

<平成24年度助成>

食物アレルギーを誘導するアレルゲンを スクリーニングする新規ツールの開発

吉川 宗一郎

(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)

緒言

食物の摂取は人間が生きて行くために必要不可欠なものであるが、個人によっては特定の食品を口にすることで重篤なアレルギー反応を引き起こしてしまうことがあり、その患者は年々増加傾向にある。食の安全・安心が求められる昨今、このようなアレルギー症状を呈する可能性をもつ品目を検査することは、食品・製薬メーカーにとって重要な管理項目のひとつとなっている。しかし、こうした状況にもかかわらず、既知のアレルゲンが食品等に含まれているかをチェックする手法は大きく発展しているが、新たに開発された食品・添加物・薬品がアレルゲンになりうるかどうかを検査する方法は、特殊な機械を必要とするものや、検査手技が煩雑なものが多く、開発があまり進んでいない。

これまでの研究から、食物アレルギーを引き起こす原因細胞としてマスト細胞が知られており、多くの場合はこの細胞がアレルゲンによって脱顆粒することで発症するといわれている^{1,2)}。最近われわれは、免疫細胞が脱顆粒した時に初めて光る、蛍光タンパク質(脱顆粒インディケーター:以下、イムノフルオリン)の開発に成功した。これをマスト細胞に応用すれば、検体によって脱顆粒が誘発されるとすぐに蛍光を発することが期待される。

そこで本研究では、独自に開発した脱顆粒インディケーターが、食品や薬物がアレルゲンになりうるかを簡易にスクリーニングする手法として用いることができないかを検討した。

材料と方法

レンチウイルスベクターの作製とフルオリン導入細胞(RBL-2H3-pH)の樹立

レンチウイルスベクターである、CSII-EF-MCS-IRES2-Venus(理研の三好浩之先生より供与)を鋳型として、マルチクローニングサイトにイムノフルオリンを挿入し、VenusをDsRedに置換したベクターを作製した。このベクターと共に、パッケージング遺伝子であるgag polベクター、vsvgベクターを、PEI Maxを用いて293T細胞にトランスフェクションし、培養2日後にウイルス液を回収した。回収したウイルス液はLenti-Xを用いて100倍に濃縮し、24-wellプレートで細胞数 1.0×10^6 cells/well、ポリブレン最終濃度 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、ウイルス液50%の条件で感染させた。遺伝子導入した細胞は、FACSAriaを用いてフルオリン高発現細胞株(DsRed^{Hi})を単離し、これを培養したものをRBL-2H3-pHとした。

RBL-2H3-pH細胞の培養

ラット好塩基様白血病細胞(RBL-2H3)、またはイムノフルオリン高発現細胞株(RBL-2H3-pH)は、RPMI1640に、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン・ストレプトマイシン、MEM非必須アミノ酸(ナカライテスク)、2-メルカプトエタノール、ウシ胎児血清(GIBCO)を加えた培地で培養した。

共焦点顕微鏡によるフルオリンの検出

フルオリンの検出は励起光488nm(500-525nmのフィルター)、DsRedの検出は励起光561nm

(570-620 nm のフィルター) で観察を行った。観察を行う前日に、細胞をカバーガラスが底面に張り付いた dish に張り付け、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアレルゲン特異的 IgE (TNP-IgE) で感作した。顕微鏡で観察しながら、アレルゲン (TNP-OVA: 最終濃度 $300 \text{ ng}/\text{mL}$) またはコントロールタンパク質 (OVA: 最終濃度 $300 \text{ ng}/\text{mL}$) を加え、pHluorin の蛍光強度の変化を観察した。脱顆粒インヒビターとして使用した PI3 Kinase 阻害剤 (LY294002) は、アレルゲン刺激の1時間前から最終濃度が $50 \mu\text{M}$ となるように添加した。フルオリン発現マウス由来の細胞解析では、BD Cell-Tak™ を用いて細胞を強制的にガラスボトムディッシュへ貼り付け、観察した。

