

コレラ菌抽出物による IgE の不活化とアナフィラキシーの抑制

山崎 達也, 高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

Receptor-destroying enzyme (RDE) from *Vibrio cholerae* inactivates the function of IgE and reduces anaphylaxis

Tatsuya Yamazaki, Sachiko Akashi-Takamura

Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Aichi Medical University

Abstract

IgE is known to play a key role in allergy. Mast cells bind IgE via the Fc receptor, FcεRI, and secrete inflammatory mediators via the recognition of allergens bound with IgE. Therefore, IgE is a major target for therapeutic treatment. Previous reports have demonstrated that oligomannose on IgE could be a new target to inhibit allergen function. However, the specific enzyme that modulates IgE for allergy treatment is not yet known. Here, we found that commercial receptor destroying enzyme (RDE) from *Vibrio cholerae* culture fluid can specifically modulate IgE, not IgG, and inactivate the initiation of anaphylaxis. RDE-treated IgE was unable to find the binding site of bone marrow derived-mast cells (BMMCs), followed by a reduction in the release of histamine and cytokines. We also confirmed that RDE-treated IgE could not induce passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mouse ears. From these results, we consider that RDE modulates the structure of IgE, rendering it unable to cause allergy. To reveal the function of RDE, we focused on the relationship of the modulation and glycosylation of IgE using lectin microarray analysis. We found that RDE-treated IgE significantly reduced the binding to *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL) and *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). These results suggest that RDE specifically modulates branched glycans on IgE, which is then rendered unable to induce an allergic response. These findings could be used in the development of a new drug to inhibit the function of IgE.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 72~78, 2019

Key words : IgE, allergy, glycans, *Vibrio cholerae*

はじめに

リポポリサッカライド (LPS) などのバクテリア成分はさまざまな自然免疫応答を誘導する。これまでの多くの研究から、それらバクテリア成分がどのような免疫応答に影響を与えるのか明らかにされてきた。しかし一方で、いまだに機能が不明なバクテリア成分も多数存在する。われわれは以前の研究で、タンパク抗体ではなく抗体を発現する遺伝子を用いた新しい受動免疫法で、インフルエンザを治療できたことを報告した¹⁾。この研究の中で偶然にも、市販のコレラ菌抽出物 (Receptor destroying enzyme : RDE) が中和 IgE 抗体のウイルス抗原への結合能を消失させていることを見出した。気管支喘息やアナフィラキシー誘導において IgE は主要因の一つである。近年、抗体医薬を用いて IgE を不活化させ

ることが治療に効果的であることが報告されているが、効果が現れるまでに時間がかかることも問題となっている。ゆえに IgE をターゲットとしたあたらしい治療法の開発は重要であると考えられる。そこでわれわれは、RDE が IgE を不活化するメカニズムを解明し、RDE をアレルギー治療へ応用できないか検討することにした。その結果、IgE に付加している糖鎖が RDE の標的となっている可能性が示唆された。本稿では、われわれの研究²⁾を中心に、IgE の機能と糖鎖の関連性や、IgE の糖鎖を標的としたアレルギー治療の可能性について概説したい。

1. コレラ菌抽出物 Receptor destroying enzyme (RDE) とは

市販のコレラ菌抽出物 RDE は、インフルエンザウイルスに対する中和抗体価を測定する際に、非特異反応を

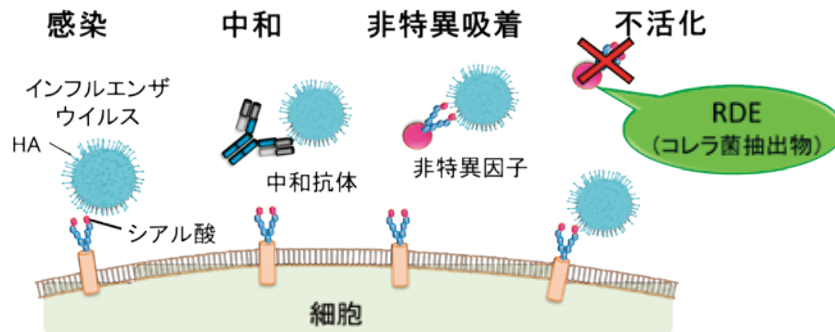


図 1 RDE によるウイルス非特異吸着因子の不活化

血清中のシアル酸が付加している非特異因子は、ウイルスへ非特異に吸着し、感染を阻害してしまう。これではワクチンなどで誘導された血清中の特異的抗体の中和能を測定することができない。そこで RDE で血清を処理することで、非特異因子を不活化することができる。

