

ニッポンハム食の未来財団 平成 30 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	新規脱顆粒インディケーターを用いたアレルギー検出システムの構築とその応用
フリガナ	ヨシカワ ソウイチロウ
代表者名	吉川 宗一郎
所属機関 (機関名) (役職名)	東京医科歯科大学医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	1.*Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Hashimoto, R., Nagao, T., Peters, L., Egawa M., Ohta, T., Miyake, K., Adachi, T., Kawano, Y., Yamanishi, Y., and Karasuyama, H.: Pivotal role of STIM2 but not STIM1 in IL-4 production by IL-3-stimulated murine basophils. <i>Sci. Signal.</i> 12, 576, 2019. (*:corresponding author) 2.Tabakawa, Y., Ohta, T., *Yoshikawa S., Robinson, EJ., Yamaji, K., Ishiwata, K., Kawano, Y., Miyake, K., Yamanishi, Y., Ohtsu, H., Adachi, T., Watanabe, N., Kanuka, H., and Karasuyama, H.: Histamine released from skin-infiltrating basophils but not mast cells is crucial for acquired tick resistance in mice. <i>Front. Immunol.</i> 3:9:1540, 2018.(*:corresponding author)

### 研究結果要約

近年我が国では、アレルギーを有する患者が年々増加しており、その予防と対策が急がれている。アレルギーには、イムノグロブリン E (IgE) とアレルギーによってマスト細胞が活性化することで引き起こされる、「脱顆粒」という免疫現象が深く関わっているが、正確で簡便にアレルギーを検出でき、さらにはその脱顆粒を正確に評価することのできるツールはほとんど存在していなかった。さらに、生体内でマスト細胞の脱顆粒を検出する方法は皆無であったため、食物アレルギー発症モデルマウスなどにおいて、生体内のマスト細胞がアレルギー摂取後に、こういったタイミングでこのマスト細胞が脱顆粒しているのかをリアルタイムで検出することは困難であった。近年我々は、マスト細胞の脱顆粒を蛍光によって評価できるインディケータータンパク質、**impH** を開発した。本研究では **impH** を応用させることで、ヒトのマスト細胞の脱顆粒を評価することができるツールの開発を行なった。さらに、**impH** をマウス生体内のマスト細胞に発現させることで、食物アレルギー一時のマスト細胞の脱顆粒の様子を生体イメージングで観察することにも成功した。本研究で完成させたツールは、アレルギー検出や抗アレルギー薬のスクリーニングを簡便で安価に行うことができる、画期的なツールであると考えられる。

## 研究目的

近年我が国において、何らかのアレルギーを有する患者は3人に1人の割合となっており、その数は年々増加している。中でも食物アレルギーは、重篤な全身症状を呈するアナフィラキシーショックを引き起こすことが知られており、その予防と対策が急がれている。

食物アレルギーには、イムノグロブリン E (IgE) とアレルゲンによってマスト細胞が活性化することで引き起こされる、「脱顆粒」という免疫現象が深く関わっていることが知られている。これまで、マスト細胞の脱顆粒現象は、マスト細胞のカルシウムシグナルなどの量的変化、CD203c などの活性化マーカーの発現の変化、電子顕微鏡によるマスト細胞の形態学的変化、または、顆粒中に存在する物質を定量する方法で評価されてきた。しかし、これら従来の方法は、手技が非常に煩雑、または、時間がかかることや、必ずしも正確に脱顆粒を反映していない、試薬や解析機器が高価である、などといった課題があり、正確で簡便に評価方法は存在しなかった。さらに、生体内でマスト細胞の脱顆粒を評価する方法は皆無であったため、食物アレルギー発症モデルマウスなどにおいて、生体内のマスト細胞がアレルゲン摂取後に、こういったタイミングでどのマスト細胞が脱顆粒しているのかをリアルタイムで検出することは困難であった。

最近、当研究室では、マスト細胞が脱顆粒すると顆粒が光る新規脱顆粒インディケーター(イムノフルオリン: impH) を世界に先駆けて開発<sup>1)</sup>した。これは、マスト細胞の脱顆粒関連膜タンパク質 (VAMP8) に pH 感受性緑色蛍光タンパク質 (pHluorin) を融合させた人工遺伝子で、マスト細胞の脱顆粒を *in vitro*, *in vivo* 共に正確に検出する。本研究では、この impH を応用させることで、簡便で正確なアレルゲンの検出システムを構築することを目指す。加えて、食物アレルギーモデルにおける生体内でのマスト細胞の活性化の様子を生体イメージング法で解析し、アレルゲンとマスト細胞がどのタイミングでどのように活性化するのかを時空間的に解析し、新規治療法や診断に役立つ知見を得ることを目的とする。