蛍光プレートリーダーによるフルオリンの検出

96穴プレートに RBL-2H3-pH を $5 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ で播種し、アレルゲン特異的 IgE を事前感作させる。その後、Tyrode's Buffer (140 mM NaCl , 5.4 mM KCl , 0.5 mM MgCl_2 , $0.3 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 5 mM HEPES , 5.5 mM glucose , 2 mM CaCl_2 , pH 7.4 に調節) に培地を置換し、TECAN インフィニット M200 PRO にて 37°C でフルオリンの蛍光を検出した。アレルゲンの添加は機械を一時停止させ、手動で添加を行い、その後引き続きフルオリンの蛍光をモニターした。解析は全て triplicate で行った。

フルオリン発現マウスの作製

サイトメガロウイルス由来プロモーター (CMV) の下流に LoxP でネオマイシン耐性遺伝子を挟んだ DNA を組み込み、さらにその下流にイムノフルオリンを配置するようなトランスジーンを作製した。このトランスジーンを C57BL/6j の受精卵にマイクロインジェクションし、ファウンダーマウス雄 4 匹、雌 6 匹を得た。Germline transmission が見られたイムノフルオリン発現マウスと Mcpt8-Cre マウス (当研究室で樹立・未発表) を交配させ、好塩基球特異的イムノフルオリン発現マウスを作製した。このマウスの末梢血を採取し、赤血球除去後、フローサイトメトリーにてフルオリンの発現を解析した。

免疫染色

フルオリンを発現する細胞をスライドガラスに載せ、4% パラホルムアルデヒドによって固定した後、抗セロトニン抗体と Hoechst33342 でセロトニンと核をそれぞれ染色した。その後、細胞を共焦点顕微鏡で観察した。

結 果

実験 1 イムノフルオリンのマスト細胞への応用

免疫細胞では、分泌顆粒内の pH = 5 以下に保たれており、細胞外の pH (pH=7 付近) に比べ、酸性になっていることが知られている。しかし、免疫細胞が脱顆粒することによって顆粒が細胞膜と融合することで、顆粒内の pH が細胞外と同じ中性になることがわかっている。この現象を利用することで、当研究室では、pH 高感受性蛍光タンパク質であるフルオリンを用いて、免疫細胞の脱顆粒インディケーター (イムノフルオリン) の開発に成功した。

フルオリン³⁾とは、pH が低いときは蛍光を発しないが、pH が中性付近では強い蛍光を呈する GFP 変異体のことである。われわれは、このフルオリンを免疫細胞の顆粒内に発現する膜タンパク質と融合させ、イムノフルオリンを作製した (図 1)。これまでの研究結果から、イムノフルオリンを強制発現させた免疫細胞に脱顆粒を誘導すると、顆粒の放出とともに強い蛍光を発することが分かっている。そこではじめに、イムノフルオリンをマスト細胞に発現させ、脱顆粒を誘導することでイムノフルオリンの蛍光を検出することが可能かを検討した。

アレルゲンのスクリーニングに用いる細胞として、一般的にマスト細胞の代替細胞株として用いられる、ラット好塩基様白血病細胞 (RBL-2H3) を使用した。レンチウイルスベクターにイムノフルオリンを組み込み、RBL-2H3 細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入を行った RBL-2H3 細胞は、

セルソーターを用いてイムノフルオリンを高発現する集団のみを単離し、イムノフルオリン高発現株(以下、RBL-2H3-pH)を樹立した(図2)。

次に、RBL-2H3-pHに脱顆粒を誘導するとイムノフルオリンが検出されるかを検討するため、脱顆粒後のフルオリン蛍光強度の変化を共焦点顕微鏡を用いて解析した。アレルゲン特異的IgEで感作したRBL-2H3-pHにアレルゲンを添加し脱顆粒を誘導したところ、刺激後30-50分にピークとなる強いフルオリンの蛍光強度の変化が観察された(図3)。また、脱顆粒した細胞を立体イメージ

により解析したところ、このフルオリンの蛍光は主に細胞膜表面で検出されていることが判明した(図3)。さらに、RBL-2H3-pHに導入されているイムノフルオリンは、マスト細胞の顆粒内に存在する分子(セロトニン)と共局在することが確認された(図4)。これにより、RBL-2H3-pHに脱顆粒を誘導したときの蛍光は、顆粒に局在するフルオリンが細胞外に放出されたことを反映していることが推察された。

