

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～18 年度 総合研究報告書
(H17-食品-014)

主任研究者 中村 亮介

平成 19 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

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

..... 37

III. 研究成果の刊行物・別刷

..... 39

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。本研究計画は大きく二つの実験系の確立に依拠している。すなわち、ラット培養マスト細胞株 RBL-2H3 細胞にヒト Fc ϵ RI α サブユニットを発現させた系と、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) にヒト Fc ϵ RI α とヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) とのキメラ受容体 (IgE/EGFR) を発現させた系である。いずれの系も、IgE と抗 IgE 抗体との結合のみに基づく従来の試験法とは異なり、生きた細胞の細胞膜上における受容体の架橋という、極めてユニークなメカニズムに基づいた、新しいアレルギー性評価試験法の確立を目指したものである。平成 17 年度は主に前者の系の確立に注力し、ヒト Fc ϵ RI α の安定発現株 RBL-hE1a-2B12 細胞を作製し、その機能解析に従事した。また平成 18 年度は主に後者の系の確立に挑み、キメラ受容体を発現する HLR-Elk1 細胞の系を作製した。RBL-hE1a-2B12 細胞は、単量体ヒト IgE を高親和性結合し、その架橋により細胞内 Ca²⁺応答および脱顆粒反応を誘導することができた。また、キメラ受容体を発現する HLR-Elk1 細胞もまた、単量体ヒト IgE を結合し、受容体の自己リン酸化や MAP キナーゼのリン酸化等のシグナル伝達の結果、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼの発現を誘導することができた。その反面、前者の系はヒトとラットの種差のため、ヒトの血清を用いたアッセイを行なう際には補体による傷害を無視できなかった。また、後者の系は IgE の感作のみでルシフェラーゼの発現が誘導され、受容体の架橋シグナルを選択的に検出することは困難であった。いずれの系にも長所と短所はあるが、実際のアレルギー患者血清においては、抗 IgE 自己抗体など様々な IgE と Fc ϵ RI との結合を阻害する因子が存在することが知られており、これらの系は、血清中 IgE のうち実際に Fc ϵ RI に結合して細胞を活性化しうる IgE の定量に用いることができると期待された。

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ゲン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ゲン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ゲン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、

