

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 $\epsilon$ RI 抗体など）が考えられている<sup>2)</sup>。

よって、血清中の IgE のうち、実際にどれだけの IgE が Fc $\epsilon$ 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 Fc $\epsilon$ 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。

また、本研究における Fc $\epsilon$ 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 $\epsilon$ RI $\alpha$  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<sup>16)</sup>、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（ブラストサイジン）

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  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$  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、本研究の前半で作製した

RBL-hE1a-2B12 細胞またはヒトマスト細胞 LAD-2<sup>19)</sup> などに、ネイティブなシグナル伝達である  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  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  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  や  $\text{NF-AT}$  に着目した新しいリン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新規培養細胞系を用いる IgE の定量法は、全く新しい、より生理的な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近づく重要な一歩であったと思われる。

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  $\epsilon$  RI-bindable human IgE with an enzyme-linked immunosorbent assay using a recombinant soluble form of the human Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  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) Takagi, K., et al.: Application of human Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE. *Biol Pharm Bull.*, **26**, 252-255, 2003
- 5) Nakamura, R.: Chimeric EGF Receptor That Detects IgE-binding/crosslinking. *J Allerg Clin Immunol*, **119**, S97, 2007
- 6) 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
- 7) Hexdall, L. & Zheng, C.F.: Stable luciferase reporter cell lines for signal transduction pathway readout using GAL4 fusion transactivators. *Biotechniques*. **30**, 1134-1138, 2001
- 8) 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
- 9) Teshima, R., et al.: Effects of herbimycin A and ST638 on Fc $\epsilon$  receptor-mediated histamine release and Ca<sup>2+</sup> signals in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochim Biophys Acta.*, **1221**, 37-46, 1994
- 10) Nakamura, R., et al.: Effect of dialkyl phthalates on the degranulation and Ca<sup>2+</sup> response of RBL-2H3 mast cells. *Immunol Lett.* **80**, 119-124, 2002
- 11) 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
- 12) Borkowski, T.A., Jouvin, M-H., Lin, S-Y. and Kinet. J.P. (2001) Minimal requirements for IgE-mediated regulation of surface Fc $\epsilon$ RI. *J Immunol.*, **167**, 1290-1296, 2001
- 13) 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

- 14) 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
- 15) 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
- 16) Zhang, X., et al.: An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, **125**, 1029-1031, 2006
- 17) 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
- 18) Kawakami, T. and Galli, S.J.: Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol*, **2**, 773-786, 2002
- 19) 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 aggregation of Fc  $\epsilon$  RI or Fc  $\gamma$  RI. *Leuk Res*, **27**, 677-682, 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 (SanDiego, 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。

表 1

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

Stimulation	RBL-2H3	RBL-hEla <sup>*1</sup>	RBL-pCI <sup>*2</sup>
Control	1.07	0.50	1.25
Human IgE (1.0 $\mu$ g/ml) /anti-human IgE	1.21	3.91	1.09
Human IgE (0.1 $\mu$ g/ml) /anti-human IgE	1.15	2.75	1.11
Mouse anti-DNP IgE /DNP-BSA	18.91	13.34	20.75

<sup>\*1</sup> human  $\alpha$ -chain cDNA transfected cells<sup>\*2</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

表 2

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

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

<sup>\*1</sup> human  $\alpha$ -chain cDNA transfected clone<sup>\*2</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

