

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 18 年度 総括研究報告書
(H17-食品-014)

主任研究者 中村 亮介

平成 19 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

..... 30

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 (Fc ϵ RI) 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 18 年度は、ヒト Fc ϵ RI α 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 IgE/EGFR cDNA を、転写因子 Elk1 によりリンフェラーゼ遺伝子の発現が誘導されるよう遺伝子改変したヒト子宮頸部癌細胞由来の HeLa 細胞 (HLR-Elk1 細胞) に発現させたところ、細胞表面へのヒト IgE の結合が観察された。細胞膜貫通ドメインに関しては EGFR 由来のものとは Fc ϵ RI 由来のもの 2 種を作製したが、後者の受容体発現は良好でなかったため、前者のキメラ受容体を以後の解析に用いることとした。この細胞をヒト IgE で感作し、一定時間経過後に抗ヒト IgE 抗体により架橋したところ、感作に用いた IgE の濃度依存的なリンフェラーゼの発現が観察された。この発現の過程には、キメラ受容体および MAP キナーゼのリン酸化が関与していた。よって、本実験系は、細胞膜表面における受容体の架橋という、全く新しいメカニズムに基づいた IgE アッセイ法としての利用が期待できると思われる。

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っている。

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

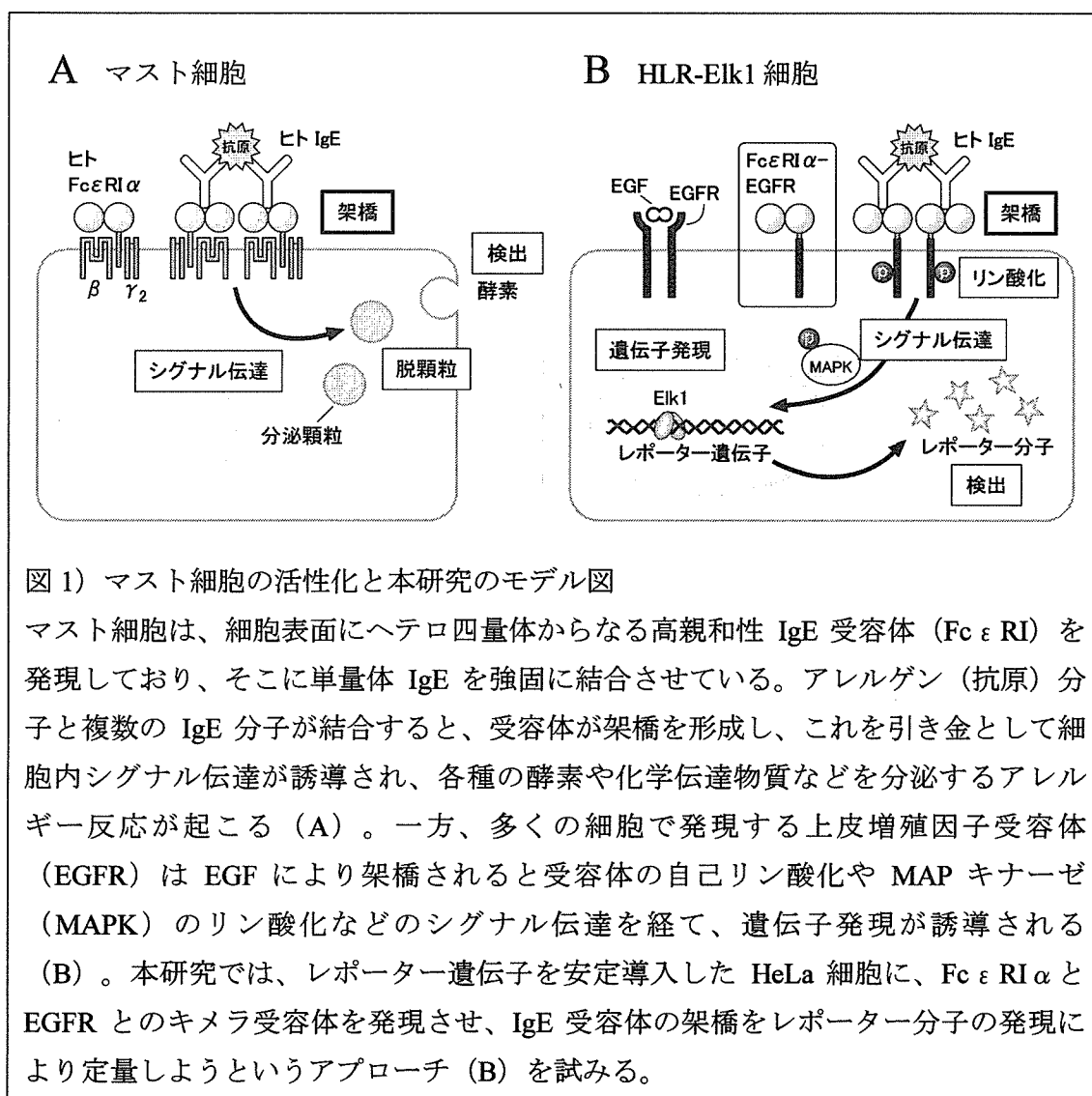


図1) マスト細胞の活性化と本研究のモデル図

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を分泌するアレルギー反応が起こる (A)。一方、多くの細胞で発現する上皮増殖因子受容体 (EGFR) は EGF により架橋されると受容体の自己リン酸化や MAP キナーゼ (MAPK) のリン酸化などのシグナル伝達を経て、遺伝子発現が誘導される (B)。本研究では、レポーター遺伝子を安定導入した HeLa 細胞に、FcεRIα と 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に高親和性 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化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 1A)。

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) 法などの抗体を用いて 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。

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²⁾。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³⁾。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、言い換えればレアギ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が知られている。

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。

具体的には、Fc ϵ RI α と上皮増殖因子受容体 (EGFR) とのキメラ受容体を作製することで、IgE による Fc ϵ RI の架橋シグナルを EGFR の受容体シグナルに変換し、一般的によく知られている MAP キナーゼ (MAPK) カスケードのシグナル伝達に注目し、その最終活性化因子である転写因子 Elk-1 の活性をレポーター遺伝子ルシフェラーゼにより解析するという系を用いた (図 1B)⁴⁾。

B. 研究方法

1) 細胞

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 の活性化によりホタルルシフェラーゼの転写がトランスで活性化されるレポーター遺伝子を組み込んで

ある HeLa 細胞 (HLR-EIk1 細胞) の培養には、グルタミンとして 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⁵⁾。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) した。