以上のことから、アレルゲンによるマスト細胞の脱顆粒を蛍光の変化により検出することができる、

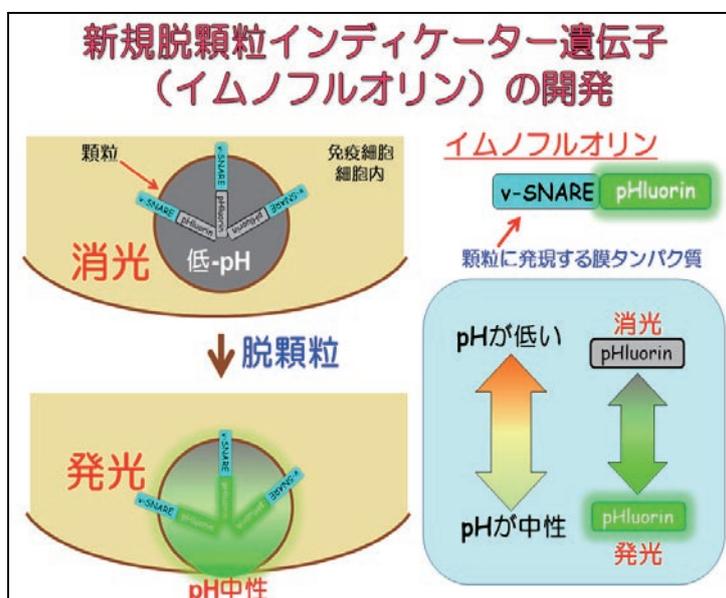


図1 イムノフルオリンの詳細

イムノフルオリンとは、マスト細胞の顆粒内に発現するとある膜タンパク質(v-SNARE)にフルオリン(pHluorin)を融合させた人工遺伝子。イムノフルオリンは、定常状態ではほとんど蛍光を発さないが、脱顆粒により下流が細胞外に放出されると、強い蛍光を発するようになる。