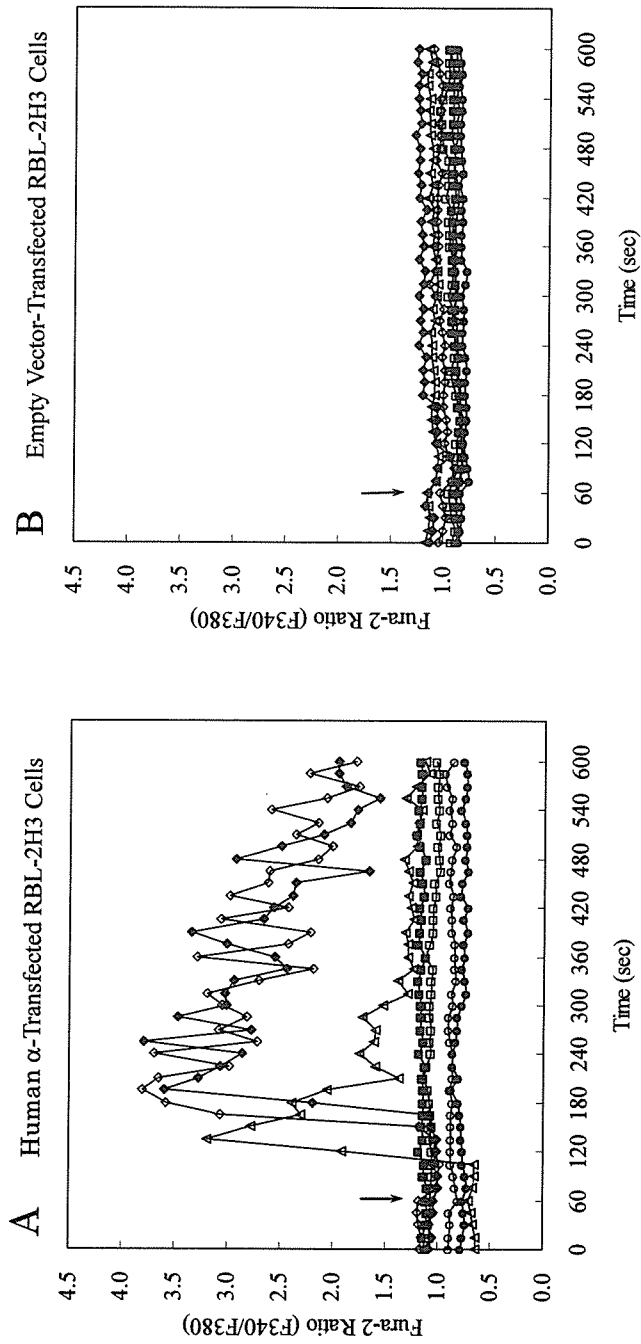


図 2  
単一細胞レベルで解析した RBL-2H3 細胞トランスフェクタントのヒト IgE および抗ヒト IgE 抗体刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答

ヒト  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$  (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  $\text{Ca}^{2+}$  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。

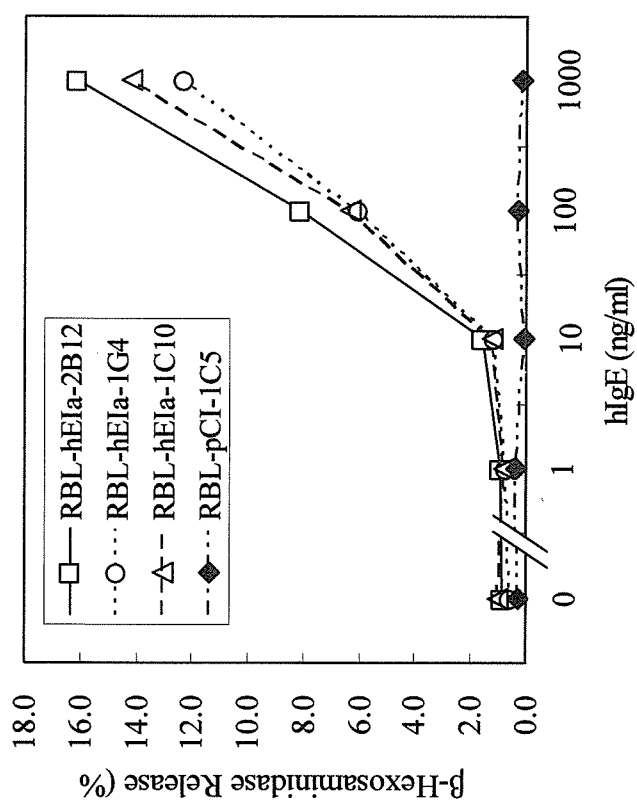


図3  
4種のRBL-2H3細胞トランスフェクタントのヒトIgEおよび抗ヒトIgE抗体刺激によるβ-hexosaminidase 酵素放出

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-hE1a-2B12、RBL-hE1a-1G4、RBL-hE1a-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。