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°C 2 分の後、95°C 0.5 分・48°C 1 分・72°C 1.5 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 extention (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、またはヒト Fc ϵ RI α の細胞外および細胞膜ドメインとヒト EGFR の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°C 2 分の後、

95°C 0.5 分・58°C 1 分・72°C 2 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) または同 pcDNA6.2 GFP-GW に組み込んだ。後者のベクターに挿入した cDNA は、3' 末端側にアンバー型の終始コドン (TAG) を付加してあり、通常の条件下ではここで翻訳が停止する。しかし、On Demand System Suppressor Supernatant (Invitrogen 社) の添加により終始コドンがスキップされ、C 末端側 GFP 融合タンパク質として発現させることができる。

3) 遺伝子導入

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。2 x 10⁵ 個の細胞を 48 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 1 回洗浄し、同培地 160 μ l に浸した。その間にキメラ受容体プラスミド 200 ng とトランスフェクションコントロールのウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼベクター 2 ng の混合物および Lipofectamine 2000 1.0 μ l をそれぞれ 20 μ l の Opti-MEM I (Invitrogen) に溶解して室温で 5 分間放置し、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 40 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。

安定発現株の作製には、キメラ受容

体プラスミド (pcDNA6.2 GFP-GW) を制限酵素 *SapI* で切断した遺伝子 1.0 μ g を上記と同様に Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクトした。導入 30 時間後より培地に 10 μ g/ml の Blasticidin (Invitrogen) を添加し、3 週間培養を続け、生存していた細胞を安定発現株とした。

4) 試薬

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。これは、血清より精製したヒトポリクローナル IgE である。抗ヒト IgE 抗体 (FITC 標識および非標識) は Bethyl 社より購入した。ウェスタンブロットに用いた各種一次抗体は、Cell Signalling Technologies 社より購入した。

5) 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。

6) 共焦点レーザー顕微鏡

HLR-Elk1 細胞 2×10^5 個を 35mm グラスボトムディッシュ (Mat Tek 社) に一晚 (18 時間) 培養し、各種受容体遺伝子

またはコントロール遺伝子 (ベクターのみ) を Lipofectamine 2000 により導入した。30 時間後に FCS(-)の DMEM で一度洗浄し、200 ng/ml ヒト IgE を添加した。導入 48 時間後に冷 F-PBS で 2 度洗浄し、10 μ g/ml の FITC 標識抗ヒト IgE 抗体により氷中で 1 時間染色した。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) により共焦点観察を行なった。また、細胞内のリン酸化 MAPK の観察においては、同様にキメラ受容体遺伝子を導入し、0 乃至 200 ng/ml のヒト IgE で一晚 (18 時間) 感作後、DMEM で 2 回洗浄し、10 μ g/ml の抗ヒト IgE 抗体により 37°C で 10 分間刺激した。これを氷冷 PBS で洗浄後、Cytofix/CytoPerm (ベクトン・ディッキンソン社) により固定・可溶化し、50 倍希釈の抗リン酸化 MAPK 抗体 (Cell Signalling Technologies 社) により 4°C で一晚染色を行なった。これを F-PBS で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 Digital Eclipse C1 (ニコン社) により共焦点観察を行なった。