抑制するために古くから用いられている³⁾。インフルエンザウイルスは宿主が発現している糖鎖の一つであるシアル酸に結合して、細胞へ感染する。ワクチン投与などで血清に誘導されたウイルス特異的中和抗体価を測定する場合、その血清とウイルスを混合して細胞に添加する。血清中の抗体に中和能があれば感染を防御でき細胞は生存するが、中和能がなければ細胞はウイルスによって死滅する。しかし血清中に含まれるシアル酸は細胞へのウイルス感染を非特異的に阻害してしまう(図1)。そこでシアリダーゼ活性をもつ RDE であらかじめ血清を処理 (RDE と血清を混合して 37℃ で一晩反応させる) しておくことで、この非特異反応を抑えることができ、正確な中和抗体価を測定することができる⁴⁾。

われわれは新たなインフルエンザ治療法を検討するために、ウイルス抗原の一つであるヘマグルチニン (HA) に結合する IgG 抗体遺伝子もしくは IgE 抗体遺伝子を作製した¹⁾。両者の抗体遺伝子の構造は、可変領域は同一で定常領域だけが異なっている。それら抗体遺伝子を HEK293T 細胞へトランスフェクションし、培養上清に分泌された抗 HA-IgG もしくは抗 HA-IgE の中和能を調べるために、上清を RDE 処理して、ウイルスと混合した。すると、抗 HA-IgG は中和能を示したのに対し、予想外に、抗 HA-IgE では中和能を全く示さなかった¹⁾。そこでわれわれは RDE 処理によって IgE が不活化されたと予想し、詳細を調べることにした。

2. RDE による IgE 不活化メカニズムについて

2-1. RDE 処理した抗 HA-IgE は抗原結合能を消失する

作製した抗 HA-IgG と抗 HA-IgE の可変領域は同一であるが、それぞれを RDE 処理した場合、抗 HA-IgE のみ中和能が消失していた。そこで最初に、RDE 処理した抗 HA-IgG と抗 HA-IgE の抗原結合能を ELISA で解析した (図 2A)。まず抗 HA-IgG は RDE 処理の有無では

ほとんど抗原結合レベルに変化は認められなかった (図 2B)。しかし RDE 処理した抗 HA-IgE は、バックグラウンドレベルまで抗原結合能が低下していた。この結果より、RDE 処理によって、抗 HA-IgE は抗原への結合性を失い、その結果、ウイルス中和能が認められなかったことがわかった。また、両者は可変領域および L 鎖は共通しているため、IgE の定常領域 (ε 鎖) に RDE が何らかの作用をして、抗原結合能を低下させている可能性が示唆された。

2-2. RDE 処理は IgE の構造に影響する

IgE に対するこの RDE の作用は、IgE の構造に影響を及ぼしているのだろうか。それを確認するために、市販の精製抗体を RDE 処理してウェスタン・ブロッティング (W.B) で解析を行った。まず、精製 IgG では RDE の処理の有無によって、主要なバンド (150 kDa 付近) の大きな変化は認められなかった (図 3A lane1~8)。一方で、未処理の IgE のバンドの予想サイズは 190 kDa であったが、実際に検出されたバンドは 250 kDa 以上の大きなサイズであった (図 3A lane9~12)。これより IgE は糖鎖などの修飾を受けて、特殊な構造をしている可能性が示唆された。さらに RDE 処理によって、このバンドサイズは 150 kDa 付近まで大きく低下していた (図 3A lane13~16)。この低下したバンドに L 鎖は含まれるのだろうか、それとも H 鎖のみであろうか。そこで、同様の条件で精製 IgE を RDE で処理し、W.B の検出を HRP 標識した L 鎖結合タンパクで行った。すると、RDE 処理した IgE において、150 kDa 付近に同様のサイズのバンドが検出された (図 3B lane2)。この結果より、RDE 処理した IgE のバンドサイズは大きく低下するが、H 鎖と L 鎖は結合した状態であることがわかった。それでは RDE 処理で影響を受けるのは H 鎖と L 鎖のどちらであろうか。それを確認するために、RDE 処理した IgE を還元条件で W.B を行った。まず L 鎖では、RDE 処理あり

