

aggregation of Fc ϵ RI or Fc γ RI. *Leuk Res*, **27**, 677-682, 2003

- 14) Takagi, K., et al.: Application of human Fc ϵ RI α -chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE. *Biol Pharm Bull.*, **26**, 252-255, 2003

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
(論文発表)

Nakamura, R.: Chimeric EGF receptor that detects IgE-binding/crosslinking. *J Allerg Clin Immunol*, **119**, S97 (2007)

Teshima, R., Amano, F., Nakamura, R., Tanaka, Y. and Sawada, J-I.: Effects of polyunsaturated fatty acids on calcium

response and degranulation from RBL-2H3 cells. *Int Immunopharmacol*, **7**, 205-210 (2007)

(学会発表)

Nakamura, R., Nakamura, R., Teshima, R. and Sawada, J-I.: Chimeric EGF receptor that detects IgE-binding/crosslinking.: American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, annual meeting (San Diego, CA) 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

IgE/EGFR1 遺伝子、IgE/dICR1 遺伝子、IgE/EGFR2 遺伝子、IgE/dICR2 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。

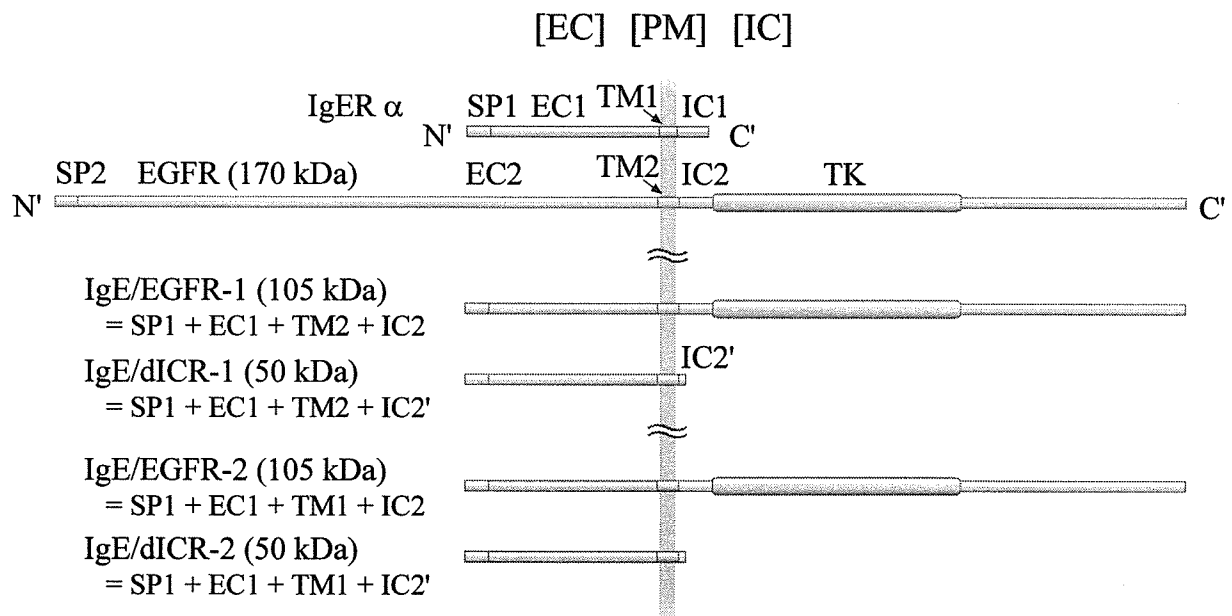


図2
各種キメラ受容体の模式図

本研究では、上に示した4種のキメラ受容体を作製した。すべてのキメラ受容体のシグナルペプチド (SP) および細胞外ドメイン (EC) は $Fc\epsilon RI \alpha$ 由来である。4種はそれぞれ、細胞膜貫通ドメイン (TM) の由来、および細胞内 EGFR ドメイン (IC) の有無が異なっている。IC ドメインを持たないものはネガティブコントロールとして用いる。TM: チロシンキナーゼドメイン。