7) ウェスタンブロット

60mm ディッシュ (Corning 社) に一晚培養した HLR-Elk1 細胞 1×10^7 個を 10 μ g の各種キメラ受容体遺伝子またはベクターのみでトランスフェクトした。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 μ g/ml または 100 ng/ml のヒト EGF により 37°C で 10 分間刺激した。細胞を冷 PBS で 2 度洗浄し、140 μ l の Cell lysis buffer (20mM Tris-HCl (pH7.5), 150

mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM beta-glycerophosphate, 1mM Na₃VO₄, 1 μg/ml leupeptin, 1mM PMSF) を添加してラバーポリスマンにより全量を回収し、氷中で 5 秒、4 回の超音波をかけた。これを 14,000rpm, 4°C, 15 分遠心し、得られた上清を細胞破碎液とした。細胞破碎液を SDS-PAGE ゲル (PANTERA MP; DRC 社) に 1 レーンあたり 15 μg 乗せ、200V で 25 分間泳動し、PVDF 膜 (0.22 μ; Bio-Rad 社) に転写した (20%メタノールおよび 4%SDS 存在下 150mA, 1 時間)。これを 0.1% Triton X-100 を含む TBS (TBS-T) に溶解した 5%スキムミルク (和光純薬株式会社) にて室温で 2 時間ブロッキングし、続いて TBS-T で 1000 倍希釈した各一次抗体を一晩作用させた。TBS-T で 10 分間 3 回洗浄後、HRP 標識された抗ウサギまたは抗マウス二次抗体 (1000 倍希釈) を室温で 1 時間作用させ、TBS-T で 10 分間 3 回洗浄後、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer 社) により化学発光法にて検出を行なった。なお、用いた一次抗体は下記の通りである。抗 EGFR、抗リン酸化 EGFR(Y1068)、抗 p44/42 MAPK、抗リン酸化 p44/42 MAPK(T202/Y204)。全ての抗体は Cell Signalling Technologies 社より購入した。

11) ルシフェラーゼアッセイ

受容体遺伝子 (200 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 (2 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、0~200 ng/ml のヒト IgE を無菌的に添加した。これをさらに 18 時間あるいはその他適切な時間培養後、血清を含まない DMEM で 2 回洗浄し、抗ヒト IgE 抗体 10 μg/ml により刺激し、5% CO₂ 存在下で 37°C で 3 時間あるいはその他適切な時間培養した。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。細胞溶解液 (Passive Lysis Buffer; Promega) は 1 倍液を 50 μl/well 添加し、細胞破碎液 20 μl を測定に供した。測定には、ARVO SX (Perkin Elmer 社) を使い、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、ホタルルシフェラーゼのウミシイタケルシフェラーゼに対する活性比 (Relative Light Unit; RLU) を 100 倍した値を算出した。

C. 研究結果・考察

(1) IgE/EGFR キメラ受容体遺伝子の作製
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 (図 1B) を遂行するため、キメラの受容体遺伝子を作製する必要があった。

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、MAPK などの活性化を経て、転写因子である Elk1 の活性化に至り、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^{6,7)}。

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と考えた。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の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、MAPK のリン酸化などのシグナル伝達を誘導することが期待された。EGFR の活性化シグナル伝達に関する文献的情報および抗体などの研究ツールは数多く入手可能であり、他のシグナル伝達系よりも好ましいと期待された。また、後に述べる HLR-Elk1 細胞がアッセイに利用できることも大きな強みであった。

また、昨年度までの研究成果により、ヒト Fc ϵ RI α を発現するラット培養マスト細胞株 RBL-2H3 細胞とアレルギー患者血清を用いてマスト細胞の活性化を調べようとする、ヒトの補体がラットの細胞を傷害し、測定に悪影響を及ぼすことが明らかになった。このため、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⁵⁾を用いることにした。

ところで、キメラ受容体の細胞外および細胞内ドメインに関しては上述した通りであるが、目的の受容体は細胞膜上に発現する膜タンパク質である。キメラを作製する Fc ϵ RI α および EGFR のいずれもがいわゆる I 型膜タンパク質 (N 末端側が細胞外、C 末端側が細胞内に存在する 1 回膜貫通タンパク質) であるが、細胞膜貫通ドメインをいずれの受容体由来にするかにより、細胞膜上での発現効率や正しい受容体の架橋に悪影響が出るのが懸念された。よって、細胞膜貫通ドメインに関しては、EGFR 由来のものと Fc ϵ RI α 由来のもの両方を作製することとした。併せて、ネガティブコントロールとして、EGFR の細胞内ドメインを欠失した受容体 (dICR) も作製することにしたため、計 4 種のキメラ受容体を作製した (図 2)。

