

研究課題名	革新的抗体作製技術を用いた食物アレルギー抗原同定法の開発
フリガナ	ヒラカワ ジョウタロウ
代表者名	平川 城太朗
所属機関（機関名） （役職名）	国立大学法人千葉大学・大学院薬学研究院 助教
本助成金による 発表論文，学会発表	該当なし 2018 年度予定

研究結果要約

食物アレルギーはごく一部のヒトに起こるアレルギー疾患であるが、重篤な場合は循環器不全をもたらす死に至る。そのため臨床では、食物アレルギー患者がどのような食物アレルギー抗原に反応するのかを知ることは極めて重要である。また食物アレルギーの研究を進めるうえでは、食物アレルギー抗原特異的なモノクローナル抗体を作製し、どのような食物アレルギー抗原が食物アレルギー発症に関与するかを明らかにすることが重要である。そこで本研究では、食物アレルギー抗原を発現する細胞株を野生型マウスに過剰免疫し、食物アレルギー抗原特異的な IgE 抗体を作製する「新規モノクローナル抗体作製法」を開発することを目指した。

本研究ではモデルアレルギー抗原として卵白アルブミン(OVA)を抗原として用い、幾つかの免疫プロトコルに従い OVA を発現する細胞株を野生型マウスに免疫することで、OVA 特異的なモノクローナル抗体の樹立に成功した。抗体のクラスを解析すると多くがマウス IgM と IgG であり、OVA 過剰発現株を免疫するだけでは抗原特異的な IgE クローンを作製することは難しいことが明らかとなった。今後は本手法をさらに発展させることで、食物アレルギー抗原特異的な IgE 抗体が簡便に作製され、食物アレルギー研究が推進されることが期待される。

研究目的

食物アレルギーはごく一部のヒトに起こるアレルギー疾患であるが、重篤な場合は循環器不全をもたらす死に至る。食物アレルギーの同定には、患者血清を用いたウエスタンブロッティング法が用いられるが、この手法では食物アレルギーの立体構造が完全に保持されているとは限らず、食物アレルギーを同定するには十分な研究手法ではない。本研究では、未だ明らかになっていない食物アレルギーを同定する方法として、「モノクローナル抗体とセルソーターを利用した革新的技術に基づく食物アレルギーの同定法を開発」することを目指した。培養細胞に食物アレルギーとなるタンパク質を発現させ、血清またはモノクローナル抗体を用いて食物アレルギー発現株をセルソーティングすることで、簡便かつ特異性の高い食物アレルギー同定法を開発することを目的とした。

本研究の主旨は食物アレルギー発現細胞を作製し、マウスの免疫血清が反応する食物アレルギー発現細胞群をソーティングし、最終的にはその遺伝子を解析することで食物アレルギーを同定するというものである。まずは抗原の研究が進んでいる卵白アルブミン(OVA)を用いて本研究提案が可能であることを証明するとともに、基盤技術の確立を目指した。免疫分野で OVA は良く用いられる抗原であることから、簡便に OVA に対する IgE 抗体を作製する技術が確立されることで、新しい食物アレルギーの予防・治療法の開発につながる可能性がある。

研究計画及び研究手法

(1) 食物アレルギーのクローニング及び食物アレルギー発現細胞株の作製

食物アレルギーとして卵白アルブミン(OVA)を発現させるプラスミドベクター(Addgene)を用いて OVA 発現細胞株の作製を試みた¹⁾。OVA 遺伝子全長を発現するプラスミド pcDNA3/OVA 及びヒトトランスフェリン受容体との融合タンパク質(TfR-OVA)を発現する pcDNA3/TfR-OVA を、遺伝子導入効率の高いエレクトロポレーター Neon (Invitrogen)を用いてチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1)及びマウス大腸がん細胞(CT26)に遺伝子導入した。G418 を用いて薬剤選択を行い、その後セルソーターにてクローニング(シングルセルソーティング)を行った。シングルコロニーを形成したウェルを順次スケールアップし、各クローンの OVA 発現確認にはフローサイトメーター、逆転写 qPCR 法を用いた定量解析を行った。当初の計画ではマウス胎性繊維芽細胞(MEF)を用いる予定であったが、MEF では安定発現株の樹立は難しいため、CHO-K1 及び CT26 を用いて OVA 発現クローン CHO/OVA、CHO/TfR-OVA、CT26/OVA、CT26/TfR-OVA を作製した。

(2) 食物アレルギー発現細胞株の免疫、セルソーティング及びシーケンス解析

OVA 及び TfR-OVA を一過性発現する CHO-K1 細胞株を BALB/c マウスにアジェバントである Alum と混合し腹腔投与した。2 週間おきに 3 回投与するプロトコル①、2 週間おきに 5 回投与し、最終免

疫まで18週間おいたプロトコル②を用意し免疫を行った。数回免疫後の血清を回収し、OVAを発現するCHO-K1及びCT26細胞株への反応性をフローサイトメーターにより解析した。