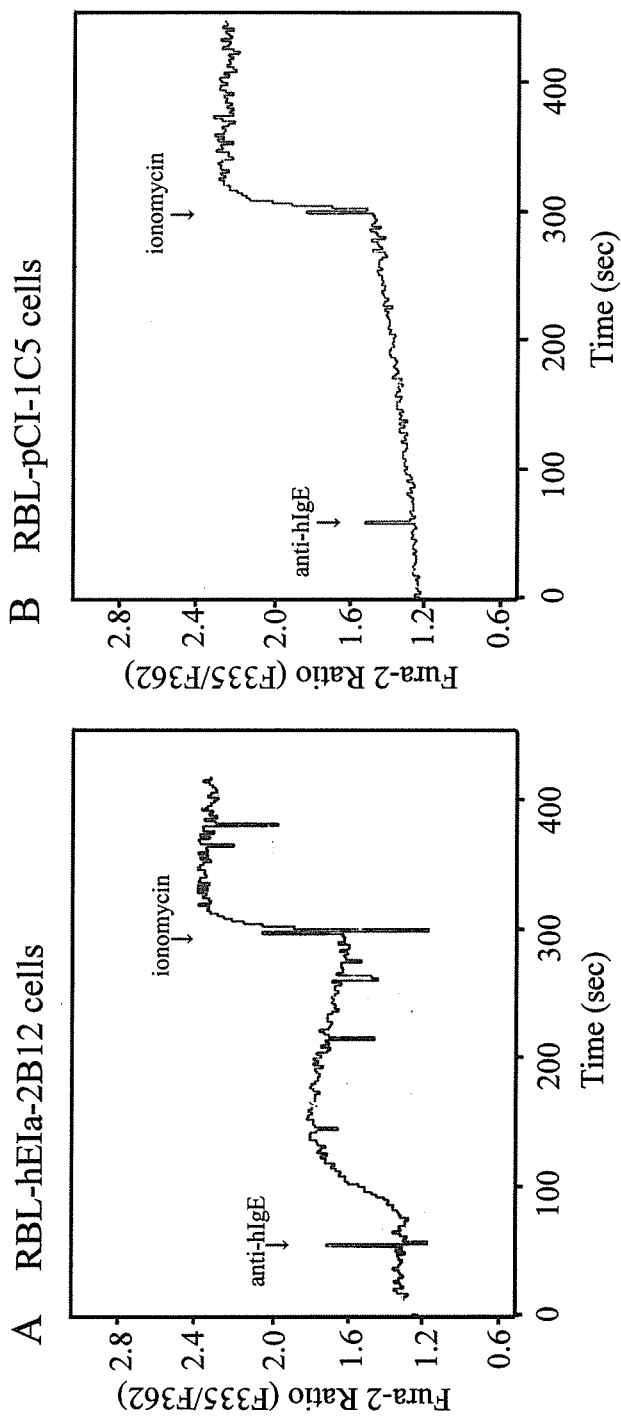


図4  
細胞集団レベルで解析したRBL-2H3細胞トランスフェクタントのヒトIgEおよび抗ヒトIgE抗体刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>応答

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Ca<sup>2+</sup>応答をfura-2 AMおよび蛍光分光光度計を用いてクローン細胞集団レベルで解析した。