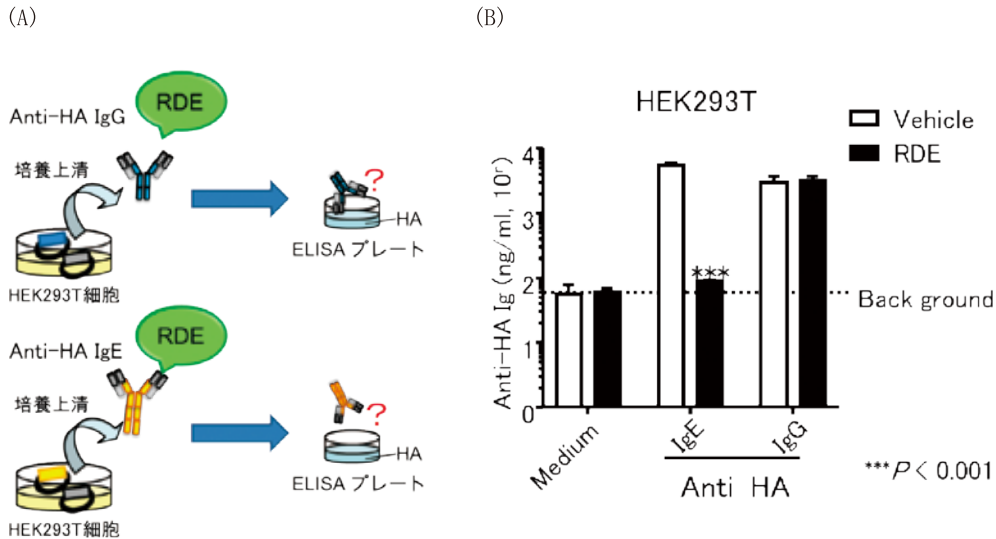


図 2 RDE 処理した抗 HA-IgE は抗原結合能を消失する

抗 HA-IgG および抗 HA-IgE 抗体遺伝子をトランスフェクションした HEK293T 細胞の上清を回収し、それぞれに RDE を添加して 37°C、6 時間インキュベーションした。その後、それぞれの抗原結合能を ELISA で測定した。(文献²⁾より引用)

なしで、IgG、IgE ともにバンドサイズに大きな変化は認められなかった (図 3C)。一方で、H 鎖では、RDE 処理によって IgE のバンドサイズの低下が認められた。よって、前述の予想通り、RDE は L 鎖ではなく、IgE の H 鎖 (ϵ 鎖) に作用していることがわかった。

2-3. IgE 不活化における RDE の作用機序～プロテアーゼ? シアリダーゼ? それ以外?

RDE にはコレラ菌由来のさまざまな成分が含まれていると考えられるが、シアリダーゼ活性の他にプロテアーゼ活性も有することが知られている⁴⁾。まず、IgE への RDE 作用が酵素反応であるか確認するために、RDE を熱処理してから IgE へ作用させた。すると 100°C で熱処理した場合に、IgE のバンドサイズの低下が認められなくなった (図 4A)。このことより、RDE の作用は酵素反応である可能性が示唆された。別の実験より、トリプシンも RDE と同様に IgE のバンドサイズを低下させることが確認された²⁾。これより、RDE の作用の中心もプロテアーゼではないかと予想し、プロテアーゼ阻害剤で RDE を処理して IgE への作用を抑制できるか確認を行った。まずコントロールとして用いたトリプシンでは、阻害剤によって IgE への作用が消失していた (図 4B lane5, 6)。一方で予想外にも、RDE の作用をプロテアーゼ阻害剤では抑制できなかった (図 4B lane3, 4)。別のプロテアーゼ阻害剤でも RDE の作用を抑制できなかった²⁾ことから、RDE の主要な作用はトリプシンのようなプロテアーゼではないと考えられた。そこで、別の候補であるシアリダーゼ活性について検討を行った。具体的には、市販の精製シアリダーゼを用いて、RDE と同様に