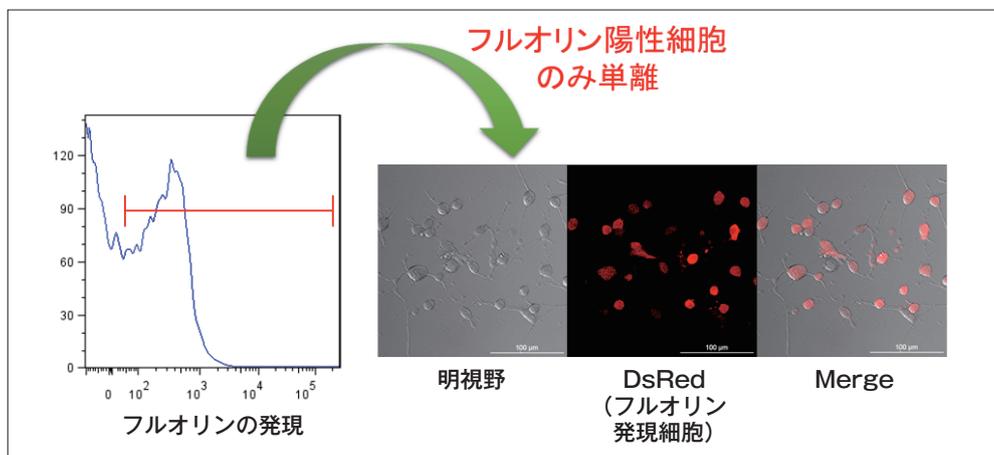


図2 RBL-2H3-pH細胞の樹立

RBL-2H3細胞をレンチウイルスベクターにてイムノフルオリンを遺伝子導入し、セルソーターでイムノフルオリン陽性(DsRed陽性)集団を単離した。

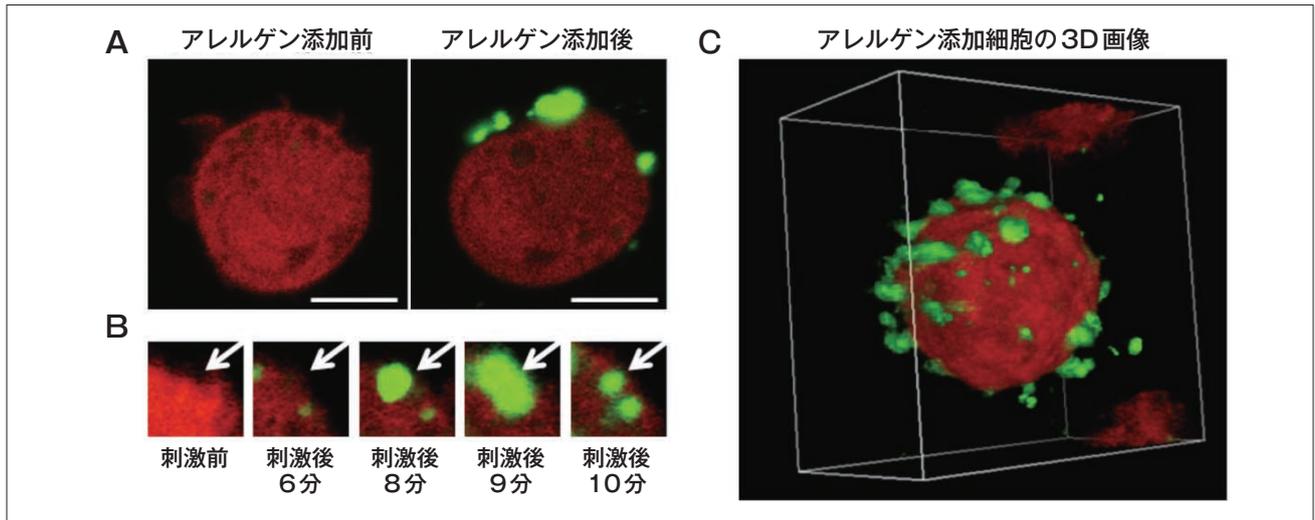


図3 イムノフルオリンはRBL-2H3-pHの脱顆粒に伴ってフルオリンの蛍光を発する

- A. アレルゲン添加前と後(添加後10分)のRBL-2H3-pHの水平断面画像。緑色はフルオリンの蛍光を示す。
 B. フルオリン蛍光の時間変化を示す。
 C. アレルゲン添加細胞の3D画像。

