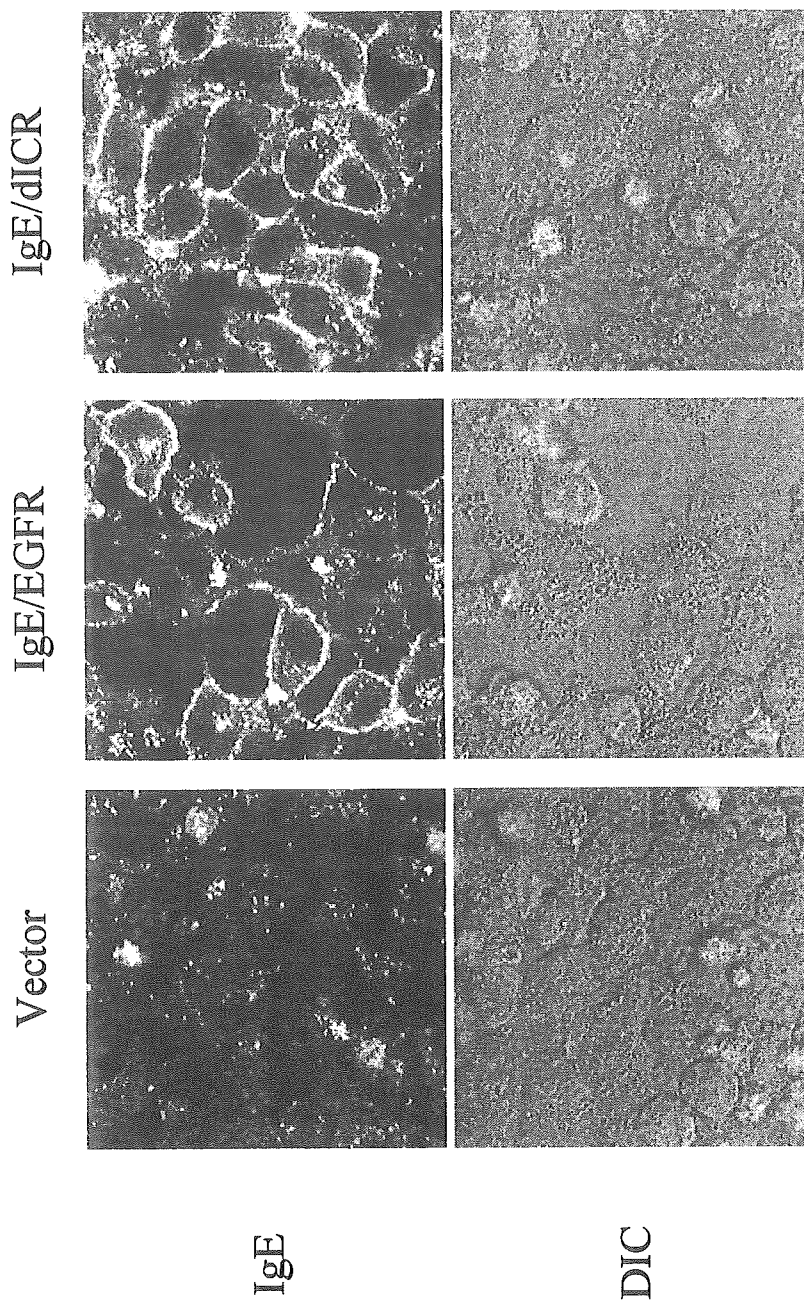


図 9

キメラ受容体を発現する HLR-EIk1 細胞へのヒト IgE の結合

HLR-EIk1 細胞に、発現ベクターのみ、IgE/EGFR、および IgE/dICR をトランスフェクトし、48 時間後にヒト IgE の細胞表面への特異的結合を FITC 標識抗ヒト IgE 抗体と共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

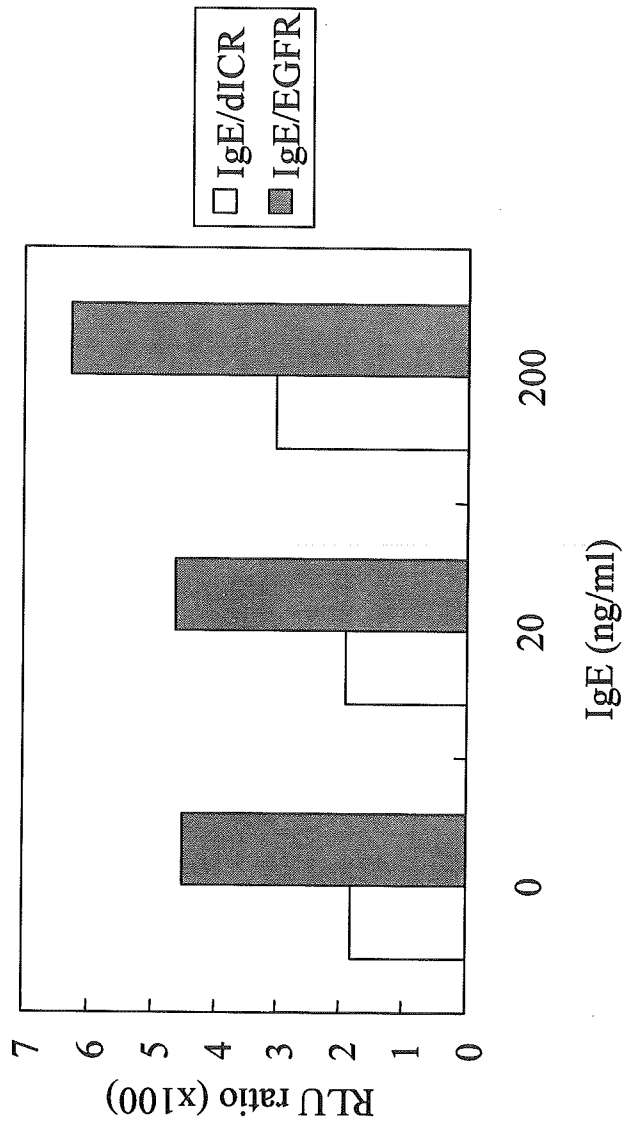


図10

キメラ受容体を発現するHLR-EIk1細胞におけるルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現

HLR-EIk1細胞に、導入効率のコントロールであるRenillaルシフェラーゼベクターとともにIgE/EGFRまたはIgE/dICR遺伝子をトランスフェクトし、30時間後に血清を含まない培地中で図中に示した濃度のヒトIgEとともに18時間おき、抗ヒトIgE抗体により3時間刺激した。データは転写因子EIk1により発現が誘導されるホタルルシフェラーゼのRenillaルシフェラーゼに対する活性の比で、2回の平均値を示した。

研究成果の刊行に関する一覧表

特になし