IgE を処理した。しかし、RDE と同様の作用は認められなかった²⁾。このことから、RDE の IgE 不活化反応においては、シアリダーゼも主要な作用ではないと考えられた。以前の報告で、PNGase (ほとんどの N 結合型糖鎖を切断する酵素) で IgE を処理すると、その機能が消失することがわかっている^{5,6)}。そこで RDE 処理した IgE も、糖鎖構造に変化があるか解析を行うことにした。

2-4. RDE 処理は IgE に付加した糖鎖構造へ影響する

あるタンパクに付加した糖鎖を解析するために、糖鎖結合タンパクであるレクチンがよく使用される。多数のレクチンを用いて、その結合能の変化から、付加している糖鎖構造の変化を読み解くのである。これを網羅的に解析するツールとしてレクチンマイクロアレイがある⁷⁾。このマイクロアレイを用いて、RDE の作用によって変化する IgE に付加した糖鎖の解析を行った。その結果、LEL (トマトレクチン (*Lycopersicon esculentum lectin*)) と PHA-L (*Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*) という 2 つのレクチンとの結合能が有意に低下することがわかった。このことは、レクチンプロットでも再確認できた (図 4C, D lane1, 2)。すなわち、RDE 処理した IgE ではバンドサイズの低下とともに、LEL, PHA-L で検出した際のバンドの濃さも未処理の IgE バンドと比較すると低下していた。この結果から、RDE は IgE に付加した糖鎖に影響していることがわかった。とくに LEL, PHA-L に結合性をもつ糖鎖に影響していると考えられた。興味深いことに、LEL, PHA-L は IgG にまったく結合性を示さなかった (図 4C, D lane3, 4)。これまでの結果から、IgG はほとんど RDE の作用による影響を受