## 研究計画及び研究手法

### 【impH 発現ヒトマスト細胞株の樹立とこれを用いたアレルゲン検出システムの開発】

アレルゲンを検出するための impH 高発現マスト細胞株の樹立を行なった。ラットマスト細胞株 RBL-2H3、または、ヒトマスト細胞株 LUVA (Kerafast 社から購入。LAD2 は入手困難であったため、細胞株を変更した) にレンチウイルスを用いて impH-IRES2-DsRed2 を遺伝子導入した。ウイルス感染は2度行い、FACS Aria で DsRed2 高発現細胞を単離することで impH 高発現細胞株を樹立させた。

樹立した impH 高発現 RBL-2H3、LUVA (以降それぞれ impH-RBL-2H3, impH-LUVA とする)

が脱顆粒刺激によって impH の蛍光を検出できるかを確かめるため、共焦点顕微鏡 (Nikon A1R) または蛍光プレートリーダー (TECAN Infinite F500) にてその検出を行なった。共焦点顕微鏡解析では、collagen をコートしたガラスボトムディッシュに、事前に IgE で一晩感作させた impH-RBL-2H3, impH-LUVA を接着 (37°C で 10 分接着させる) させ、37°C で保温したチャンバー内で培養しながら共焦点顕微鏡のデータを取得した。データ取得開始から 2 分後にアレルゲンを添加し、30 分観察を行なった。蛍光プレートリーダーでの解析では、コラーゲンをコートしたガラスボトム 96-well plate に impH-RBL-2H3, impH-LUVA を均一に播種し、IgE で一晩感作させた。翌日培地交換を行い、37°C に保温した TECAN Infinite F500 で impH の蛍光を解析した。途中アレルゲンを添加し、60 分間蛍光を観察した。この実験では、実験開始 30 分前に脱顆粒を抑制する薬剤 (Nocodazole) を添加しておき、アレルゲン添加によって生じる impH の蛍光増加が抑制されるかも検討した。

最後に、アレルゲン検出システムが上手くできているかを検討するため、後述する食物アレルギー発症モデルマウスの血清を impH-RBL-2H3 に感作させ、アレルゲンを添加した時の impH 蛍光強度の変化をモニターした。これらの実験には、前述の蛍光プレートリーダー解析と同様の方法で行った。最終的に、ヒトのアレルギー患者血清を impH-LUVA に感作させ、アレルゲンを添加した際の impH の変化もモニターしたかったが、RBL-2H3 での血清を用いた条件検討が完全に終わらなかったことや、血清の入手が困難であったため、本研究では行うことができなかった。

#### 【食物アレルギー発症マウスにおける impH 発現マスト細胞の脱顆粒解析】

食物アレルギーマウスにおける生体内のマスト細胞の脱顆粒現象を解析し、アレルゲンとマスト細胞の脱顆粒が食物アレルギーの病態にどのように寄与するかを観察した。野生型マウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) に impH-IRES-DsRed2 をレトロウイルスで遺伝子導入し、impH 高発現 BMMC (WT impH-BMMC) を作製した。この BMMC をマスト細胞欠損マウス (KitW-sh/W-sh) へ  $2 \times 10^6$  cells ずつ静脈注射で移植した。また、ネガティブコントロールとして、IgE 受容体欠損マウス (Fcer1g<sup>-/-</sup>) から作製した BMMC にも impH を遺伝子導入し (FcRKO-impH-BMMC)、野生型と同様にして KitW-sh/W-sh へ移植した。2 ヶ月後、一般的な食物アレルギーモデルマウスの手法<sup>2)</sup>を参考にし、マスト細胞を移植した KitW-sh/W-sh に Alum を混合したアレルゲンで免疫を 4 度行い、1 ヶ月後にアレルゲンの投与を一週間毎日行うことで食物アレルギーを誘導した。厳密には、50 $\mu$ g の TNP30-OVA に 100 $\mu$ l の Alum を混合し、これを一週間に一度、計 4 回腹腔内投与し、最後の免疫から一週間後に 500 $\mu$ g の TNP-BSA を一週間の間に毎日経口投与した。最後の経口投与後、4 時間後に麻酔をかけ、共焦点顕微鏡で腸管内マスト細胞の生体イメージングを行った。腸管内のイメージングは以前に申請者が行った手法を用いて行った<sup>3)</sup>。同時に、脱顆粒抑制剤 (インタール) をマウスに投与して、生体内マスト細胞の impH の蛍光抑制が観察できるかも試みた。