まず、Fc ϵ RI α 鎖遺伝子の細胞外ド

メインおよび細胞外から細胞膜貫通ドメインを 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 遺伝子の細胞膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインの遺伝子を調製した。さらに、ここから細胞内ドメインのみの断片も調整した。これらの 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。

まず、細胞膜貫通ドメインが EGFR 由来であるものに関しては、図 3 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 (IgE/EGFR1)。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/dICR1) 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、シークエンスを解析し、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。

次に、細胞膜貫通ドメインが Fc ϵ RI α 由来のものについても、図 4 に示した通り目的の分子サイズの遺伝子 (IgE/EGFR2 および IgE/dICR2) を増幅できたため、これを Gateway pENTR ベクターを経由して pcDNA6.2 GFP-GW 哺乳動物発現ベクターに挿入した。こちらもシークエンスを解析し、予想配列との

100% マッチを確認し、大量調製により IgE/EGFR2 および IgE/dICR2 をそれぞれ約 0.5mg および 0.6mg 得た。

(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、30 時間後に単量体ヒト IgE を導入細胞に一晩 (18 時間) 感作し、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。データは示さないが、以前フローサイトメトリーにより発現を解析した際には、おそらくディッシュから物理的に細胞を剥がす際に加わった侵襲のために、受容体の発現量が低く見積もられている恐れがあったが、この方法により、フローサイトメトリーでは調べることでできなかった、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、キメラ受容体が期待通り細胞膜上に発現してヒト IgE と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、細胞膜貫通ドメインとして EGFR ドメイン由来のものを用いている IgE/EGFR1 および IgE/dICR1 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 5）。IgE を結合している細胞の割合は 7~8 割であった。一方、同ドメインを Fc ϵ RI α 由来のものにした場合（IgE/EGFR2 および IgE/dICR2）には、IgE を結合する細胞の割合が IgE/EGFR1 および IgE/dICR1 に比べて極端に少なかった（1%以下）。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、細胞膜貫通ドメインとして EGFR 由来のものを用いた場合、本研究によって作成したヒト Fc ϵ RI α と EGFR 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-EIk1 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。

しかし、同ドメインを Fc ϵ RI α 由来にした場合に発現が良好でない理由は不明であった。Fc ϵ RI は本来 4 量体を形成する受容体で、マウスやラットにおいてはその β サブユニットが存在しないと、細胞膜上に効率よく α サブユニットが発現できない（すなわち、IgE を効率よく結合することができない）ということが知られている⁸⁾。ヒトにおいては β サブユニットが存在しなくとも、 γ サブユニットさえ存在すれば十分量の受容体が

発現するとされているが、今回用いた HLR-EIk1 細胞は、ヒト子宮頸部癌細胞由来であるため、 β 、 γ のいずれのサブユニットも当然ながら発現していない。このことが Fc ϵ RI α 由来細胞膜貫通ドメインを用いたキメラ受容体の発現効率の低さと関連しているかもしれないが、推測の域は出ない。

なお、昨年度に主任研究者が実施したラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞にヒト Fc ϵ RI α を発現させた実験系においては α サブユニットの遺伝子のみを導入したにもかかわらず期待通りに細胞膜上で機能したのは、RBL-2H3 細胞がもともと発現する β および γ サブユニットとヘテロな混成の受容体を形成したためと思われる。

いずれにせよ、受容体の発現量が芳しくないことは以後の実験に支障を来す恐れがあると思われたため、細胞膜貫通ドメインとして EGFR 由来のものを用いる二種のキメラ受容体については、安定発現株を作製する実験を除き、以後の詳細な実験には用いないことにした。

(4) HLR-EIk1 細胞の細胞内情報伝達の解析

キメラ受容体を介する細胞の活性化シグナルが、想定されている通りの細胞内情報伝達、具体的には MAPK カスケード情報を介しているかどうかを調べるため、上記 HLR-EIk1 細胞を IgE および抗 IgE 抗体、または内在性 EGFR のリガンドであるヒト EGF により刺激した際の細胞内情報伝達を解析した。図 1 に示した

ように、これらのシグナル伝達は主にリン酸化を介して行なわれる。そこで、ウエスタンブロッティングの手法により、内在性 EGFR、キメラ受容体の細胞内 EGFR ドメイン、MAPK のリン酸化を調べることにした。

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。ベクターのみ、またはキメラ受容体遺伝子をリポフェクション法により導入 30 時間後に、0 乃至 200ng/ml のヒト IgE を添加して一晩（18 時間）感作した。これを $10 \mu\text{g/ml}$ 抗ヒト IgE 抗体または 100ng/ml EGF により 37°C で 10 分間刺激した。