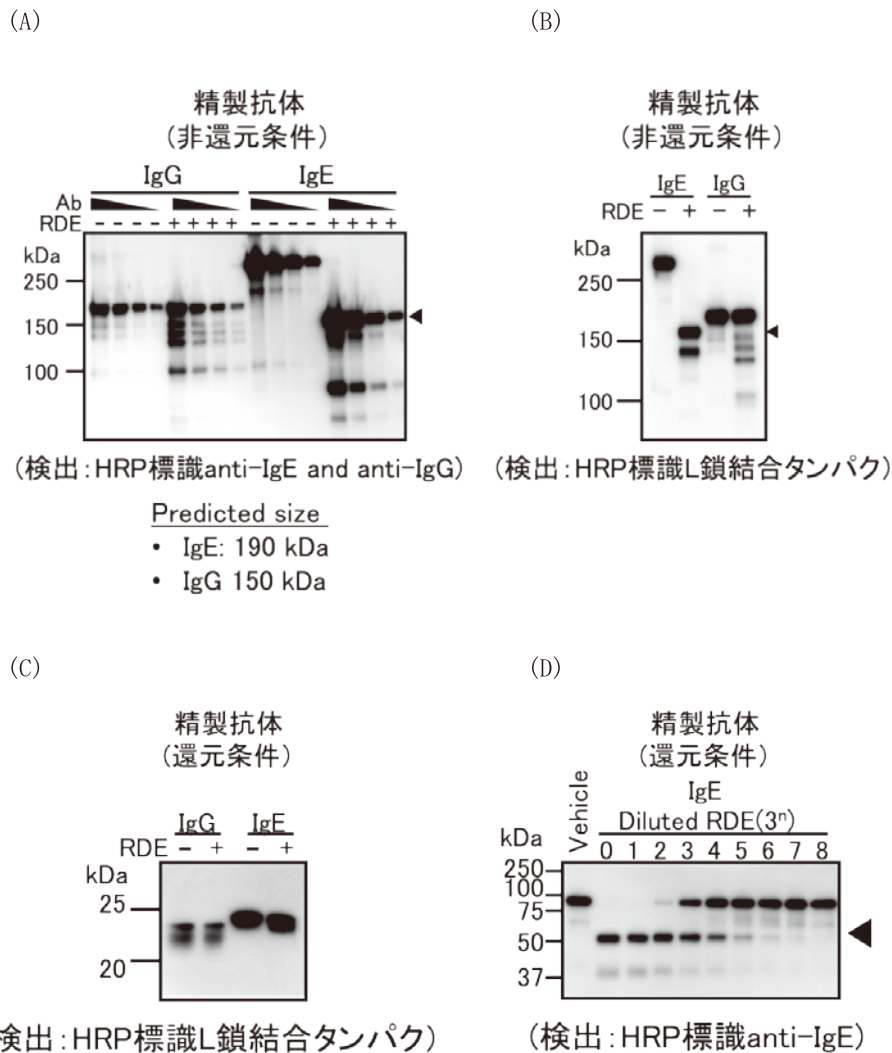


図 3 RDE は IgE の H 鎖に作用して構造を変化させている (A~D)市販の精製 IgE もしくは IgG を RDE と混合し、37°C 一晩インキュベーションした。その後、非還元条件 (A, B) と還元条件 (C, D) でそれぞれ処理を行い、W. B で解析を行った。バンドの検出には、HRP 標識 anti-IgE + anti-IgG (A), HRP 標識 L 鎖結合タンパク (B, C), HRP 標識 anti-IgE (D) をそれぞれ用いた。(文献²⁾を改変)

けていない。以上から RDE は IgE に付加している糖鎖を特異的に認識して作用している可能性が示唆された。

2-5. IgE の機能と糖鎖について

抗体機能において、糖鎖は重要な役割を果たしていることが知られている。IgG では付加している糖鎖のうち、フコースを除去すると抗体依存性細胞傷害 (Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity: ADCC) 活性が上昇することが知られている⁸⁾。一方で、IgE は抗体の中で最も糖鎖が付加された抗体である (ヒト: 7 つ, マウス: 8~9 つ)。Shade らの報告で、IgE に付加している N 結合型糖鎖のうち、定常領域ドメイン 3 (Ce3) に付加している高マンノース型糖鎖が、マスト細胞への結合に重要な役割を果たしていることを見出した⁶⁾。すなわち高マ

ンノース型糖鎖を切断する酵素で IgE を処理すると IgE のマスト細胞への結合能は低下していた。また Wu らの報告で、高 IgE 症候群の患者血清中に存在する IgE の同様の部位に高マンノース型糖鎖を検出している⁹⁾。われわれの研究やこれら過去の報告から、IgE の機能にも糖鎖は重要な役割を果たしていると考えられる。

3. IgE を標的としたアレルギー治療の可能性

3-1. IgE を標的とした抗体医薬について

アレルギーの主要因の一つであることが知られている IgE は、アレルゲンの暴露によって誘導され、マスト細胞膜上に発現している FcεR と結合する。さらにアレルゲンが IgE に結合すると FcεR 同士が架橋され、その結果、ヒスタミンなどのアレルギー誘導物質が放出され