## 結果と考察

### 【impH 発現ヒトマスト細胞株の樹立とこれを用いたアレルギー検出システムの開発】

impH 高発現マスト細胞株を樹立するために、レンチウイルスベクターCSII-EF-impH-IRES2-DsRed2 を作製し、ウイルス粒子を Lenti-X で濃縮後、RBL-2H3 または LUVA に遺伝子導入を 2 回行なった。最後の遺伝子導入から一週間後に FACS Aria を用いて impH 高発現株を分離し、impH-RBL-2H3 と impH-LUVA を樹立させた。マスト細胞株をクローン化することで脱顆粒能の弱いものが選別されてきてしまう恐れがあったため、□ヘキソサミニダーゼ解析によって脱顆粒能が保たれているかを検討したところ、イオノマイシンで刺激した時の条件では、impH 高発現株と遺伝子導入前の細胞株の間に差異は認められなかった。

次に、impH-RBL-2H3 と impH-LUVA が脱顆粒刺激によって impH の蛍光を検出できるかを検討することにした。まず初めに、共焦点顕微鏡を用いてライブセルイメージングを行い、刺激後に impH の蛍光が観察されるかを観察した。IgE で一晩感作した impH-RBL-2H3 または impH-LUVA をガラスボトムディッシュに接着させ、37°C 培養下でアレルギー刺激を行ない、impH の蛍光強度の変化を顕微鏡で観察した。その結果、アレルギー添加後 5 分以内に両細胞株において impH の強い蛍光が観察された (図 1)。多検体のサンプルを簡便で迅速に定量できるようにするため、蛍光プレートリーダーを用いて impH の蛍光変化を検出できないかを検討することにした。impH-RBL-2H3 または impH-LUVA をガラスボトム 96 well plate に播種し、IgE とアレルギーで刺激して脱顆粒を誘導した。その結果、両細胞株ともにアレルギー投与後 20-40 分をピークとする impH の蛍光強度の増加が観察された。一方で、脱顆粒を抑制する薬剤である Nocodazol を事前に添加しておくことで、その impH の蛍光強度の変化が見られなくなることから、検出されるこの蛍光強度変化は脱顆粒によって生じる impH によるものであることが強く示唆された。

次に、impH 高発現細胞株を用いたアレルギー検出システムを確立させるため、食物アレルギーを発症するマウスから血清を採取し、これで感作した impH-RBL-2H3 にアレルギーを投与することで impH の蛍光強度に変化が見られるかを蛍光プレートリーダーで解析することにした。しかし、アレルギー発症マウスから採取した血清を段階的に希釈して impH-RBL-2H3 に感作させたものの impH のバックグラウンドが高くなってしまい、アレルギー投与後の impH の蛍光強度変化が見えにくくなってしまっていた (データ未掲載)。血清成分中に含まれる何らかの分子が impH-RBL-2H3 を刺激してしまい、アレルギーを投与する前に脱顆粒を誘導してしまっている可能性があるため、今後は条件検討や感作方法を改める必要があると思われる。

## 【食物アレルギー発症マウスにおける impH 発現マスト細胞の脱顆粒解析】

代表者名 吉川 宗一郎

次に、impH を用いて、食物アレルギー発症マウスの生体内マスト細胞の脱顆粒の様子を観察することにした。マスト細胞特異的に impH を発現するマウスを作製するため、KitW-sh/W-sh に impH を発現する BMMC を移植した。impH-LUVA と同様、DsRed2 を発現しているため、このマウスは脱顆粒をしていない生体内マスト細胞の局在も観察することができる。アレルゲン (TNP-OVA) と Alum で 4 回免疫し、1 ヶ月後に TNP-BSA のアレルゲンを経口投与すると、マスト細胞依存的な食物アレルギーを発症する 2)。実際、WT impH-BMMC を移植した群では最後の TNP-BSA 投与後 1 時間以内にほとんどのマウスが下痢を発症したが、FcRKO impH-BMMC を移植した群では 1 匹も下痢が観察されなかった。

生体内イメージングでマスト細胞の impH を観察したところ、WT impH-BMMC を移植した群では、アレルゲンの経口投与後 1 時間で大腸の血管付近のマスト細胞で impH の蛍光が多数観察されたが、FcRKO impH-BMMC を移植した群では impH の蛍光がほとんど見られなかった (図 4B)。次に、マスト細胞の脱顆粒を阻害する薬剤として知られるインタールをマウスに投与し、この impH の蛍光がどのように変化するか、どこのマスト細胞の impH が消失するかを観察することにした。しかし、インタール投与群において下痢の発症を抑えることができず、impH の蛍光強度変化にも大きな変化が見られなかった (データ未掲載)。今後、投与条件の改良、または他の薬剤でも検討していく必要がある。