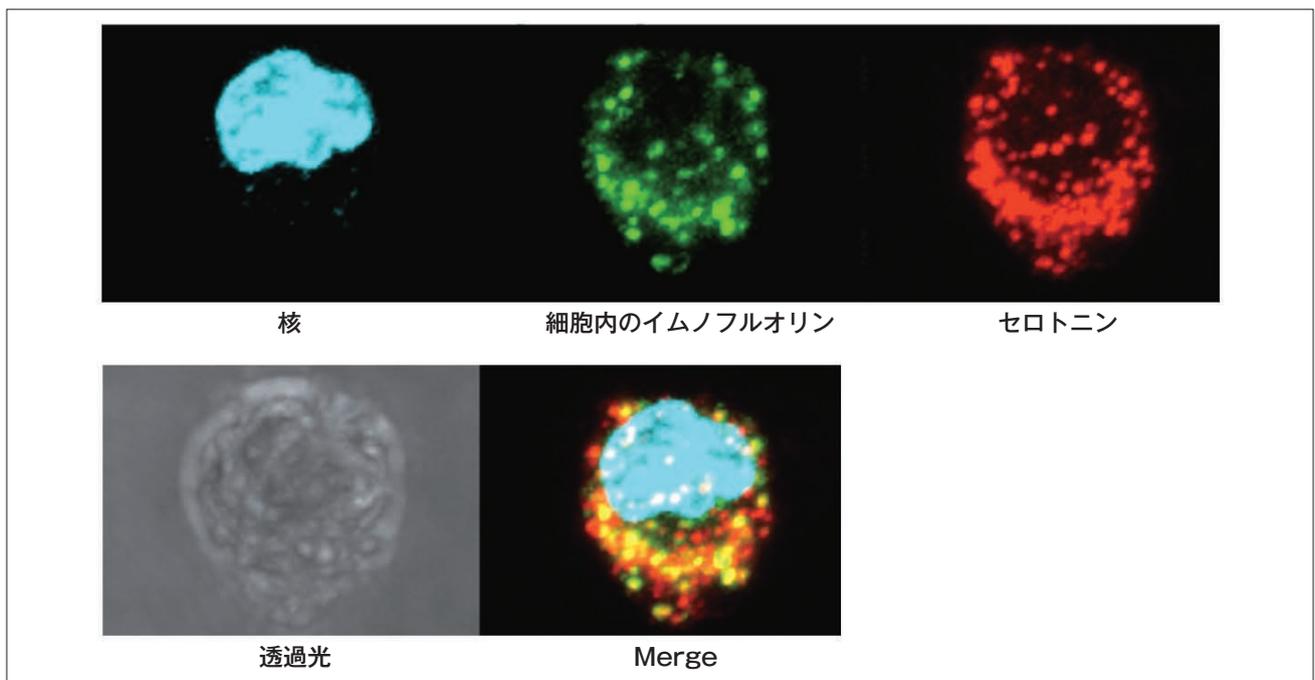


図4 脱顆粒前のイムノフルオリンはセロトニンと共局在している

RBL-2H3-pH細胞を固定し、免疫染色によりイムノフルオリン、セロトニン(抗セロトニン抗体)、核を染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。

マスト細胞株RBL-2H3-pHの樹立に成功した。

実験2 多検体解析に適した簡易スクリーニング方法の開発

食品または製薬メーカーにおいて脱顆粒の解析を行う場合、多検体を取り扱うケースが多く、煩雑で時間のかかるスクリーニング手法は嫌煙される。したがって、RBL-2H3-pHを用いることで、簡易・

安価で、特殊な機械を必要としない、高感度なスクリーニング方法を考案することにした。

今回考案したスクリーニング方法は、蛍光プレートリーダーを用いてフルオリンを検出する方法である。RBL-2H3-pHを96穴プレートに播種し、アレルゲン特異的IgEで感作した後にアレルゲン添加前と後のフルオリンの蛍光強度の変化を蛍光プ

レートリーダーで解析した。その結果、アレルゲン投与後に30-50分をピークとするイムノフルオリンの蛍光強度の増加が観察された。一方でコントロールタンパク質を投与した細胞では蛍光の変化がほとんど見られなかった(図5)。以上の結果から、イムノフルオリンを用いた脱顆粒の検出が蛍光マイクロプレートリーダーを用いて行うことができた。

さらに、本スクリーニング手法が、栄養機能補助食品や新規アレルギー治療薬の脱顆粒抑制効果を解析する際に応用できるかを検討するため、脱

顆粒を誘導したRBL-2H3-pHに脱顆粒インヒビターを添加し、この抑制効果の検出を本スクリーニングで行った。その結果、脱顆粒インヒビター(PI3 Kinase阻害剤)を添加した細胞では、コントロール試薬添加細胞と比べ、フルオリンの蛍光強度が減弱している様子を捉えることができた(図6)。以上の結果から、本スクリーニング手法は、マスト細胞の脱顆粒抑制効果を検討する方法としても応用できることが分かった。

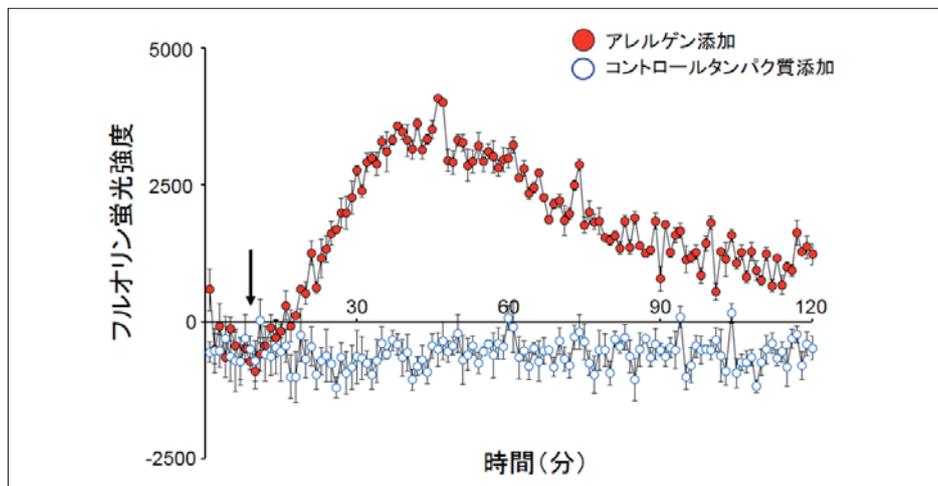


図5 蛍光プレートリーダーを用いたフルオリン蛍光強度変化の計測

RBL-2H3-pHを96穴プレートに播種し、IgEで感作した後に一晚培養した。培地を tyrode's bufferに置換し、アレルゲン・コントロールタンパク質添加前後のフルオリン蛍光強度の変化を測定した。赤丸グラフはアレルゲンを添加したサンプル、白丸グラフはコントロールタンパク質を添加したサンプルを示す。アレルゲン、コントロールタンパク質添加のタイミングは、矢印で示す。