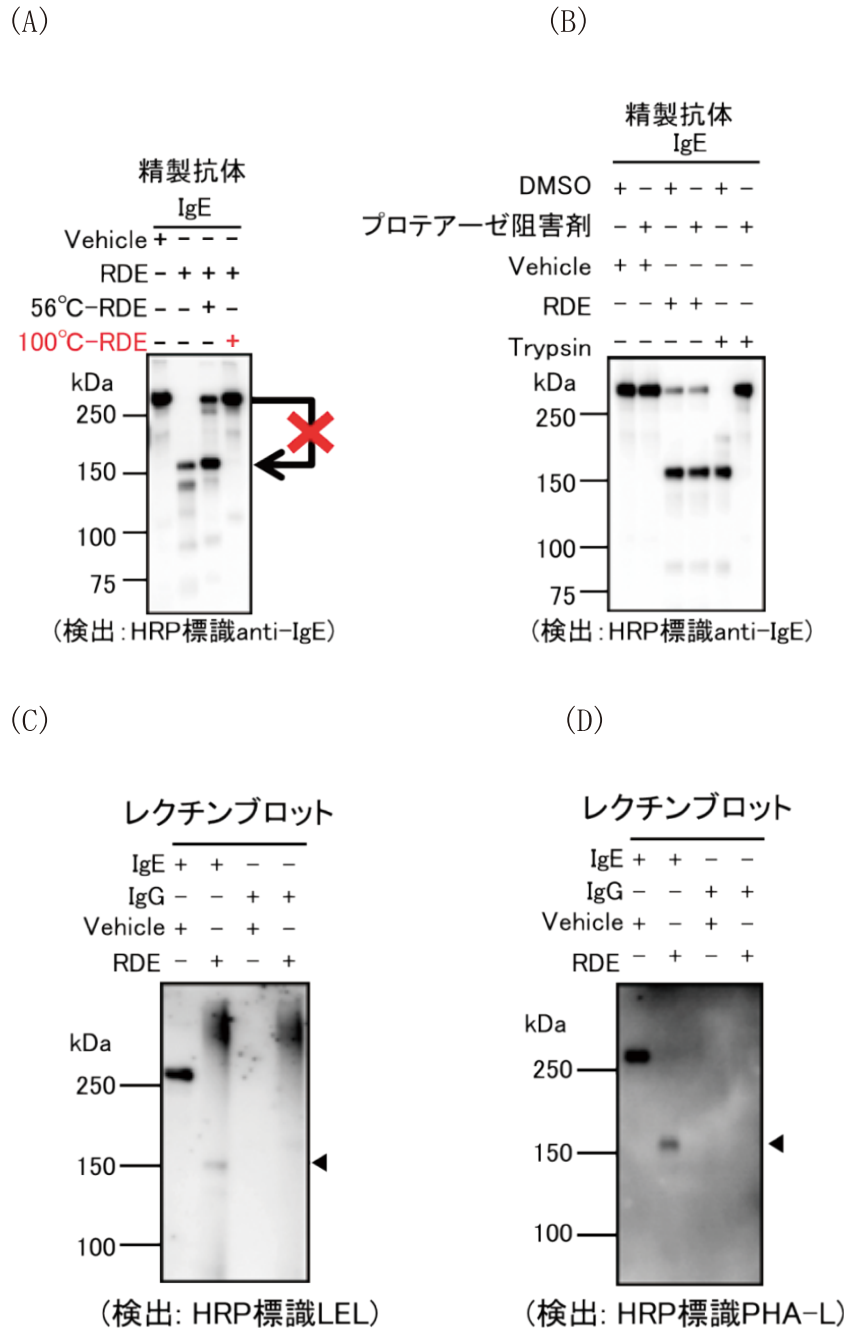


図 4 RDE は IgE の糖鎖に作用する

(A, B) RDE を熱処理 (A), もしくはプロテアーゼ阻害剤 (B) で前処理してから IgE と混合し, 37°C 一晚インキュベーションした。その後, W. B で解析を行った。(C, D) RDE 処理した IgE もしくは IgG をレクチンブロットで解析を行った。検出は HRP 標識 LEL (C) もしくは HRP 標識 PHA-L (D) をそれぞれ用いた。(文献²⁾を改変)

る。よって IgE を標的としたアレルギー治療は効果的であると考えられる。すでに IgE に対する抗体医薬 (オマリズマブ) が, 気管支喘息や慢性蕁麻疹治療に対して承認されている。しかし, すでに FcεR に結合した IgE に対して, オマリズマブは結合することができないので, 治療効果が得られるのに時間がかかるという問題点も