本来ならばマウスの免疫血清がOVAを発現する細胞株へ反応を示すはずであるが、細胞株への反応は全く見られなかったため、新たにビオチン化OVAおよびマウス免疫グロブリンに対するクラス特異的な抗体を用いたサンドウィッチELISA測定系を構築した。サンドウィッチELISAにより免疫血清中の抗OVA-IgM/IgG/IgEの測定を行った。フローサイトメーターを用いた解析では、OVAを発現する細胞株への免疫血清の反応性が見られなかったことから、予定していた免疫血清に反応する細胞株のセルソーティング及びシーケンス解析は行わなかった。

(3) 食物アレルギー特異的IgE産生ハイブリドーマの樹立

プロトコル①及びプロトコル②に従いマウスを免疫し、最終免疫の4日後に細胞融合を行った。ミエローマとしてP3X63Ag8.653及びSp2/0-Ag14、免疫したマウスの脾細胞を用いて細胞融合を行った。ポリエチレングリコール(PEG)を用いた一般法ではIgEを産生するハイブリドーマを作製することは極めて難しいため、細胞融合効率の高いエレクトロポレーターECFG21(ネッパジーン)を用いた細胞融合を用い、その後HAT選択を行った。およそ2週間後に上述のサンドウィッチELISA測定系を用いてスクリーニングを行い、OVA特異的モノクローナル抗体を分泌するウェルを同定した。OVA特異的モノクローナル抗体を産生する陽性ウェルの細胞をクローニングし、食物アレルギー特異的抗体を産生するハイブリドーマの樹立を行った。樹立したハイブリドーマをスケールアップし、ハイブリドーマの腹水化を行った。さらに希釈した腹水を用いてSDS-PAGEを行い、続けてCBB染色とウェスタンブロッティングを行った。

結果と考察

(1) 食物アレルギーのクローニング及び食物アレルギー発現細胞株の作製

哺乳細胞発現用プラスミドベクター¹⁾を用いてOVAを発現するCHO-K1株(CHO/OVA)及びCT26株(CT26/OVA)の樹立に成功した。フローサイトメーターを用いて細胞表面上のOVAを直接検出することは難しいと想定されたため、ヒトトランスフェリン受容体の膜貫通領域とOVAとの融合タンパク質を発現するベクターpcDNA3/TfR-OVAを用意し、同様の方法で細胞株を作製した。スクリーニングにはハムスター及びマウスの□-アクチン、OVA及びTfR-OVAの遺伝子領域を検出できるプライマーを設計し、□-アクチンとOVAのmRNA発現量の差を逆転写q-PCRにより比較することで行った。CHO-K1株ではCT26株より高いOVA及びTfR-OVAのmRNA発現が見られ、□-アクチン量と比較して1/10程度のmRNAを発現する強発現クローンを作製した。

エレクトロポレーターを用いてOVA及びTfR-OVAを一過性発現させた細胞株へのマウス免疫血清

の反応性をフローサイトメーターにより解析したところ、反応が見られなかった。一例として CHO/OVA を免疫したマウスの免疫血清には、CHO-K1 細胞に対する抗体が多く含まれており、野生型の CHO-K1 細胞には高い反応性を示しバックグラウンドが高く CHO/OVA、CHO/TfR-OVA を解析に用いることは好ましくない。そのため CHO/OVA、CHO/TfR-OVA を免疫したマウスの免疫血清の反応性は野生型の CT26、CT26/OVA、CT26/TfR-OVA への反応性をフローサイトメーターにより解析した。同様に解析を行ったが、免疫血清中の OVA 特異的 IgM/IgG/IgE の検出はできなかった。上述のように OVA は膜タンパク質ではないため、細胞表面に多く発現しているとは考えられにくい。そこでヒトトランスフェリン受容体の膜貫通領域と OVA との融合タンパク質を発現する細胞株を作製し、検出を試みたが、こちらの細胞株でも免疫血清への反応性は検出できなかった。ひとつの可能性として、細胞表面に融合タンパク質が発現していないか、またはフローサイトメーターでの解析に至るまでに融合タンパク質が細胞質内に internalize した可能性が考えられた。この問題を解決するためには細胞株を固定し、透過処理を行う intracellular staining、ベクターの再構築等が必要だと考察されたが、細胞の固定が必要なためサンドイッチ ELISA 測定系を構築した。

(2) 食物アレルゲン発現細胞株の免疫、セルソーティング及びシークエンス解析

OVA 及び TfR-OVA 発現するプラスミドベクターを導入した一過性発現 CHO-K1 細胞株をプロトコル①、②に従って BALB/c マウスに免疫した。IgE 抗体の作製に有用だと言われている水酸化アルミニウムゲルを含むアジュバント Alum と細胞株を混合し、マウスに数回腹腔投与を行い、免疫後にサンドイッチ ELISA により血清価を確認した。OVA 及び TfR-OVA 発現細胞株の違いにより血清価に差は見られなかったが、個体差は認められた。

OVA 特異的モノクローナル抗体を検出するサンドイッチ ELISA は以下のように構築した。抗体のクラスが IgG/IgM である抗 OVA 抗体の検出は OVA をプレートに固層化し、免疫血清を反応させ、HRP 標識抗マウス IgG/IgM 抗体を用いて検出を行った。一方でクラスが IgE である抗 OVA 抗体の検出は血清中の IgE が IgG/IgM でマスクされる可能性を考慮し、抗マウス IgE 抗体 (BioLegend) を固層化し免疫血清を反応させ、ビオチン標識 OVA 及びストレプトアビジン HRP を用いて検出を行った。