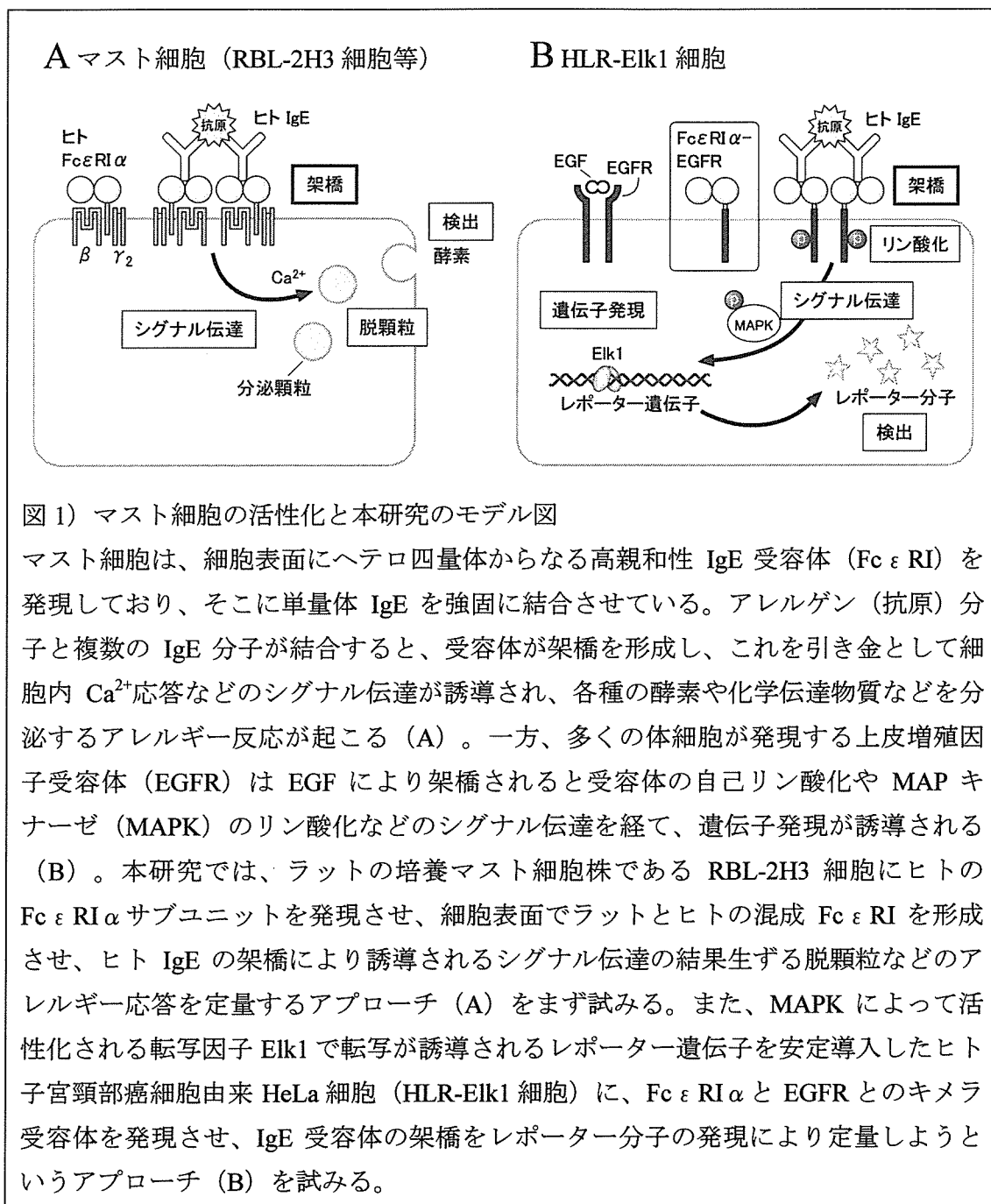
食品の安心・安全を確保する上で重要な課題となっている。

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スト細胞の活性化シグナル伝達に着目し、新たなアレルゲン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、アレルゲン特異的 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 FcεRI 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 FcεRI 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、ラットの培養マスト細胞株である RBL-2H3 細胞にヒトの Fc ϵ RI α サブユニットを発現させ、細胞表面でラットとヒトの混成 Fc ϵ RI を形成させ、ヒト IgE の架橋により誘導されるシグナル伝達の結果生ずる脱顆粒などのアレルギー応答を定量する系 (図 1A)⁴⁾、および 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)⁵⁾。

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⁶⁾。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 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だある HeLa 細胞 (HLR-Elk1 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⁷⁾。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°C 3 分の後、94°C 1 分・52°C 1 分・72°C 1 分を 30 サイクル、72°C で 7 分) により全長 cDNA の両末端に *Eco*RI および *Sa*I 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°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³⁾。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

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遺伝子導入した。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。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。

HLR-Elk1 細胞の安定発現株の作製に

は、キメラ受容体の哺乳動物発現プラスミド (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

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。

H1R-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) 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⁸⁾。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⁹⁾。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。

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、 $10 \mu\text{g/ml}$ 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。

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 $10 \mu\text{g}$ 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 $10 \mu\text{g/ml}$ 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、 $140 \mu\text{l}$ の Cell lysis buffer (20mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1mM Na_2EDTA , 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM beta-glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4 , $1 \mu\text{g/ml}$ 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 $14,000\text{rpm}$, 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 $15 \mu\text{g}$ 乗せ、200V で 25 分間泳動し、PVDF 膜 ($0.22 \mu\text{m}$; 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晚作用させた。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⁵⁾。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 $10 \mu\text{g/ml}$ により刺激し、5% CO_2 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 μ l/well 添加し、細胞破碎液 20 μ l を測定に供した。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、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。

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 Fc ϵ RI α 発現 RBL-2H3 細胞の作製

薬剤選択により得られたヒト Fc ϵ RI α 発現 RBL-2H3 細胞に、ヒト IgE (1 および 0.1 μ g/ml) を作用させ、10 μ 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 Fc ϵ 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⁹⁾。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⁹⁾。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 Ca^{2+} 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 $Fc\epsilon RI$ を介する刺激時のパターンとほぼ同様である¹⁰⁾。次に、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。クローンのスクリーニングは、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-hE1a-2B12、RBL-hE1a-1G4、RBL-hE1a-1C10 と名付けられ、それぞれ図 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 $Fc\epsilon RI\alpha$ 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 μ 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消失するような問題は観察されなかった。

(2) ヒト $Fc\epsilon RI\alpha$ 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¹¹⁾。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 μ g/ml ヒト IgE で 3 時間感作し、fura-2 AM および蛍光分光光度計により細胞内 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 $Fc\epsilon RI\alpha$ 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 を用いたの抗原特異的 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、予想され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。 $Fc\epsilon RI$ 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¹²⁾、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こらな

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 $\mu\text{g/ml}$ 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

脱顆粒に伴う β -hexosaminidase 酵素の放出は感作に用いる 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 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 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²⁾。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。

(1) 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 Fc ϵ RI α と上皮増殖因子受容体 (EGFR) 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、キメラ受容体遺伝子を作製した。

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ホルモン 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、MAPK のリン酸化による活性化などを経て、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^{13,14)}。

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、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⁷⁾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、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 α 由来のものと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 7)。

まず、Fc ϵ RI α サブユニットの部分 cDNA を PCR により調製した。一方で、HeLa 細胞の全 mRNA より RT-PCR によって EGFR の部分 cDNA 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。両遺伝子を混合し、

SOE 法によりキメラ受容体遺伝子を作製した。

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 8 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。

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 9 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。

いずれの遺伝子も、シークエンスを確認後、大腸菌の大量培養により mg オーダーでプラスミドを精製することができた。

(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。

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 10)。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-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。

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¹⁵⁾。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-Elk1 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。

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-Elk1 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-Elk1 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、ウエスタンブロット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。

HLR-Elk1 細胞に、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 μ g/ml 抗ヒト IgE 抗体または 100 ng/ml EGF により 37°C で 10 分間刺激した。

図 11A に示したように、Fc ϵ RI α 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 105 kDa で、同ドメインを持たない IgE/dICR1 が 50 kDa である（図 7）。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 11B）。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たある細胞を 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 11C）。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 11E に示した通り、100 ng/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 11C）。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¹⁶⁾、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 11E）、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¹⁷⁾。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¹⁸⁾。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 11E）。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-EIk1 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、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 11C）。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 11E）。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 11A)、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 11B)。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 11E)。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 11E)。

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。

(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、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。

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 12)。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、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 13 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 の量を定量する上では、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