図 6A に示したように、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ の細胞外ドメインを認識する抗体を用いたところ、本研究で作製したキメラ受容体は、予想通りの分子量で HLR-Elk1 細胞において発現していることが分かった。すなわち、細胞内の EGFR ドメインを持つ IgE/EGFR1 が 105kDa で、同ドメインを持たない IgE/dICR1 が 50kDa である（図 2）。ベクターのみをトランスフェクトしたコントロールにおいては、もちろん

IgE 受容体の発現は認められない。HLR-Elk1 細胞は内在性の EGFR を高度に発現している（図 6B）。この抗体は EGFR の細胞内ドメインを認識するため、キメラ受容体のうち IgE/EGFR1 についてはこの抗体によってもバンドが確認される（抗リン酸化 EGFR 抗体についても同様）。

ベクターのみをトランスフェクトしてある細胞を EGF で刺激すると、予想された通り内在性 EGFR のチロシンリン酸化が起こることが確認された（図 6C）。同受容体のリン酸化は MAPK のリン酸化を誘導することが知られているが、図 6E に示した通り、 100ng/ml の EGF 刺激により、HLR-Elk1 細胞においても MAPK のリン酸化が起こっていることが分かる。

次に、IgE/EGFR1 を発現させた場合、内在性 EGFR の発現量およびそのリン酸化には変化がないが、IgE/EGFR1 のリン酸化については、ただキメラ受容体を過剰発現させただけで、ある程度の受容体自己リン酸化が起こっていることが分かる（図 6C）。これは意外なことであった。EGFR の活性化は通常リガンドである EGF の添加によりダイマーを形成することによって引き起こされると理解されているが、ただ単に局所密度を増加させることによっても活性化が進行することが小胞膜を用いた最近の研究から指摘されており⁹⁾、過剰発現させたキメラ受容体が細胞膜上に高密度に発現した結果、受容体の自己リン酸化が進行したと推察

される。このことは、後に行なうルシフェラーゼアッセイにおいてもバックグラウンドの上昇という形で影響を及ぼすことが懸念された。

しかし、シグナル伝達上受容体の下流に当たる MAPK のリン酸化のレベルにおいては、IgE/EGFR1 の過剰発現だけではリン酸化が起こっていなかったため（図 6E）、キメラ受容体の過剰発現そのものは、受容体の自己リン酸化は誘導するものの、MAPK の活性化を経て遺伝子発現へと至るシグナル伝達カスケードを活性化するには至らないのかもしれない。

この細胞を単量体ヒト IgE により感作すると、受容体のリン酸化はさらに強くなった。用いた IgE は実験の前に毎回 14,000rpm で 15 分間遠心し、大きな凝集は仮に生成していたとしても取り除いてあるため、このリン酸化は、IgE の架橋ではなく IgE とキメラ受容体 IgE/EGFR1 との結合によって誘導されたと考えるべきである。この結果は前項の結果に比べ、さらに意外であった。マスト細胞においては、IgE の感作により $Fc\epsilon RI$ の発現量が増加したり、サイトカイン産生が誘導されたり、生存率が増加したりするという現象が知られているが、そのメカニズムは不明である¹⁰⁾。マスト細胞が産生するサイトカインは Th2 タイプの免疫応答を誘導することから、抗原（アレルゲン）の添加に依存しないこの IgE のマスト細胞に及ぼす効果については、近年大きく注目されている¹¹⁾。本研究で用い

たキメラ受容体が単量体 IgE の添加のみで顕著な自己リン酸化を誘導したという結果は、同分子を用いる実験系が、アレルギーのみならずマスト細胞が免疫応答の調整において果たしている重要な役割を研究するツールとして利用できる可能性があると思われた。しかし一面では、抗原または抗 IgE 抗体による受容体の架橋による情報伝達のみを調べる際には、この単量体 IgE の影響がルシフェラーゼアッセイにおけるバックグラウンドとして現れることが懸念された。

実際、シグナル伝達の下流に当たる MAPK のリン酸化も、後に述べる抗ヒト IgE 抗体添加時ほどではないものの、ヒト IgE の感作だけで誘導されていることが分かった（図 6E）。驚いたことに、これはキメラ受容体を発現させていない細胞（ベクターのみ）においても同様で、ヒト IgE が何らかのメカニズムによって HLR-Elk1 細胞の MAPK カスケードをある程度活性化している可能性があることを示していると思われた。なおこのとき、ベクターのみを発現させた場合の内在性 EGFR のリン酸化には変化はない。このことは当初全く予想されなかった結果であり、今後そのメカニズムを追究していく必要があると思われたが、今年度中は十分な研究時間を確保できなかった。今後、IgE のロットを変更した場合の影響などを調べ、これがどのような場合に起きるのか、真に IgE に依存的なのか、あるいは今回用いたヒト標準 IgE に何らかの不純物等が含まれていたためか、など