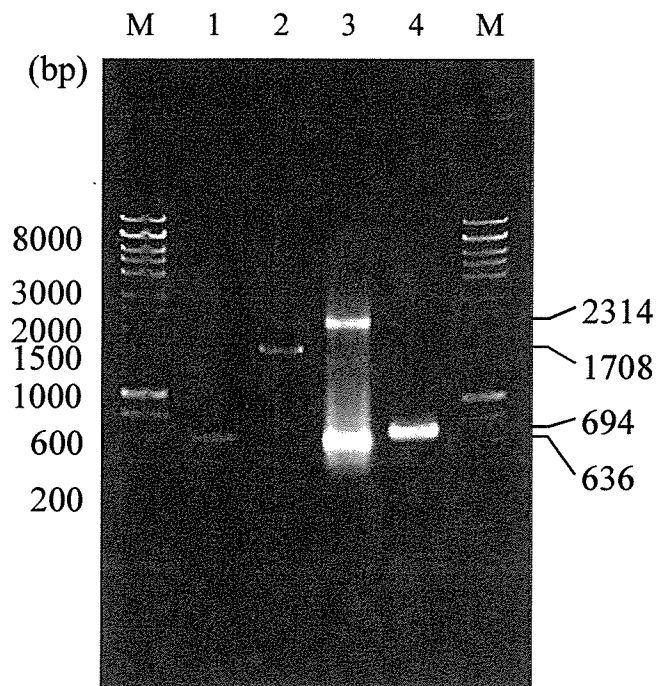


図 3

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。

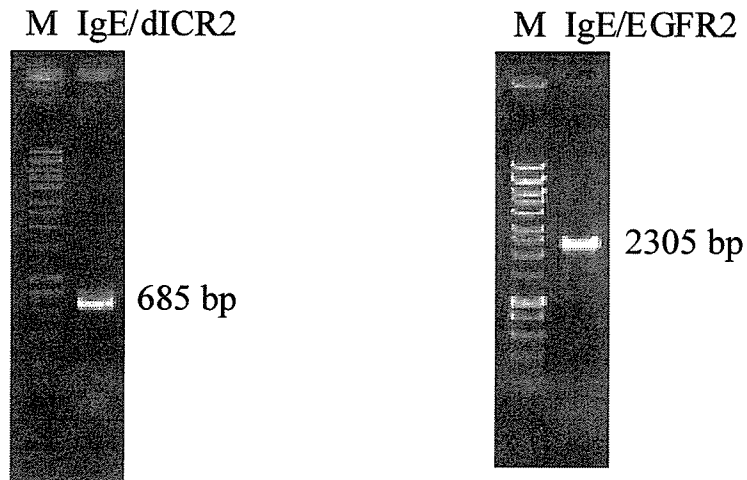


図 4

細胞膜貫通ドメインが $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 由来であるキメラ受容体遺伝子の作製

PCR あるいは SOE 法により調製した、細胞膜貫通ドメインが $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 由来であるキメラ受容体 IgE/dICR2 および IgE/EGFR2。両末端で設計したプライマーによる PCR 産物（それぞれ 685bp および 2,305bp）を 1%AGE により分離した。M; 分子サイズマーカー。