今回の結果から、アレルゲンは経口投与しているにも関わらず、大腸では impH を発する脱顆粒したマスト細胞は血管周辺に多く観察されるという意外な結果が得られた。アレルゲンは大腸の粘膜層から侵入するよりも、大腸に到達する前に何らかのメカニズムで血管へと侵入し、血流に乗ることでその周辺のマスト細胞を活性化させているのかもしれない。今後も impH を用いて、より詳細に解析していく予定である。

本研究により、impH 高発現マスト細胞株の樹立に成功し、アレルゲン検出システム確立の目前まで到達することができた。また、食物アレルギーのモデルマウスにおいても、impH によってマスト細胞の脱顆粒現象を十分に観察することができるとわかった。一部、当初の計画で見込んでいた実験がうまくいかないこともあったが、概ね計画通りに期待された以上の結果を得ることができた。

### <残された課題と今後の予定>

前述の通り、マスト細胞の脱顆粒を見るこれまでの一般的な方法は、試薬や機材にコストがかかるだけでなく、手技の煩雑さや長い計測時間に問題があり、膨大な数のサンプルを短期間で正確に

解析する必要がある抗アレルギー薬の開発スクリーニングには、必ずしも向いているとは言えなかった。本研究において、ヒトマスト細胞株 LUVa に **impH** を高発現するトランスフェクタントを樹立することができ、さらに蛍光プレートリーダーで脱顆粒をモニターすることに成功できた。このツールを用いた解析は、細胞を増やしてプレートに撒くだけであり、計測も非常に簡便で短期間に行えることから、スクリーニングにかかる様々な問題をクリアできるものと期待される。一方で、血清を用いたアレルギー検出手法として **impH** トランスフェクタントを用いるにはもう少し改良、もしくは条件検討が必要かもしれない。引き続き検討を行い、新しいメソロジーとして論文発表したいと考えている。

また、生体イメージングの検討では、**impH** を用いることでアレルギー発症時のアレルギーの到達経路を解明できる可能性が示された。今後も解析を行い、アレルギー発症メカニズムの解明を目指した論文投稿を目指す予定である。また、この手法をうまく用いることができれば、抗アレルギー薬の投与を行うことで、**impH** の蛍光がどう変化するかを指標として、薬物の有効な投与経路、ならびに浸透部位などを検討するような、薬物動態解析などにも応用できないかを検討していきたい。

#### 今後の研究活動について

脱顆粒を生体内で観察することのできる優れたインディケーターは未だ存在しない。また、脱顆粒現象はマスト細胞だけでなく、好塩基球や他の免疫細胞でも見られる現象である。各種アレルギーやアナフィラキシーショックにはマスト細胞以外の免疫細胞も関わっていることが知られており、今後はこのような細胞においても生体内イメージングで検討する必要がある。他の免疫細胞の脱顆粒現象を生体内で観察できるように、現在 **impH-floxed** マウス (Cre を発現する細胞特異的に **impH** を発現するマウス) を共同研究者と作成中である。今後は他の免疫細胞においても同様に、アレルギー発症モデルで脱顆粒がどうなっているのかを検討していきたい。

また、前述の通り、アレルギー検出システムには用いるサンプルによって解析できないものがあるため、検出感度を上げる、またはアレルギー非特異的な脱顆粒を抑えるような改良を加えることで、さらにより良いものへと完成させていきたい。

#### 参考文献

- 1) Horiguchi K, Yoshikawa S, Saito A, Haddad S, Ohta T, Miyake K, Yamanishi Y, Karasuyama H. Real-time imaging of mast cell degranulation in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016 Oct;479(3):517-22.
- 2) Wang M, Takeda K, Shiraishi Y, Okamoto M, Dakhama A, Joetham A, Gelfand WE. Peanut-induced intestinal allergy is mediated through a mast cell-IgE-FcεRI-IL-13 pathway. *J*

Allergy Clin Immunol. 2010 Aug;126(2):306-16.

- 3) Yoshikawa S, Usami T, Kikuta J, Ishii M, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T. et al. Intravital imaging of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in lymphocytes of  $\text{Ca}^{2+}$  biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. Sci. Rep. 2016 6;6:18738.

以上