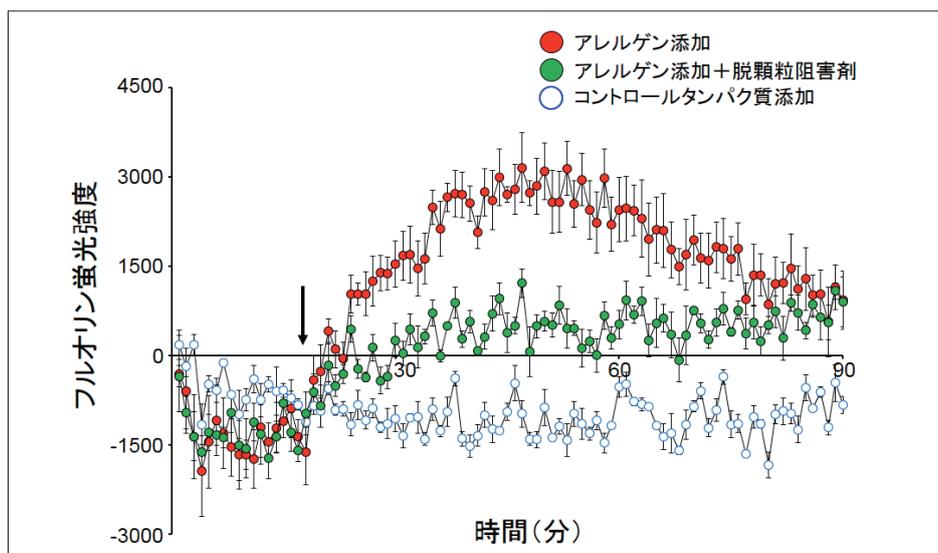


図6 イムノフルオリンは脱顆粒抑制効果のスクリーニングにも応用できる

図5と同様の方法で、アレルゲン添加後のフルオリン蛍光強度の変化を蛍光プレートリーダーで測定した。赤丸グラフはアレルゲン、緑丸グラフはアレルゲン+脱顆粒インヒビター添加、白丸はコントロールタンパク質を添加したサンプルを示す。アレルゲン、コントロールタンパク質添加のタイミングは、矢印で示す。

実験3 イムノフルオリン発現マウスの作製と解析

イムノフルオリンはタンパク質ベースの脱顆粒インディケーターであるため、遺伝子操作によって恒常的にこの遺伝子を発現するマウスを作製することは可能である。そこでわれわれは、Cre-LoxP システム⁴⁾を用いて、特定の細胞だけにイムノフルオリンを発現する遺伝子改変マウスを作製することを試みた。

サイトメガロウイルスプロモーター (CMV) の下流にLoxP配列で挟んだネオマイシン耐性遺伝子を配置し、さらにその下流にイムノフルオリンを

挿入したコンストラクトを作製した(図7)。このマウスは、トランスジーンを持ったマウスであっても、通常ではプロモーター下流のネオマイシン耐性遺伝子が代わりに発現することによってイムノフルオリンが発現することは無いが、Creリコンビナーゼが発現する状況になると、LoxPによって挟まれたネオマイシン耐性遺伝子がCreによって除かれ、イムノフルオリンが発現するようになる。当研究室で保有している、好塩基球特異的 Cre 発現マウスと交配させたところ、フローサイトメトリー解析にて弱いながらもフルオリンの発現を確認することができた(図8)。この結果から、フルオリン