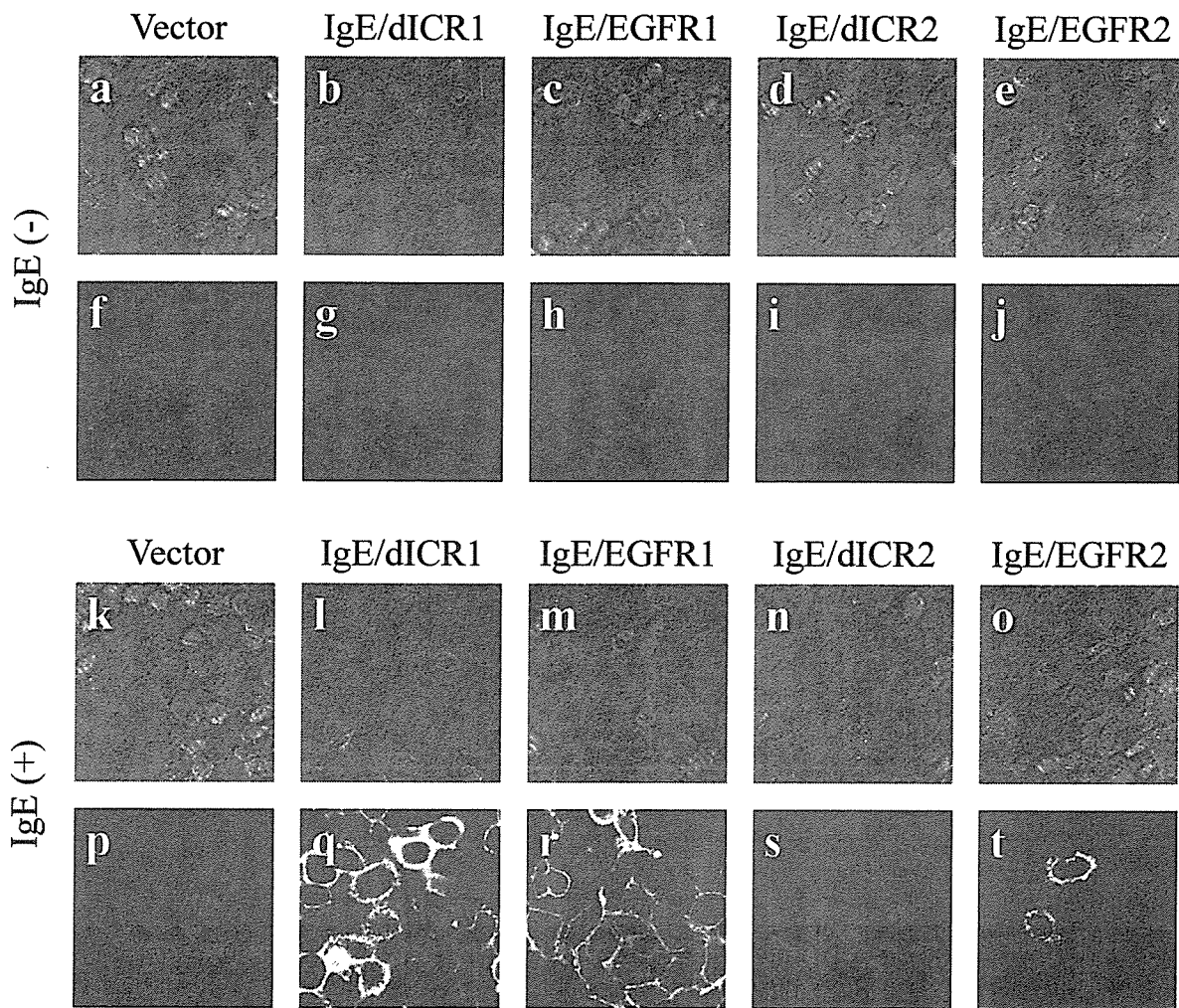


図 5

各種キメラ受容体の細胞膜への発現とヒト IgE の結合

HLR-Elk1 細胞にベクターのみ (a, f, k, p)、IgE/dICR1 (b, g, l, q)、IgE/EGFR1 (c, h, m, r)、IgE/dICR2 (d, i, n, s)、または IgE/EGFR2 (e, j, o, t) の遺伝子を導入して 30 時間後に、0 (a-j) 乃至 200 (k-t) ng/ml のヒト IgE を一晩 (18 時間) 添加した。2% FBS を含む PBS で 2 回洗浄し、FITC 標識抗ヒト IgE 抗体で染色の後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