ある¹⁰⁾。

3-2. RDE で不活化された IgE はアナフィラキシーを誘導できない

そこでわれわれは RDE 処理した IgE のアナフィラキシーの誘導能を確認し, RDE をアレルギー治療への応用

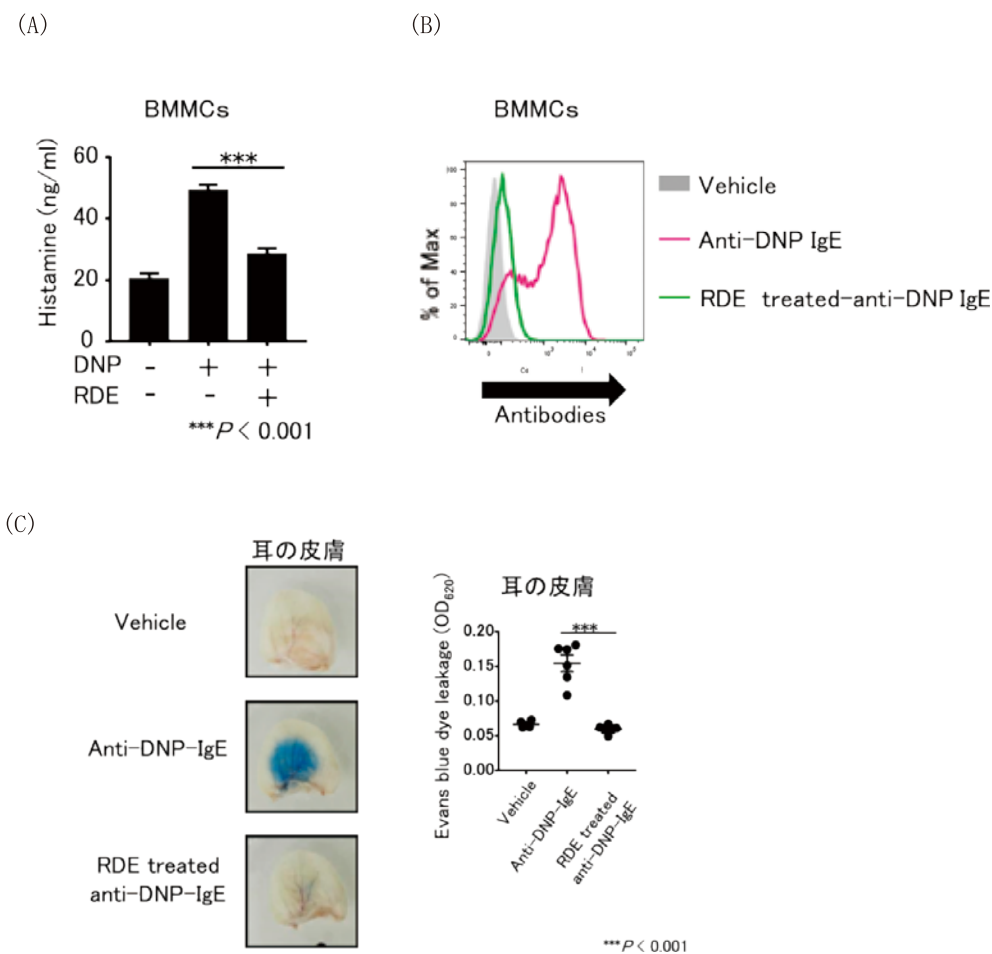


図 5 RDE 処理した IgE はアナフィラキシーを誘導できない

(A) RDE 処理した抗 DNP IgE を骨髄から誘導したマスト細胞に添加し、アレルゲン (HSA-DNP) を加え、上清中のヒスタミン量を ELISA で解析した。(B) RDE 処理した抗 DNP IgE のマスト細胞への結合レベルを FACS で解析した。(C) RDE 処理した抗 DNP IgE をマウスの耳に注射し、その後、Evans blue を含む HSA-DNP を静脈注射して、アナフィラキシー誘導レベルの解析を行った。右図は、耳の皮膚に滲出した Evans blue 量を数値化したグラフである。(文献²⁾を改変)

が可能か検討することにした。そのために、抗 dinitrophenol (DNP) IgE をマスト細胞に結合させてアレルゲン (HSA-DNP) を加え、ヒスタミンなどのアレルギー誘導物質を放出させるモデルを用いた。その結果、RDE 処理した IgE では、ヒスタミンの分泌量は低下することがわかった (図 5A)。その原因を解明するために、RDE 処理した IgE のマスト細胞への結合能を FACS で解析を行った。その結果、RDE 処理した IgE では、マスト細胞にほとんど結合できないことがわかった (図 5B)。このことは、RDE によって IgE の構造が変化した結果であると考えられる。

In vivo においても同様の効果があるか確かめるため、抗 DNP IgE をあらかじめマウスの耳に投与しておき、エバンスブルーを含んだ HSA-DNP を静脈注射した。未処理の IgE を投与した場合には、アナフィラキシーによって、血管透過性が亢進し、エバンスブルーの滲出が