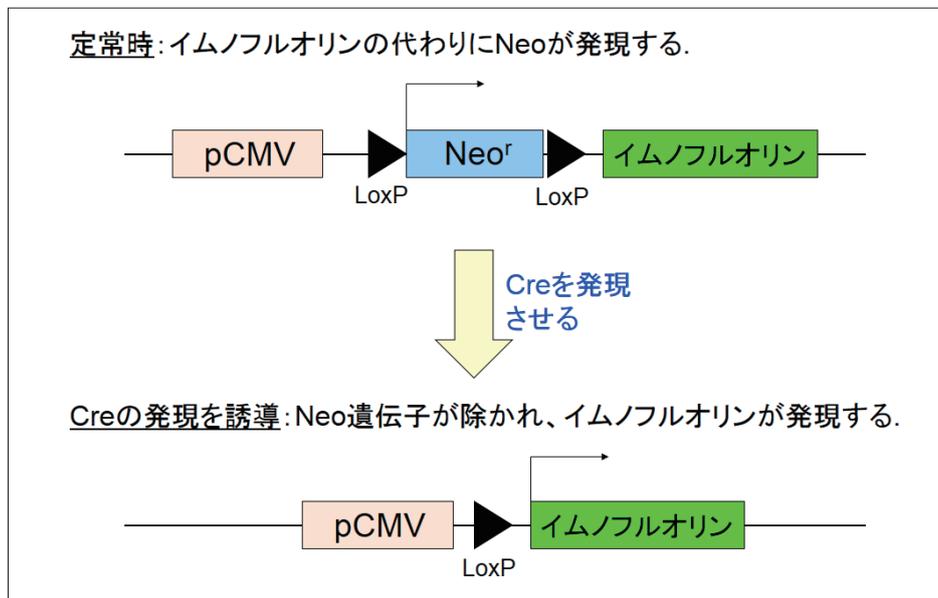


図7 イムノフルオリン発現マウスのトランスジーン
マウス作製に用いたトランスジーンの様式図。pCMVはサイトメガロウイルス由来プロモーター、Neorはネオマイシン耐性遺伝子を示す。

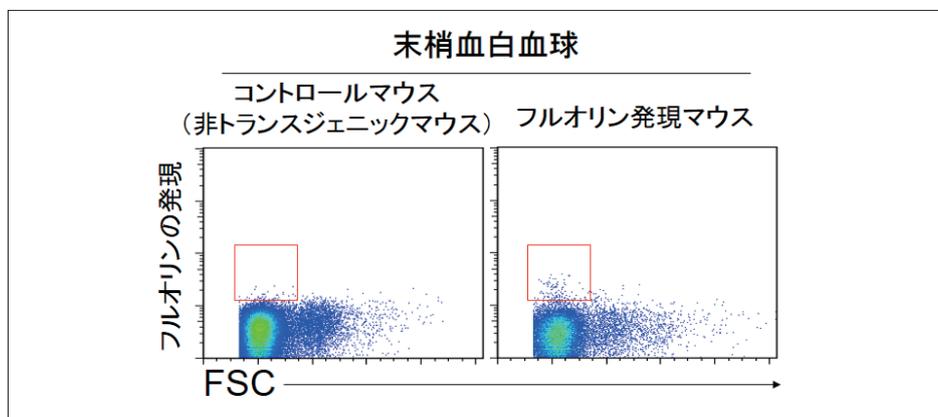


図8 イムノフルオリン発現マウスの解析
イムノフルオリン発現マウスに好塩基球特異的にCreを発現させたマウスの末梢血を回収し、赤血球除去後、フローサイトメトリーにてフルオリンの発現を解析した。末梢血白血球中の好塩基球にフルオリンが発現していた。

発現マウスの作製に成功した。しかし、現在のところ、得られた10匹のファウンダーマウスのうち、1系統しか解析できていない。今後、フルオリンが高発現する系統を得ることができれば、生体内でのアレルギー関連細胞の脱顆粒を可視化することができ、マウスに投与したアレルギー抑制食品、または薬品などが効果的に脱顆粒を抑制しているかを、個体レベルで解析できるものと期待される。