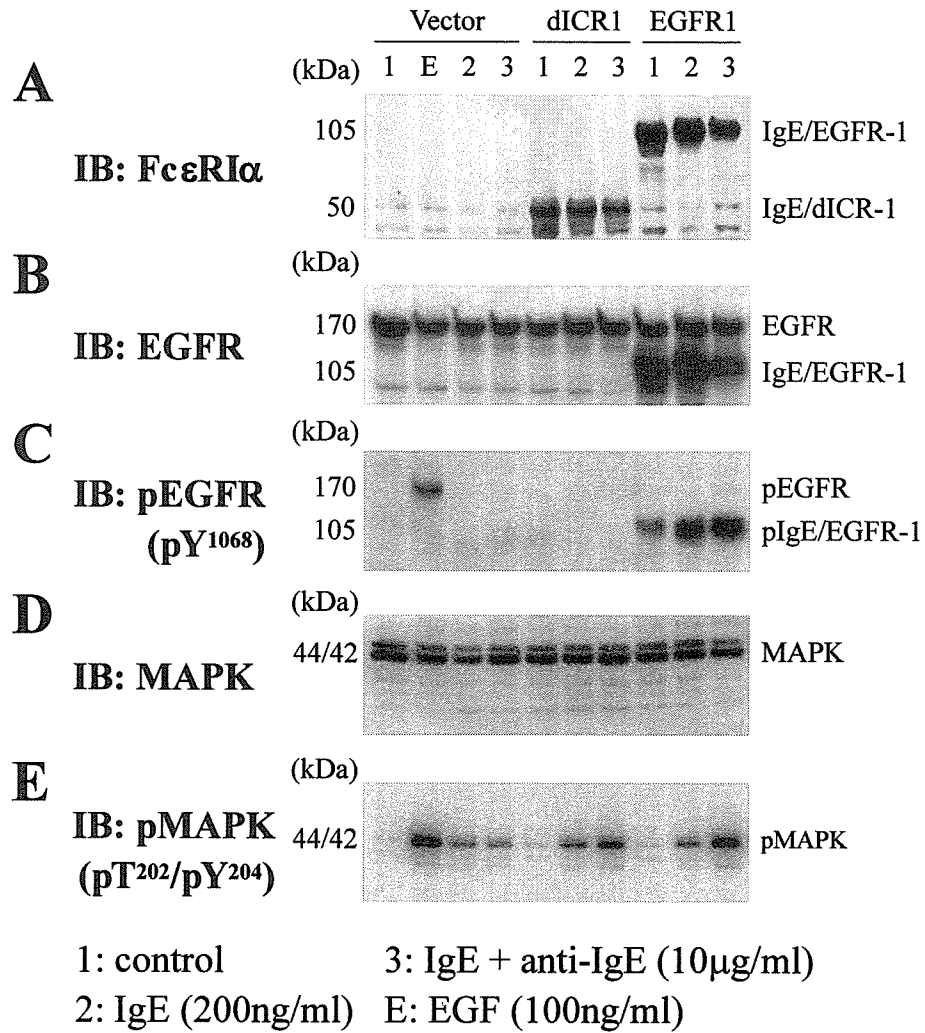


図 6

ウェスタンブロットによるキメラ受容体を介するシグナル伝達の解析

HLR-EIk1 細胞にベクターのみ、IgE/dICR1 または IgE/EGFR1 プラスミドをトランスフェクトし、0 乃至 200 ng/ml のヒト IgE で 18 時間感作後、100 ng/ml ヒト EGF または 10 μg/ml の抗ヒト IgE 抗体で 37°C、10 分間刺激した。細胞を 1% Triton を含む破碎液で溶解し、全細胞抽出物を 1 レーンあたり 15 μg 乗せて SDS-PAGE により泳動した。これを PVDF 膜にブロットし、図中に示した各抗体 (X1000) と HRP 標識二次抗体および化学発光試薬により検出した。