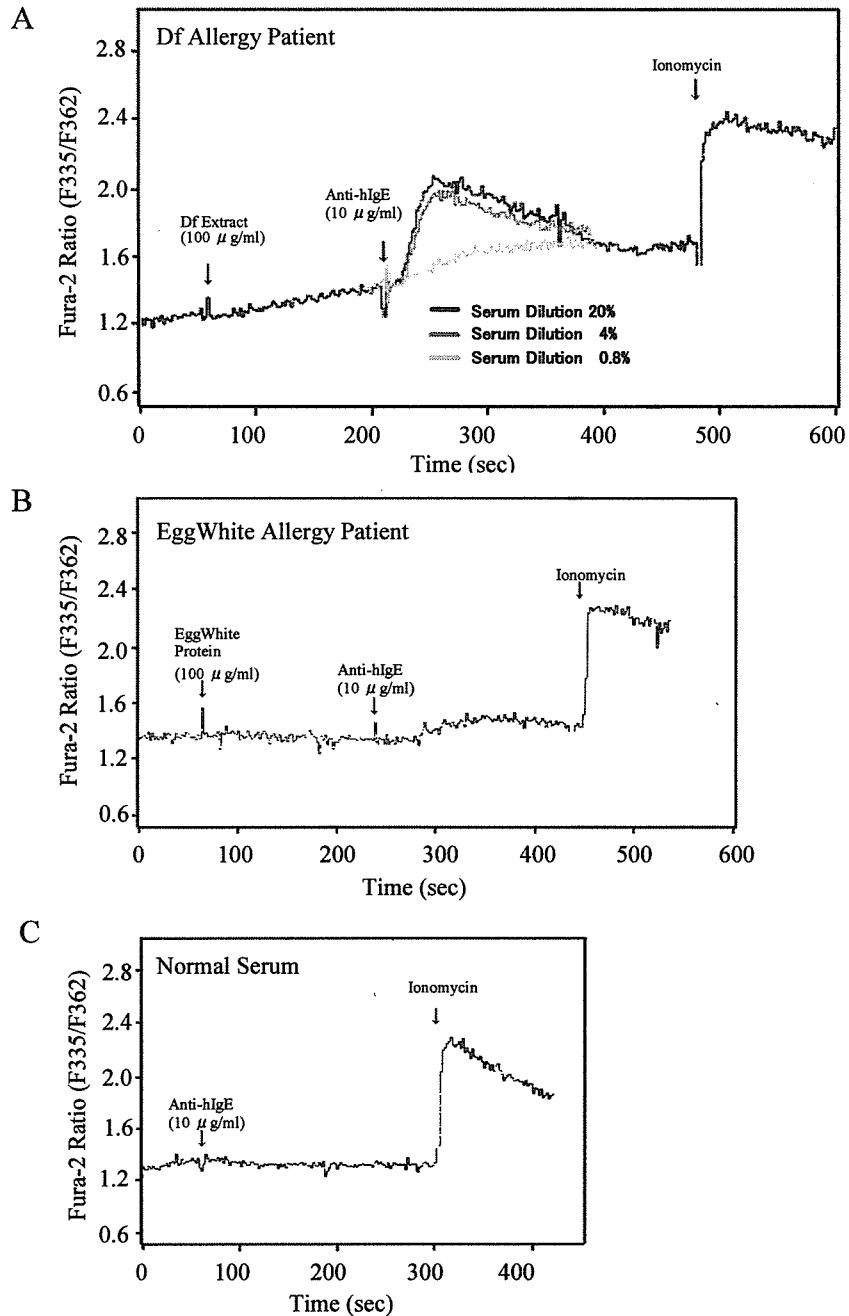


図 5

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。

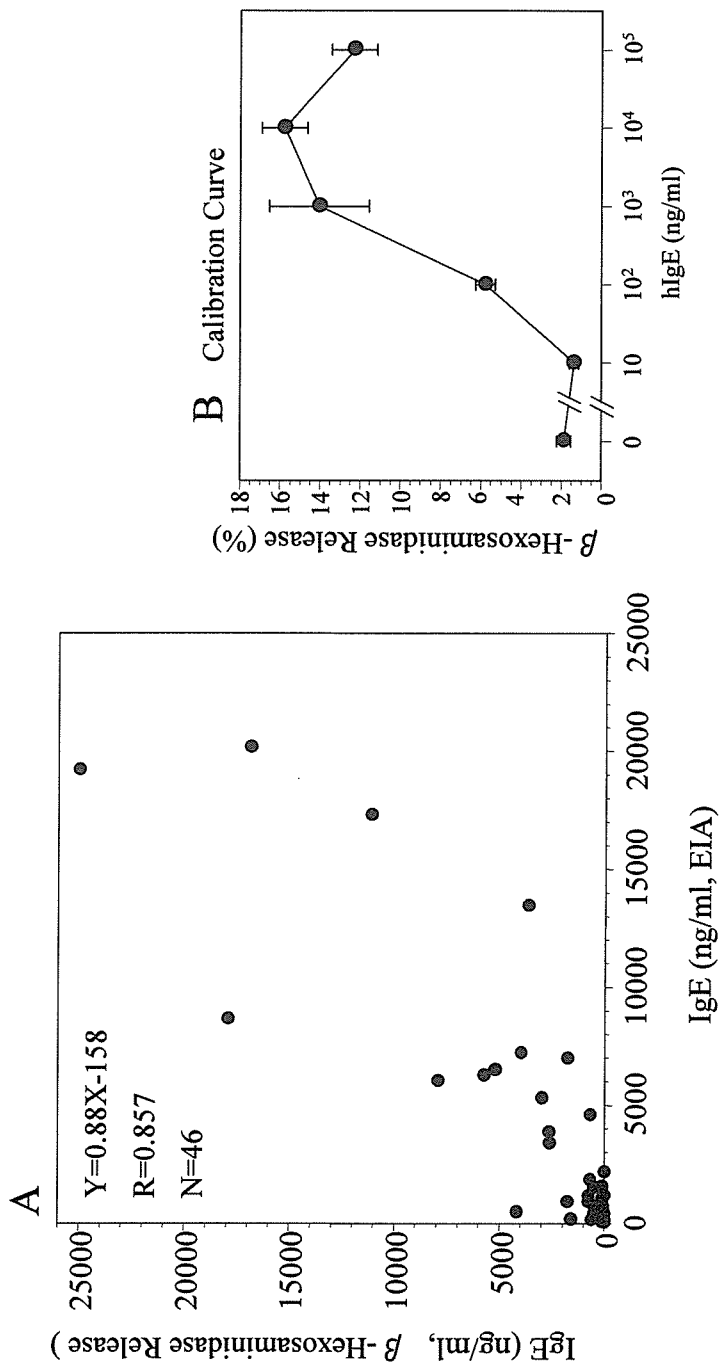


図 6

RBL-hE1a-2B12 細胞の  $\beta$ -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。