を明らかにしていきたい。

次に、IgE/EGFR1 を発現させた細胞をヒト IgE で感作した上、10 分間抗ヒト IgE 抗体で刺激をした場合、キメラ受容体の強い自己リン酸化が観察された (図 6C)。このとき、内在性 EGFR のリン酸化はまったく起こっていない。MAPK のリン酸化についても、非常に強いリン酸化が認められた (図 6E)。このときのリン酸化の強さは、先に述べた IgE 感作のみで誘導される MAPK のリン酸化よりも強かった。

これらの結果は、IgE がキメラ受容体 IgE/EGFR1 に結合することによって、受容体の自己リン酸化を含む何らかのシグナル伝達が誘導されて MAPK がリン酸化されるが、受容体に結合した IgE を抗ヒト IgE 抗体によりさらに架橋した方がより強い MAPK のリン酸化が誘導されることを意味しており、これはまさに本研究の当初の計画で期待されていた通りの結果であるといえる。

最後に、細胞内 EGFR ドメインを持たない IgE/dICR1 についても同様の実験を行なった。キメラ受容体の分子量としては、予想された通りの約 50kDa の位置にバンドが観察されたが (図 6A)、細胞内ドメインを持たないため、抗 EGFR 抗体によっては検出されなかった (図 6B)。よって、IgE の感作および抗ヒト IgE 抗体によるその架橋により、受容体そのものにどのような質的量的変化が起こったかについては、本実験では知ることができない。

MAPK のリン酸化については、ベクターのみをトランスフェクトさせた際と同様に、IgE の感作のみで MAPK のリン酸化が誘導された (図 6E)。この理由については、先述した通り不明である。

次に、IgE を抗ヒト IgE 抗体により架橋したところ、細胞内 EGFR ドメインが存在しないにも関わらず、MAPK のリン酸化が昂進する傾向が認められた。しかし、そのリン酸化の強さは、IgE/EGFR1 を発現する細胞を同様に架橋刺激した場合に比べるといくらか弱かった (図 6E)。

リン酸化の程度は弱いとはいえ、IgE とその架橋が、細胞内 EGFR ドメイン非依存的に MAPK のリン酸化を誘導したことは興味深かった。ベクターのみをトランスフェクトした場合と比較すると、抗ヒト IgE 抗体の添加そのものは MAPK のリン酸化を誘導してはいないので、これは細胞外に高親和性にヒト IgE を結合できるキメラ受容体を発現させたことに依存しているということ是可以する。先述したように、Fc ϵ RI α はヒトにおいては γ サブユニットさえ共存すれば細胞膜に機能的に発現することが知られているが、 γ サブユニットを持たない子宮頸部癌細胞株由来である HLR-Elk1 細胞において、ほぼ Fc ϵ RI α のままに近い姿のこのキメラ受容体が架橋により MAPK カスケードを活性化するとは考えにくく、非常に興味深い問題である。しかし、これも本研究課題の実施期間の都合上、詳細なメカニズムについては検討することはできな

かった。今後の課題の一つと考える。

(5) HLR-Elk1 細胞のリン酸化 MAPK の解析

前項の結果より、IgE の添加および抗ヒト IgE 抗体によるその架橋が、IgE/dICR1 または IgE/EGFR1 において、MAPK のリン酸化を誘導する可能性があることが分かった。そこで、その発現をより直接的に解析するため、共焦点レーザー顕微鏡により、抗リン酸化 MAPK 抗体と FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡観察を行なった。

その結果、ヒト IgE を感作しないコントロール条件においては、予想通り MAPK のリン酸化は観察されなかったが、200 ng/ml のヒト IgE で 18 時間感作し、10 μg/ml の抗ヒト IgE で 37°C 10 分間刺激した場合には、キメラ受容体発現細胞、特に IgE/EGFR1 発現細胞において顕著にリン酸化 MAPK の発現が観察された。

活性化 MAPK は通常細胞の核内に局在することが知られているが¹²⁾、今回の解析ではその輪郭は明瞭ではなかった。

いずれにせよ、IgE の感作および架橋刺激により、細胞内 EGFR ドメインを持つキメラ受容体依存的に、効果的な MAPK のリン酸化が誘導されるということが示された。

(6) 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/EGFR1 および IgE/dICR1) 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 を一定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 0~400 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 2 ng を添加しており、これらの発光強度比 (Relative Light Unit; RLU) 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 μg/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。

まず、レポーターアッセイを行なうためのキメラ受容体の最適な導入条件を検討するため、受容体遺伝子のプラスミド量を 0, 200, 400 ng/ml と変化させた (図 7)。ヒト IgE の濃度は 200 ng/ml、感作時間は 18 時間、抗ヒト IgE 抗体によ