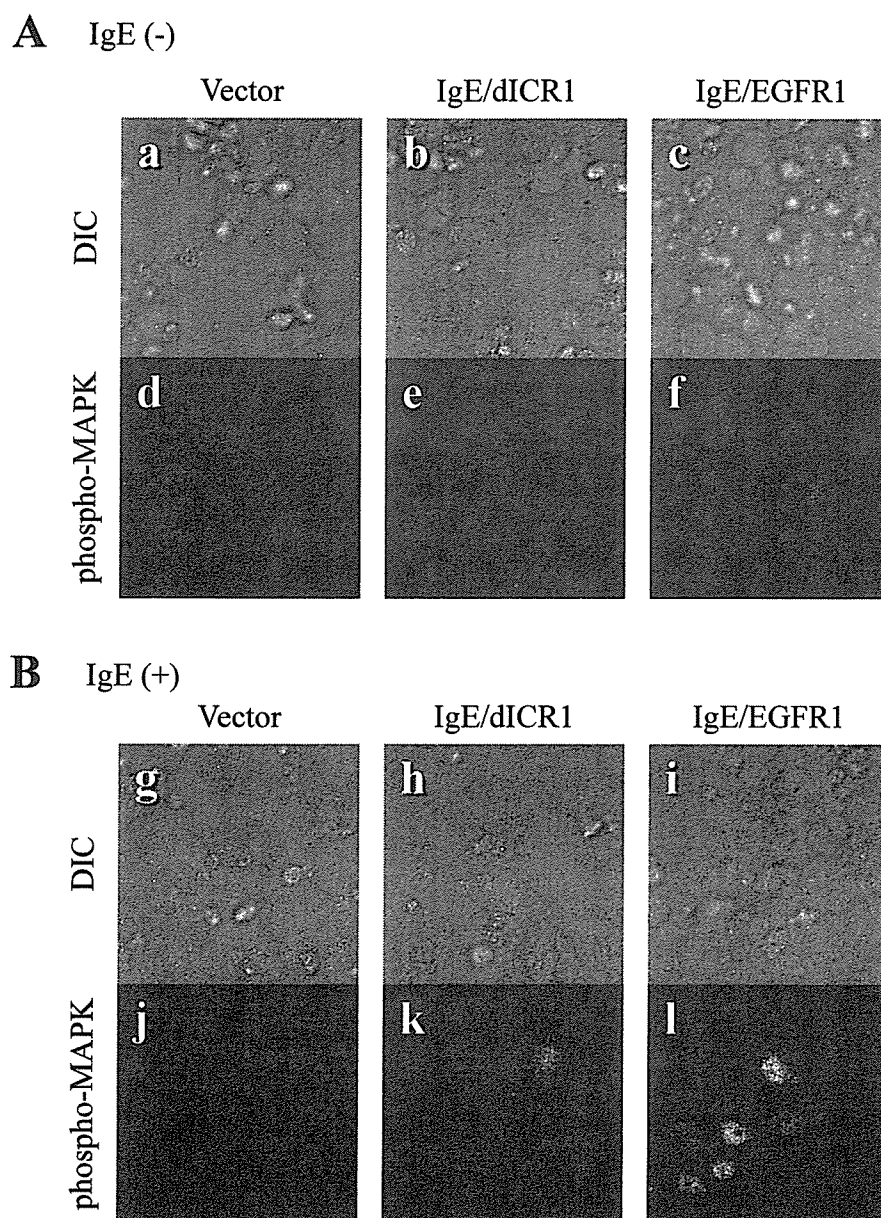


図 7

キメラ受容体を介するシグナルによる MAPK のリン酸化

HLR-Elk1 細胞にベクターのみ (**a, d, g, j**)、IgE/dICR1 (**b, e, h, k**)、または IgE/EGFR1 (**c, f, i, l**) の遺伝子を導入して 30 時間後に、0 (A) 乃至 200 (B) ng/ml のヒト IgE を一晚 (18 時間) 添加した。これを抗ヒト IgE 抗体により 37°C、10 分間刺激し、BD Cytofix/Cytoperm により固定および可溶化し、抗リン酸化 MAPK 抗体と Alexa488 標識抗ウサギ IgE 抗体で染色の後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