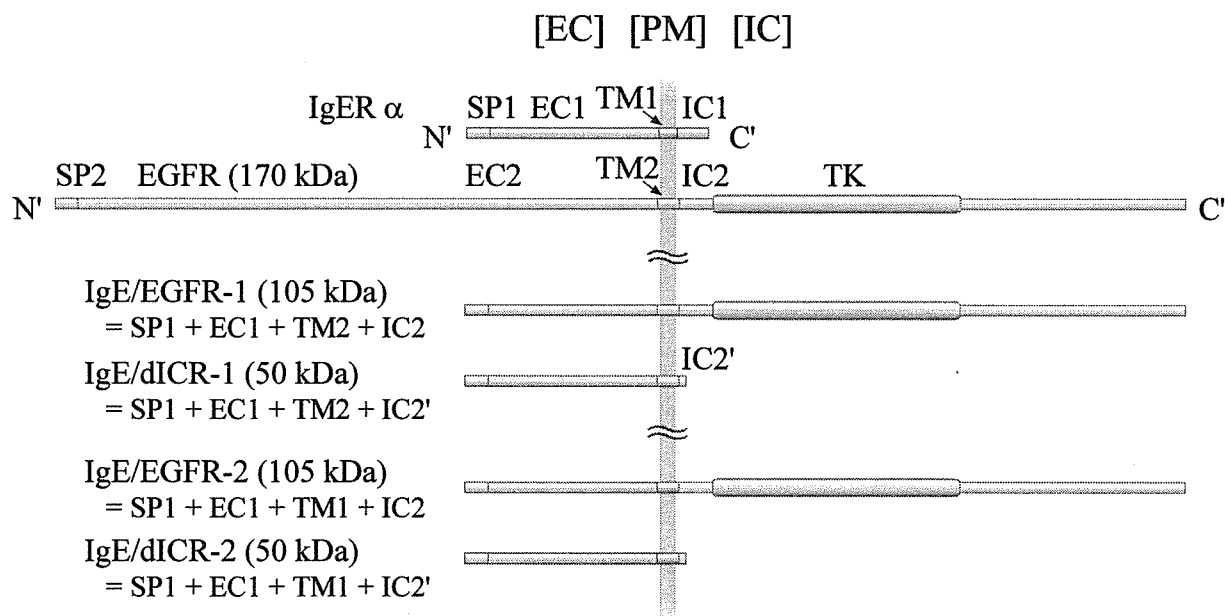


図7  
各種キメラ受容体の模式図

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。

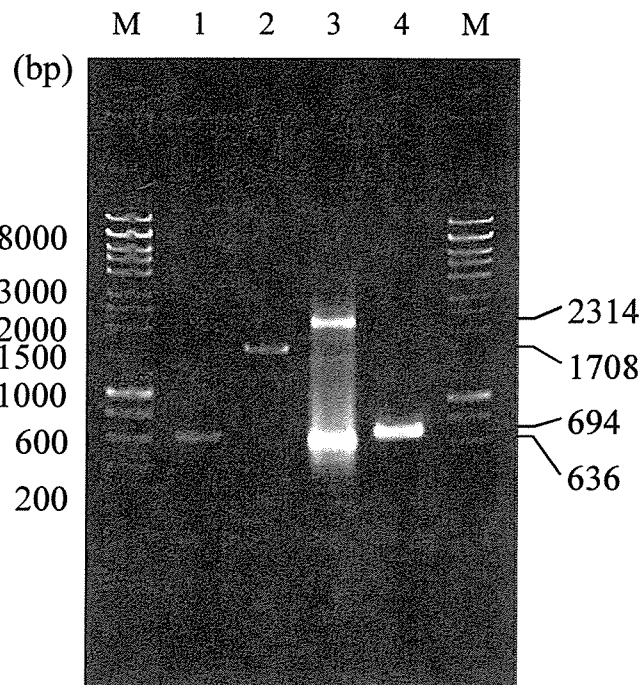


図 8

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。

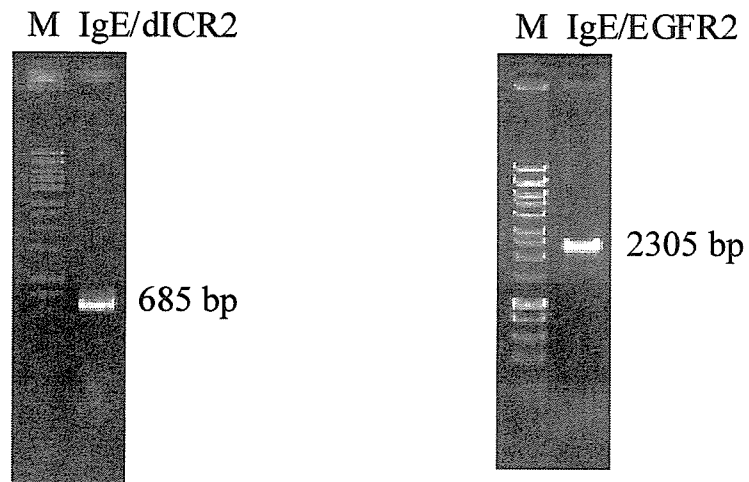


図9

細胞膜貫通ドメインが  $Fc\epsilon RI\alpha$  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  $Fc\epsilon RI\alpha$  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。