考 察

これまで、脱顆粒の検出手法は大きく分けて、脱顆粒時に放出される物質を定量する方法と、脱顆粒した細胞そのものを解析する方法の2つが行われてきた。前者としては、脱顆粒の際に放出される β -ヘキソサミニダーゼなどの定量⁵⁾、後者としては、細胞内のカルシウム濃度上昇の検出⁶⁾や、膜電位の変化の検出⁷⁾などがある。もっとも一般的な手法である β -ヘキソサミニダーゼの定量は、細胞の調製、抗原の添加、培養上清・細胞の回収、基質との反応、など様々な実験ステップがあるだけで無く、反応時間も長いため、多検体を同時に解析するには煩雑であった。細胞内カルシウム濃度は非常に簡便で感度も高いが、細胞内カルシウムの上昇と脱顆粒は必ずしも一致しないことが懸念されていた。

今回開発したイムノフルオリンを用いた脱顆粒検出は、実験が非常に簡素化されており、RBL-2H3-pHを96穴プレートに播種しておけば、アレルゲン投与前後のフルオリンの蛍光を30分から1時間ほど検出するだけで結果が分かる。必要な機械は蛍光プレートリーダーのみで、多検体の解析にも対応できる。今後、さらなる改良を加えることで、これまでの脱顆粒検査手法に取って代わる、有用なスクリーニング法になると期待される。

結 論

われわれが独自に開発した脱顆粒インディケータをマスト細胞に応用することで、アレルゲンなどによるマスト細胞の脱顆粒を、蛍光強度の変化で捉えることが可能となった。また、今回考案した蛍光プレートリーダーを用いたスクリーニング法は、多検体も同時にかつ、簡易に検査できるツールであることも分かった。

謝 辞

本研究の遂行にあたって、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団、及び、その関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Eigenmann, P.A., *Mechanisms of food allergy*. Pediatric Allergy and Immunology, 2009. **20**(1): p.5-11.
- 2) Johnston, L.K., K.B. Chien, and P.J. Bryce, *The Immunology of Food Allergy*. The Journal of Immunology, 2014. **192**(6): p.2529-2534.
- 3) Miesenbock, G., D.A. De Angelis, and J.E. Rothman, *Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins*. Nature, 1998. **394**(6689): p.192-5.
- 4) Kos, C.H., *Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models*. Nutr Rev, 2004. **62**(6 Pt 1): p.243-6.
- 5) Mohr, F.C. and C. Fewtrell, *The relative contributions of extracellular and intracellular calcium to secretion from tumor mast cells. Multiple effects of the proton ionophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*. J Biol Chem, 1987. **262**(22): p.10638-43.
- 6) White, J.R., et al., *Direct demonstration of increased intracellular concentration of free calcium as measured by quin-2 in stimulated rat peritoneal mast cell*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(13): p.3978-82.
- 7) Romanin, C., et al., *Immunologically activated chloride channels involved in degranulation of rat mucosal mast cells*. Embo j, 1991. **10**(12): p.3603-8.

Establishment of a novel degranulation indicator for use in allergen screening

Soichiro Yoshikawa

Department of Immune Regulation

Tokyo Medical and Dental University Graduate School

Mast cells are one of the immune cells with many granules, and found in connective and mucosal tissues. They are known to be responsible for some allergies and anaphylaxis, and most of these reactions are induced by their degranulation. Degranulation involves cross-linking of mast-cell-bound Immunoglobulin E (IgE) antibodies with an allergen, leading to the release of inflammatory mediators. Therefore, for preventing allergic reactions it is important to inhibit degranulation of mast cells.

A food allergy is an adverse immune response triggered by a food allergen, and may cause dermatitis, gastrointestinal or respiratory distress, or even life-threatening anaphylaxis. Because degranulation of mast cells occurs mostly during the acute phase of these reactions, food manufacturers need to screen for potential allergens in their products. However, there are a lack of good tools to detect such allergens.

In order to readily detect the activation of mast cells, we developed a novel tool for visualizing their degranulation, called immuno-pHluorin (impH), in which a pH-sensitive fluorescent protein is fused with a vesicular membrane protein. Its fluorescence intensity is high at neutral, but not at lower pH. When expressed in mast cell line RBL-2H3, impH is localized in the secretory granules of the cells, and its fluorescence intensity is negligible, because pH is low in secretory granules. During the degranulation, secretory granules are fused to the plasma membrane, and therefore impH is exposed to a higher pH. Indeed, IgE/antigen-stimulation greatly increased the fluorescence intensity of impH in mast cells. Thus, impH is a powerful tool for visualizing degranulation of mast cells and can be applied to allergen screening.