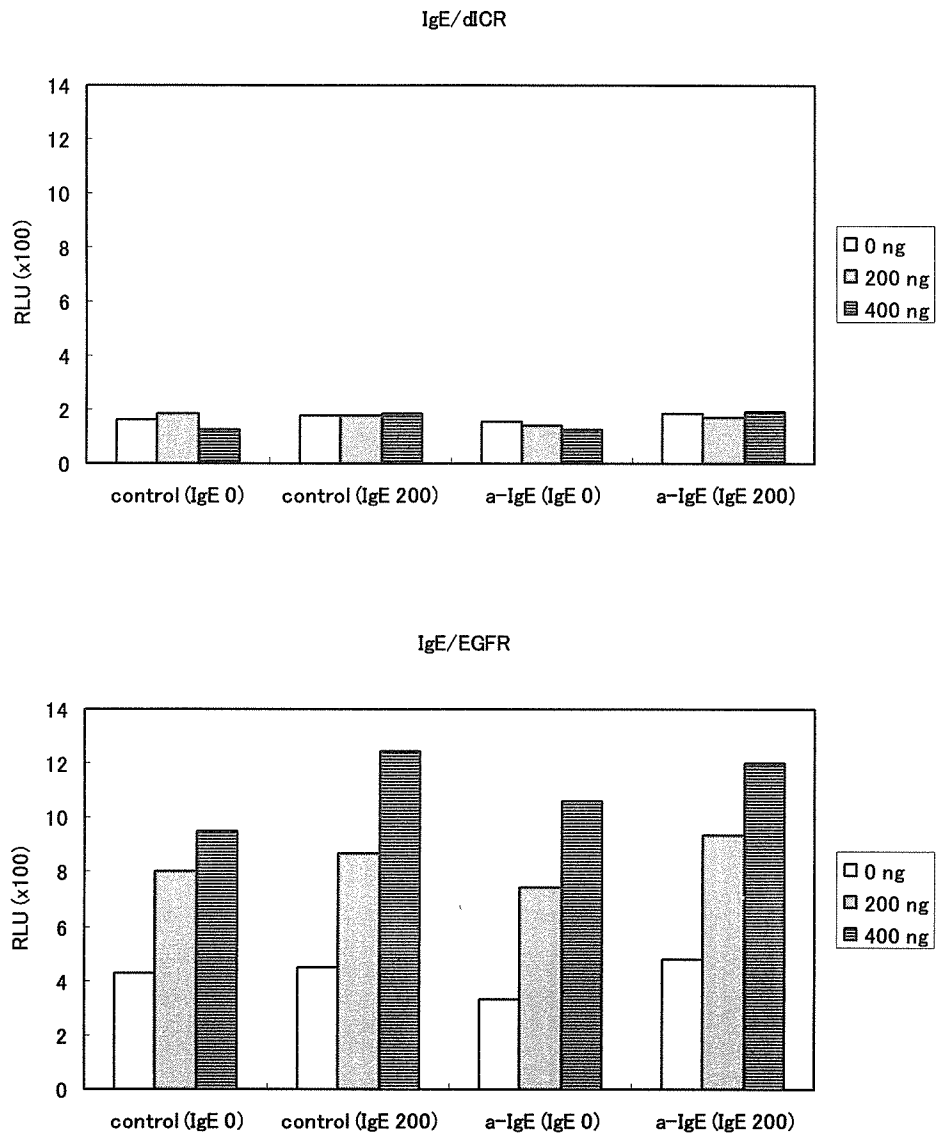


図 8

HLR-EIk1 細胞のキメラ受容体遺伝子導入条件の検討

HLR-EIk1 細胞に、IgE/dICR1（上段）または IgE/EGFR1（下段）のプラスミドを図に示した量、リポフェクション法によりトランスフェクトした。30 時間後、200 ng/ml ヒト IgE を添加して 18 時間後に 3 時間架橋刺激した場合の RLU を示した。データは 2 回の実験の平均値。