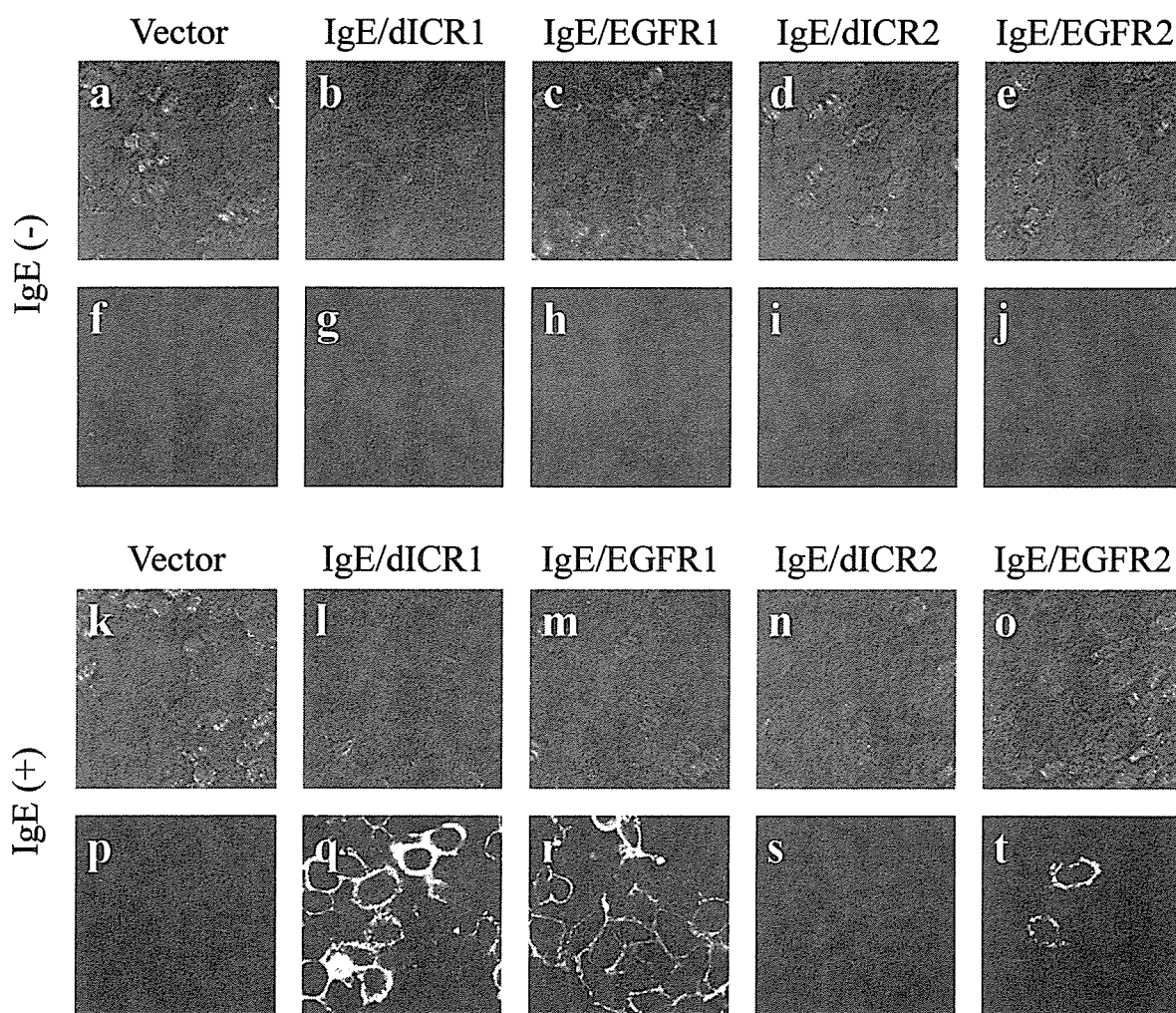


図 10

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。

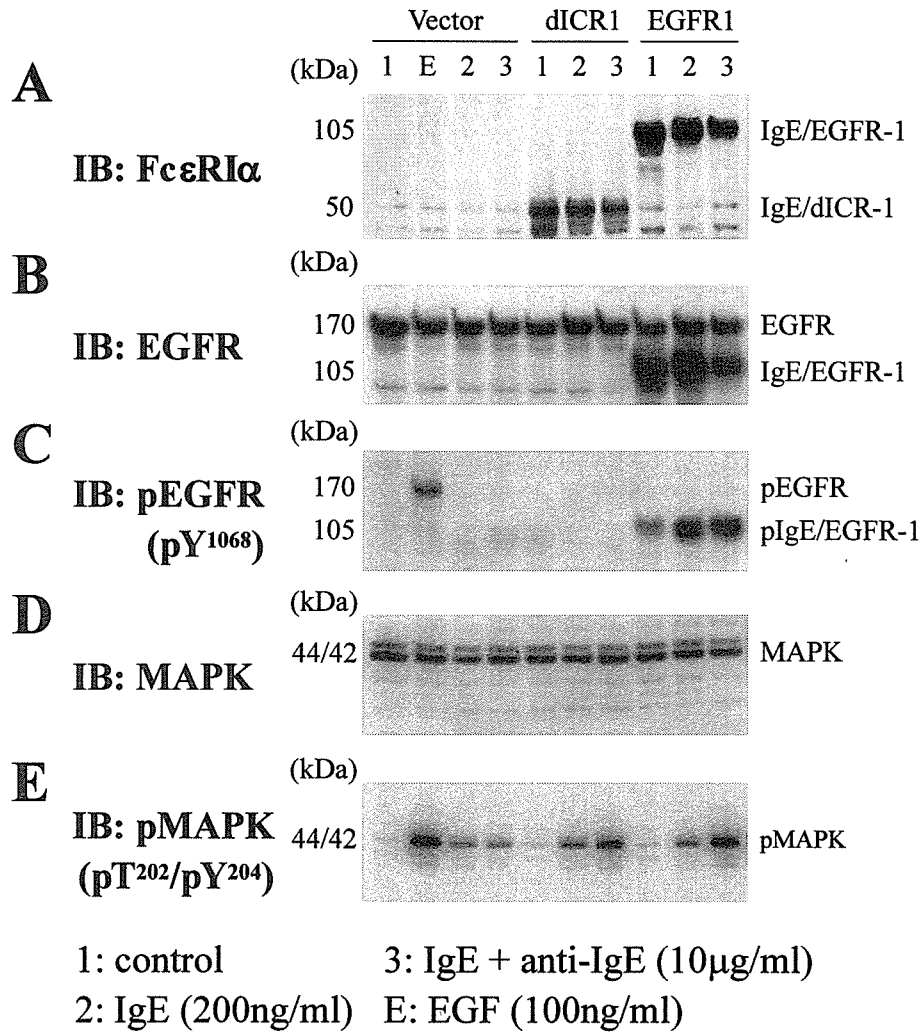


図 11

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。



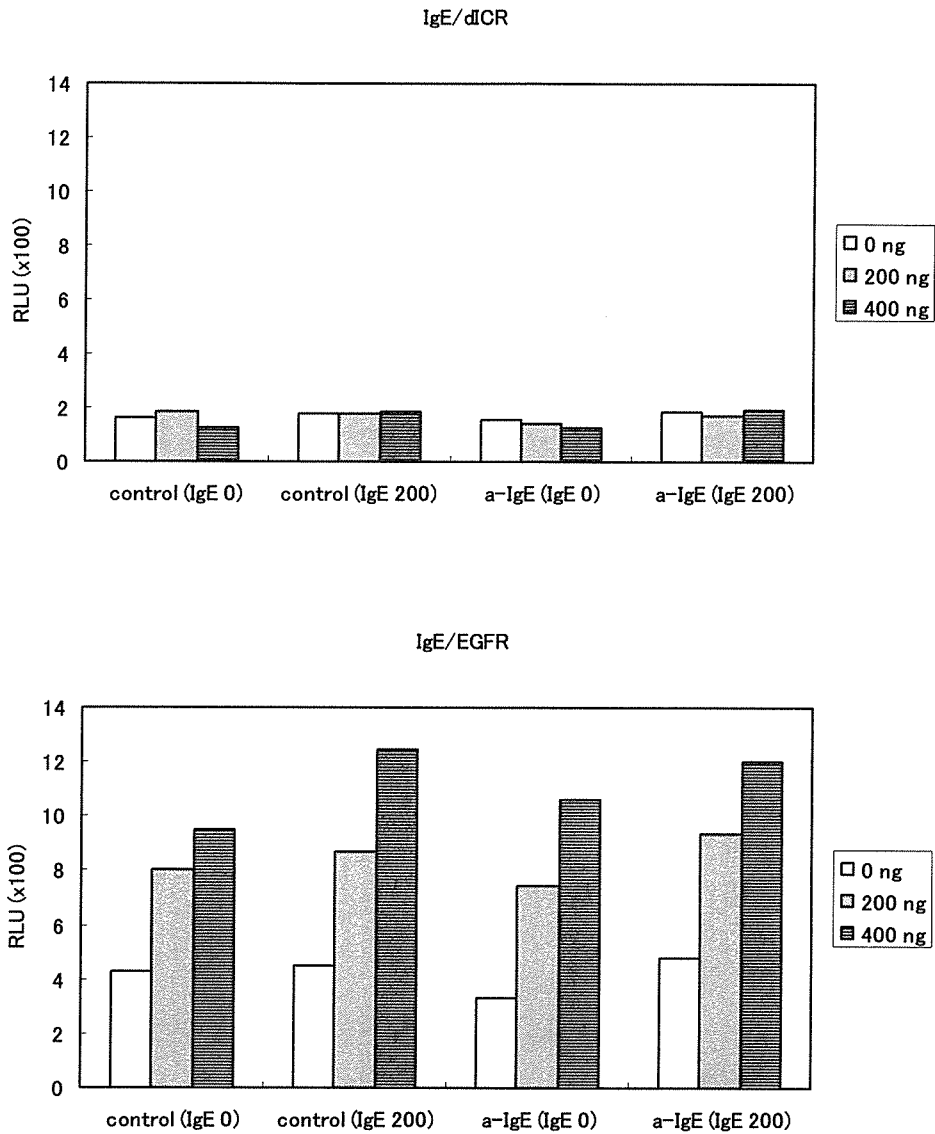


図 12

HLR-Elk1 細胞のキメラ受容体遺伝子導入条件の検討

HLR-Elk1 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。

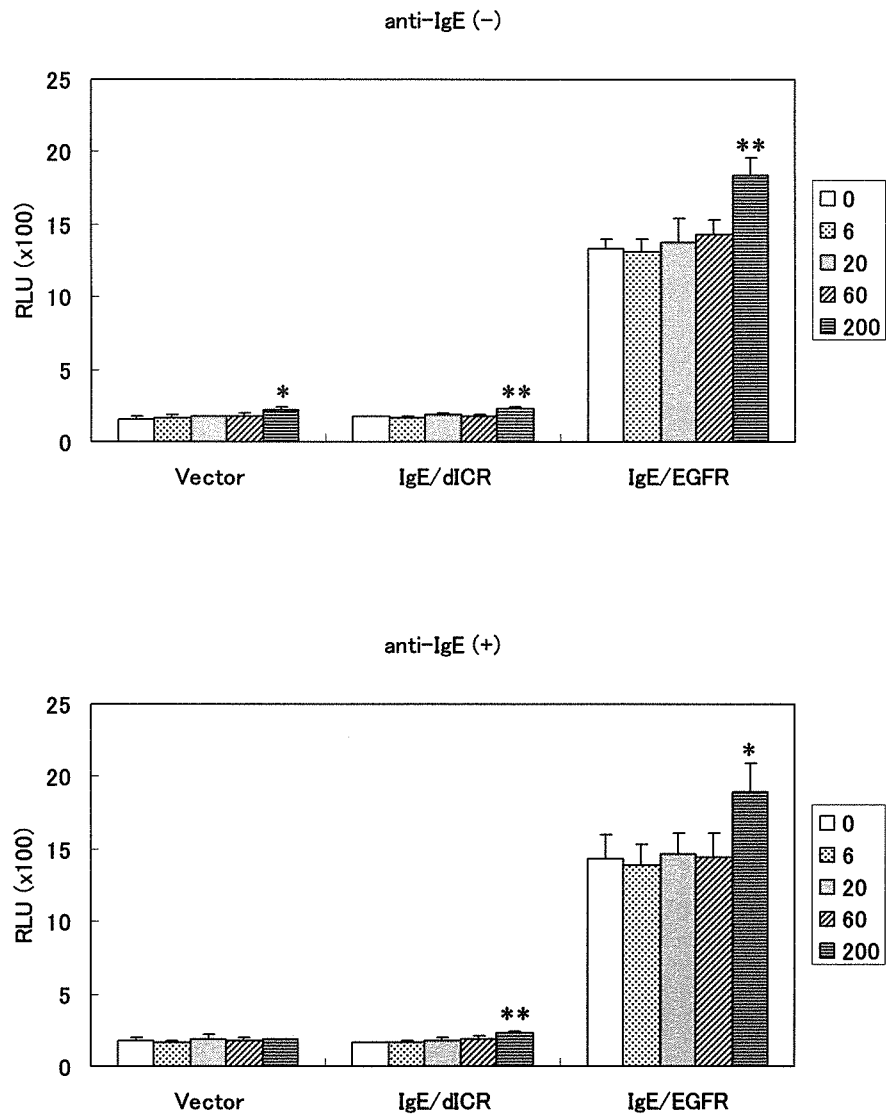


図 13

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-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

## Effects of polyunsaturated fatty acids on calcium response and degranulation from RBL-2H3 cells

Reiko Teshima<sup>a,\*</sup>, Fumio Amano<sup>b</sup>, Ryosuke Nakamura<sup>a</sup>,  
Yasuhiko Tanaka<sup>c</sup>, Jun-ichi Sawada<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Division of Biochemistry and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Cell Biology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Received 4 September 2006; received in revised form 21 September 2006; accepted 22 September 2006

### Abstract

To investigate the biological activity of various polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on the allergic reaction, we examined the effects of six PUFAs and two saturated fatty acids on calcium response and degranulation