おこるので、耳の皮膚で青い部分が観察される (図 5C)。一方で、RDE 処理した IgE では、そのような反応はほとんど認められなかった。以上から、RDE 処理をした IgE は *in vivo* においてもアナフィラキシー誘導能がほとんど認められないことがわかった。

おわりに

RDE によって IgE に付加した糖鎖が変化することで構造が変化し、その結果、IgE のマスト細胞への結合能が低下し、アレルギー誘導物質の分泌量が低下したと考えている (図 6)。すなわち IgE の糖鎖を変化させる因子は、アレルギー治療の候補となり得ると考えられる。過去の報告より、N 結合型糖鎖を切断することで、IgE の機能が消失することは知られていた^{5,6)}。さらにわれわれの研究によって、IgE の不活化には LEL もしくは PHA-L に結合する糖鎖が重要であることが示唆された。また

コレラ菌抽出物(RDE)でIgEを処理すると、

1. 糖鎖へ影響→構造変化
2. アレルギー誘導の抑制効果

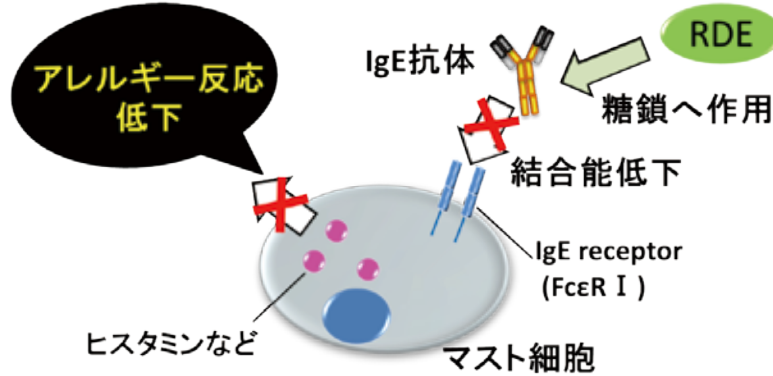


図 6 RDE 処理による IgE 不活化の模式図

RDE の作用は IgG ではほとんど認められなかったことから、IgE に特異的な糖鎖がその機能に重要であると考えられる。残念ながら、RDE を直接マウスに投与してもアナフィラキシーを抑制することはできなかった。しかし、RDE に含まれる IgE 不活化に重要な因子を同定し、標的となる糖鎖をさらに詳細に解析することで、アレルギー治療の開発に貢献できると考えている。

文 献

- 1) Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, et al. : Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in Lethal Influenza Infection. *Front Immunol* 9 : 47, 2018
- 2) Yamazaki T, Inui M, Hiemori K, et al. : Receptor-destroying enzyme (RDE) from *Vibrio cholerae* modulates IgE activity and reduces the initiation of anaphylaxis. *J Biol Chem* 294 : 6659-6669, 2019
- 3) Tyrrell DA, Horsfall FL Jr : A procedure which eliminates nonspecific inhibitor from human serum but does not affect specific antibodies against influenza viruses. *J Immunol* 69 : 563-574, 1952
- 4) Nakayama M, Ogawa Y, Yamazi Y : Sialidase and protease activities of commercial (RDE) receptor destroying enzyme products used for the (HI) hemagglutination inhibition test of influenza viruses. *Nihon Ika Daigaku Zasshi* 53 : 534-536, 1986
- 5) Björklund JE, Karlsson T, Magnusson CG : N-glycosylation influences epitope expression and receptor binding structures in human IgE. *Mol Immunol* 36 : 213-221, 1999
- 6) Shade KT, Platzer B, Washburn N, et al. : A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J Exp Med* 212 : 457-467, 2015
- 7) Tateno H, Toyota M, Saito S, et al. : Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem* 286 : 20345-20353, 2011
- 8) Natsume A, Niwa R, Satoh M : Improving effector functions of antibodies for cancer treatment : Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther* 3 : 7-16, 2009
- 9) Wu G, Hitchen PG, Panico M, et al. : Glycoproteomic studies of IgE from a novel hyper IgE syndrome linked to PGM3 mutation. *Glycoconj J* 33 : 447-456, 2016
- 10) Oettgen HC : Fifty years later : Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 137 : 1631-1645, 2016