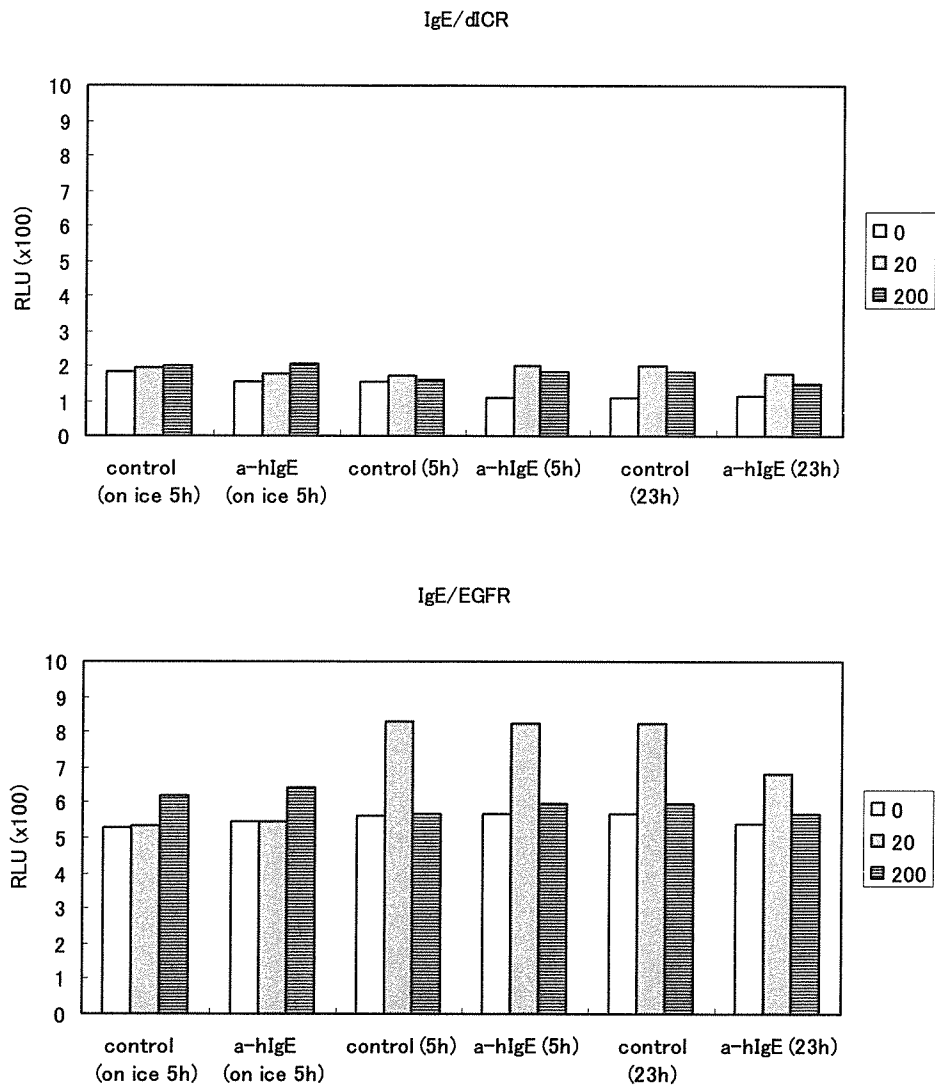


図 9

各種キメラ受容体発現細胞の RLU へのヒト IgE 感作条件による影響

HLR-Elk1 細胞に、IgE/dICR1 (上段) または IgE/EGFR1 (下段) をトランスフェクト後 30 時間より、図に示した濃度 (ng/ml) のヒト IgE を添加して 18 時間後に架橋刺激した場合 (5h)、ヒト IgE と抗ヒト IgE 抗体との複合体で 23 時間刺激した場合 (23h)、およびトランスフェクト 48 時間後に氷上で 30 分 IgE で感作して 5 時間刺激した場合 (on ice 5h) の RLU を示した。データは 2 回の実験の平均値。

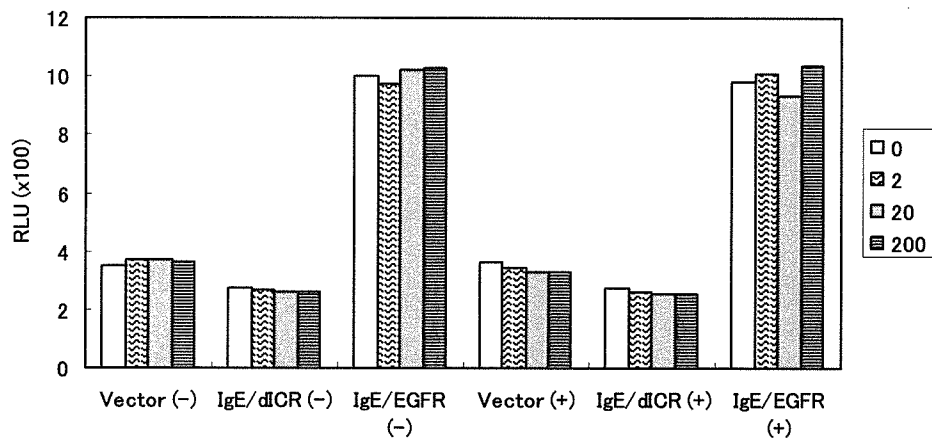


図 10

ヒト IgE をアッセイ前日に感作させた場合の RLU

HLR-Elk1 細胞を、ベクターのみ、IgE/dICR1 または IgE/EGFR1 をトランスフェクトして 27 時間後から 3 時間、図に示した濃度 (ng/ml) のヒト IgE により感作を行った。3 時間後より再度 IgE を含まない DMEM に置換して 18 時間培養後、抗ヒト IgE 抗体により 3 時間刺激した (+)。抗ヒト IgE 抗体を添加しなかった場合を (-) で示した。データは 2 回の実験の平均値。