る刺激時間は 37°C で 3 時間である。その結果、細胞内 EGFR ドメインを持つ IgE/EGFR1 の場合のみ、導入したプラスミドの量に依存的にルシフェラーゼの活性 (RLU 値) が増加することが分かった。その影響は 200 ng の時点ですでに顕著であったため、以降の実験にはプラスミド量として 200 ng を用いることとした。

なお、IgE を添加しない場合の RLU バックグラウンドとして、IgE/dICR1 の発現細胞に対して IgE/EGFR1 発現細胞がより高い RLU 値を示したことは、先述したウェスタンブロットを用いたキメラ受容体の自己リン酸化および MAPK のリン酸化の結果から推察されたことと矛盾しない。

しかし、IgE/dICR1 においても同様の MAPK のリン酸化が認められたにも関わらず、ルシフェラーゼの活性レベルにおいてはほぼバックグラウンド並に抑えられていたことは、理由は不明ながらも、本評価系の実用に関しては好ましい結果であった。なお、抗ヒト IgE 抗体による架橋を行なうことで、IgE/EGFR1 発現細胞における RLU はわずかに増加する傾向にあった。

次に、IgE の濃度を 0, 20, 200 ng/ml と変化させ、さらに刺激時間を 5 時間乃至一晚 (23 時間) に変更した (図 8)。すると、やはり細胞内 EGFR ドメインを持たない IgE/dICR1 の発現細胞においてはほとんど RLU に変化が見られなかったが、IgE/EGFR1 を発現させた場合には、刺激時間が 5 時間または 23 時間のとき

に RLU の増加が見られた。また、IgE の濃度としては、20 ng/ml で感作させた場合が最も高い RLU を示した。しかし、これらの値は、図 7 に示した 200 ng/ml のヒト IgE で 3 時間刺激した場合には及ばなかった。

また、IgE 非感作のまま、アッセイ当日に氷上で 30 分だけ 0~200 ng/ml IgE で感作し、これを 37°C に戻して 5 時間刺激するという実験も行なった。これは、ヒト IgE の感作自体によりルシフェラーゼの発現が誘導されることがそれまでの実験により分かったため、短時間かつシグナル伝達を誘導しない条件 (低温下) で感作を行なうことを意図したものである。

この場合は 200 ng/ml のときわずかに RLU の増加が見られたものの、ほとんど変化はなかった。この結果は、IgE/EGFR1 発現細胞において効果的な RLU の増加を誘導するには、アッセイの直前にヒト IgE を与えるのみでは不十分で、一晚 (18 時間) 程度の感作時間を必要とすることを意味している。

先述した通り、マスト細胞や好塩基球細胞においては、単量体 IgE の感作自体が細胞表面への $Fc\epsilon RI$ の発現量の増加を引き起こすことが知られている¹⁰⁾。今回の結果は、キメラ受容体もまた同様に、単量体 IgE の感作により細胞表面への発現量が増加していることを意味していると推察される。

さらに、0, 2, 20, 200 ng/ml のヒト IgE をアッセイ前日であるトランスフェクト 27 時間後から 3 時間だけ 37°C で感作し、

IgE や血清を含まない DMEM により洗浄して一晩（18 時間）置いた後、抗ヒト IgE 抗体により刺激するという実験を行った（図 9）。

これは、IgE/EGFR1 発現細胞において IgE の感作自体により誘導されてしまうバックグラウンドの RLU 増加を、IgE の感作自体非存在下に一晩置くことにより一度 IgE/dICR1 並に下げ、抗ヒト IgE 抗体による刺激により再度誘導される RLU の増加分のみを見ようと意図した実験系であったが、残念ながら抗ヒト IgE 抗体の添加による RLU の増加は認められなかった。

この結果は、IgE/EGFR1 発現細胞における効果的な RLU の増加を誘導するには、アッセイ直前までヒト IgE の共存が必要であるということを示していると思われた。これは、先述の単量体 IgE による細胞表面の $Fc\epsilon RI$ の発現量増加メカニズムと無縁ではあるまい。

最後に、2 種のキメラ受容体およびベクターのみをトランスフェクトした場合それぞれについて、ヒト IgE の感作濃度を細かく（0, 6, 20, 60, 200 ng/ml）変化させて 18 時間感作し、3 時間刺激した場合の結果を図 10 に示した。

先述した結果と同様に、細胞内の EGFR ドメインを持たない IgE/dICR1 発現細胞においては、ベクターのみを導入した場合と同程度の RLU を示した。また、IgE/EGFR1 を発現させた場合は、RLU の値は用いた 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については、両者の RLU 間に有意な差は認められなかった。

一方、RLU の値は小さいものの、ベクターのみあるいは IgE/dICR1 をトランスフェクトした場合についても、高濃度の IgE は単量体の添加のみで RLU が増加することが分かった。この結果は、これらの条件において MAPK のリン酸化が昂進していた結果と矛盾しない。だが、その程度はごくわずかで、IgE/EGFR1 を発現させた場合のバックグラウンドに埋もれる範囲にすぎなかった。よって、RLU の増加幅より、細胞表面に実際に結合して感作されているヒト IgE の量を推し量る上では、特に支障はないものと思われる。