from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. Between 20 and 40  $\mu$ M of six PUFAs ( $\omega$ -6 series: arachidonic acid [AA, C20:4],  $\gamma$ -linolenic acid [ $\gamma$ -LN, C18:3] and linoleic acid [LA, C18:2];  $\omega$ -3 series:  $\alpha$ -linolenic acids [ $\alpha$ -LN, C18:3] and eicosapentaenoic acid [EPA, C20:5]; and  $\omega$ -9 series: oleic acid [OLE, C18:1]), or two saturated fatty acids (stearic acid [STA, C18:0] and arachidic acid [AD, C20:0]) were used to examine the effects on calcium response and degranulation from RBL-2H3 cells. Calcium response was monitored using the fluorescent calcium indicator fura-2, while degranulation was monitored by measuring histamine release from the cells. Three  $\omega$ -6 PUFAs (AA,  $\alpha$ -LN and LA) dose-dependently increased the cytosolic free-calcium concentration and histamine release from RBL-2H3 cells. This phenomenon was specific to the  $\omega$ -6 PUFAs, the  $\omega$ -3 PUFAs ( $\alpha$ -LA and EPA),  $\omega$ -9 PUFA (OLE) and the saturated fatty acids (STA and AD) had no effect. The increase in the cytosolic free-calcium concentration caused by the  $\omega$ -6 PUFAs depended on the existence of external calcium, cell viability and the cellular IP<sub>3</sub> levels remained unchanged throughout the experiment. These results suggest that  $\omega$ -6 PUFAs work as direct mediators of calcium signaling pathways in RBL-2H3 cells.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Polyunsaturated fatty acid (PUFA); Calcium response; Degranulation; RBL-2H3 cells; Histamine release

### 1. Introduction

Linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid are essential polyunsaturated fatty acids, the former a  $\omega$ -6 and the latter a  $\omega$ -3 fatty acid [1,2]. In mammalian cells, linoleic acid is converted to arachidonic acid by  $\delta$ -6 desaturase;  $\alpha$ -linolenic acid is also converted to eicosapentaenoic

acid (EPA) by  $\delta$ -6 desaturase and is then further converted to docosahexaenoic acid (DHA). Recently,  $\omega$ -3 fatty acids have attracted a great deal of attention because of their anti-atherosclerotic, anti-inflammatory and anti-allergic properties [1,3,4]. Many in vivo experiments have suggested that diets containing large amounts of arachidonic acid and the fatty acid precursors of the  $\omega$ -6 family might promote atherosclerosis and inflammation, while diets containing a high amount of  $\omega$ -3 PUFAs might protect against these conditions [3,4].

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 1141x243; fax: +81 3 3707 6950.

E-mail address: rteshima@nihs.go.jp (R. Teshima).