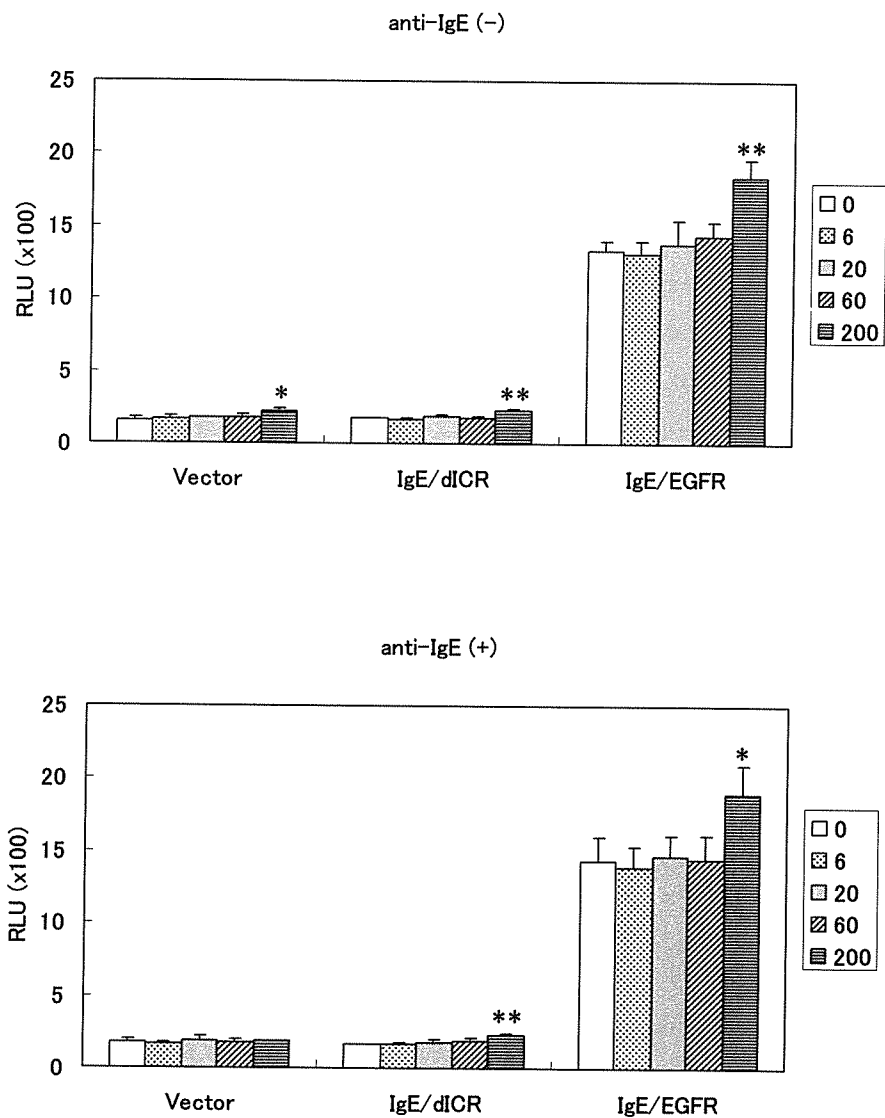


図 11

各種キメラ受容体発現細胞の RLU のヒト IgE への濃度依存性

HLR-EIk1 細胞に、IgE/dICR1 (上段) または IgE/EGFR1 (下段) をトランスフェクト後 30 時間より、図中に示した濃度 (ng/ml) のヒト IgE を添加して 18 時間後に抗ヒト IgE 抗体により 3 時間刺激を行なった場合の RLU を示した。データは 4 回の実験の平均値と SD。 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Teshima, R., Amano, F., Nakamura, R., Tanaka, Y. and Sawada, J-I.	Effects of polyunsaturated fatty acids on calcium response and degranulation from RBL-2H3 cells.	International Immunopharmacology	7	205 - 210	2007
Nakamura, R.	Chimeric EGF receptor that detects IgE-binding/crosslinking	Journal of Allergy and Clinical Immunology	119	S97	2007