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きること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 Fc ϵ RI 抗体など）が考えられている²⁾。

よって、血清中の IgE のうち、実際にどれだけの IgE が Fc ϵ RI に結合し、どれだけの架橋が誘導されるか、について定量的な情報を得ることが重要であると思われる。

本研究における Fc ϵ RI α 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色であるが、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。細胞膜貫通ドメインの影響に関しては、Fc ϵ RI α 由来よりも EGFR 由来のものの方がより効率よく細胞表面に発現された。細胞内 EGFR ドメインを持つキメラ受容体を発現させた細胞では、IgE の感作および架橋によってキメラ受容体の自己リン酸化や MAPK のリン酸化が起きていることが確認され、それは共焦点レーザー顕微鏡レベルでも直接的に観察することができた。そして、キメラ受容体のシグナル伝達の最終産物であるルシフェラーゼの活性によりその架橋の度合いを定量した結果、感作に用いたヒト IgE の濃度に依存して RLU の値が増加することが分かった。しかし、抗ヒト IgE 抗体による架橋の有無によっては RLU の値に差は見られなかった。

以上の結果は、キメラ受容体を用いる本実験系が、ヒト IgE の濃度を生きた細胞の細胞表面に発現するキメラ受容体

の架橋という、従来法より格段に生理的な条件において定量する、新しいツールとして利用できる可能性を示している。しかしながら、当初期待された、IgE の架橋による影響のみを検出するにはバックグラウンドが高すぎた。

これには、いくつかの理由が推察される。まず、細胞内に EGFR ドメインを持つキメラ受容体を過剰発現させると、それ自体が受容体の自己リン酸化を誘導してしまい、それに引き続く MAPK カスケードを活性化してしまう恐れがあるということ⁹⁾、そして発現させたキメラ受容体以外の何らかの経路により MAPK のリン酸化が誘導されてしまう可能性があること、などが考えられる。

前者については、キメラ受容体の安定発現株の作製が有効かもしれない。本研究においても当然ながら安定発現株の作製は試みた。しかし、理由は不明ながら、マーカー薬剤（プラストサイジン）耐性株は得られたものの、キメラ受容体の安定発現が認められなかった（データは示さず）。同作業については現在も進行中で、薬剤耐性の細胞群から、ビオチン化抗ヒト Fc ϵ RI α 抗体とストレプトアビジン磁気ビーズを用いたシステムにより安定発現株を確立する予定である。

後者については、様々な実験条件の検討を行なったが、クリアカットな実験条件は得られなかった。この問題を抜本的に解決するには、レポーター遺伝子の変更や、あるいは細胞系の変更などの思い切った措置が必要かと思われる。これ

に関しては、ヒトマスト細胞 LAD-2¹³⁾ またはヒト Fc ϵ RI α を再構成した RBL-2H3 細胞¹⁴⁾などに、ネイティブなシグナル伝達である Fc ϵ RI を介する刺激によって活性化されることが知られている NF- κ B や NF-AT に着目した新しいルシフェラーゼアッセイのシステムが有効で

あるかもしれないと考え、現在ベクターを用意して実験系を構築している。

いずれにせよ、本研究において確立したキメラ受容体を用いる IgE の定量法は、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と言えるかもしれない。

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) 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 Fc ϵ RI α ectodomain. *Allergol Intern.*, **46**, 173-180, 1997
- 3) 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
- 4) Nakamura, R.: Chimeric EGF Receptor That Detects IgE-binding/crosslinking. *J Allerg Clin Immunol*, **119**, S97, 2007
- 5) Hexdall, L. & Zheng, C.F.: Stable luciferase reporter cell lines for signal transduction pathway readout using GAL4 fusion transactivators. *Biotechniques*. **30**, 1134-1138, 2001
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Kuster, H., et al.: The gene and cDNA for the human high affinity immunoglobulin E receptor beta chain and expression of the complete human receptor. *J Biol Chem*, **267**, 12782-12787, 1992
- 9) Zhang, X., et al.: An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, **125**, 1029-1031, 2006
- 10) Kawakami, T. and Kitaura, J.: Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biologic mechanisms and relevance. *J Immunol*, **175**, 4167-4173, 2005
- 11) Kawakami, T. and Galli, S.J.: Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol*, **2**, 773-786, 2002
- 12) Furuno, T., et al.: Nuclear shuttling of mitogen-activated protein (MAP) kinase (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2) was dynamically controlled by MAP/ERK kinase after antigen stimulation in RBL-2H3 cells. *J Immunol*, **166**, 4416-4421, 2001
- 13) Kirshenbaum, A.S., et al.: Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following