一般的に B 細胞上の IgM を IgG または IgE へとクラススイッチさせ、抗体産生細胞へと誘導させるためにはある程度の期間が必要であると言われている。そこで急速法であるプロトコル①と、最終免疫まで 18 週間の期間をおいたプロトコル②を用い比較検討を行った。

(3) 食物アレルギー特異的 IgE 抗体産生ハイブリドーマの樹立

プロトコル①を用いて免疫したマウスのうち血清価の高い個体を選び、脾細胞とミエローマ P3X63Ag8.653 との細胞融合を行った。高確率で目的のハイブリドーマを樹立するためには高効率で細胞融合することが絶対条件であると言われる。そのため通常の PEG 法より細胞融合効率が高いエレクトロポレーターを用いて細胞融合を行い、サンドイッチ ELISA を用いて OVA 特異的モノクローナル抗体を産生するウェルを 30 個検出した。IgE 陽性ウェルは 1 個認められクローニングを行ったが、クローン化には至らなかった。

次にプロトコル②を用いて免疫したマウス脾細胞とミエローマ Sp2/0-Ag14 を用いて細胞融合を行った。プロトコル②ではプロトコル①と比較して細胞融合及びクローニング効率を高めるため、Sp2/0-Ag14 を利用した。予備的な検討により Sp2/0-Ag14 は P3X63Ag8.653 と比較して細胞融合及びクローニング効率が数倍良いことが示されている。プロトコル②では OVA 特異的モノクローナル抗体を産生するウェルを 10 個検出した。IgE 陽性ウェルは 4 個認められクローニングを行い、2 クローン(#2-4, #2-5)の樹立に成功した。結果として最終免疫まで 18 週間をおいたプロトコル②では IgE 陽性のウェルが増えたため、一定の時間をおくことで抗原特異的な IgE を産生させるのに必要な環境が整ったのではと推察した。

樹立したクローン#2-4 及び#2-5 の腹水化を行い、希釈した腹水を用いて SDS-PAGE の後 CBB 染色を行うと、マウス IgM に相当する分子量のバンドが確認された。そのため HRP 標識抗マウス IgE/IgM 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。解析の結果、クローン#2-4 及び#2-5 は抗マウス IgE 抗体には反応を示さず抗マウス IgM 抗体に反応を示し、分子量も IgM に相当するものであった。これら結果から、樹立したクローン#2-4 及び#2-5 はマウス IgM であることが明らかとなった。

サンドイッチ ELISA に用いた抗マウス IgE 抗体(BioLegend)のデータシートにはマウス IgM への交差反応はないと記されており、他社の抗マウス IgE 抗体(BD)を購入しマウス IgM への反応性を確認したところ、両社の抗マウス IgE 抗体はマウス IgE のみに反応を示した。以上より、原因解明には至っていないが、サンドイッチ ELISA の固層化に用いたキャプチャー抗体には問題がないと推測された。新たに免疫したマウスを準備しているが、同様にサンドイッチ ELISA アッセイ系を用いてスクリーニングした場合、再びマウス IgM クローンを IgE クローンとして樹立してしまう可能性がある。そこで現在、入手可能な OVA 特異的マウス IgE 抗体を用いて ELISA アッセイ系の再構築を行っている。

今後の研究活動について

本研究では食物アレルギーを発現する細胞株をマウスに過剰免疫することで、食物アレルギー特

異的な IgE 抗体を作製する新規モノクローナル抗体作製法を開発することを目指した。

現段階では OVA 発現細胞株をマウスに免疫することで、OVA 特異的なモノクローナル抗体の樹立に成功している。しかしながら、当初の目的としていた OVA 特異的な IgE 抗体の樹立には至っておらず、以下のような研究を推進することが必要であると考えられる。

(1) 免疫回数・投与期間を見直すことで、どのようなプロトコルが最も効率良く IgE 産生クローンを得ることができるのか最適化を行う。(2) フローサイトメトリーを用いたアッセイ系を再構築するための細胞株を樹立する。具体的にはヒト免疫グロブリンの膜貫通領域と OVA との融合タンパク質を発現するベクターを作製し、細胞表面に発現する OVA を直接検出できるようなフローサイトメトリー解析系を構築する。(3) OVA 特異的な IgE 抗体を作製し、精製抗体を大量調整する。精製した IgE 抗体を野性型マウスに投与し、食物アレルギーモデルマウス作製する。これによりどのような投与経路、投与量により生体に有害なアナフィラキシー症状が観察されるのかを明らかにする。今後、以上のような検証を重ね本法がより改善されることで、簡便かつ効率的に食物アレルギー特異的なモノクローナル抗体作製法が作製されることが望まれる。

参考文献

- 1) Diebold SS, Cotten M, Koch N, Zenke M. MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells. *Gene Ther.*2001Mar;8(6):487-93.

以上