

L14

スギ花粉症治療タマゴ開発を目指したMHC-抗原エピトープ融合タンパク質の生産

○(学)林田 悠希¹、(学)沼田 健作²、(学)山田 紀子³、(正)河邊 佳典²、
(正)井藤 彰²、(正)上平 正道^{*2,3}(¹九大工、²九大院工・化工、³九大院・シス生命)

1. 緒言

数あるアレルギー症状の中でも花粉症は今や国民病となっており、対処療法ではなく根本的治療法の確立が切望されている。花粉症の根本的治療法として、アレルゲン由来のT細胞エピトープペプチドを用いた、減感作療法に基づいたペプチド免疫療法が提案されている。また、エピトープペプチドの投与方法としては、経口投与による免疫寛容誘導法が注目されている。

我々はこれまでにトランスジェニック鳥類作製のための技術開発を行ってきた(1)。本研究では、スギ花粉抗原T細胞主要エピトープペプチド(Crp)とヒト主要組織適合遺伝子複合体(MHC)との融合タンパク質MHC-Crpをニワトリ卵中に発現させることを目的に、MHC-Crp発現用レトロウイルスベクターを作製し、このウイルスベクターを用いて、融合タンパク質の生産を試みた。

2. 実験方法

Crpは、多くのヒトT細胞で認識されるエピトープであるCry j I(233-246)およびCry j II(192-208)を用い、それぞれに対してMHCクラスIIとの融合タンパク質MHC-Crpを生産させた。MHC-CrpのC末端には、Myc-Hisまたはマウス免疫グロブリンIgG1のFc領域を附加させた。これらの目的遺伝子をニワトリβ-アクチンプロモーターの制御下で発現するユニットとして、レトロウイルスベクター生産用プラスミドに組んだ(図1)。ウイルス外皮タンパク質としてVSV-Gを用いて、レトロウイルスベクターを生産させた。生産させたウイルスベクターを用いて、CHO細胞へ遺伝子導入を行い、融合タンパク質の発現解析を行った。その後、超遠心で濃縮したウイルス溶液を調製し、ニワトリ胚に微量注入することで遺伝子導入を行った。ニワトリ胚を胚培養後、人工孵化させることで、遺伝子導入ニワトリを作製した。ウイルスベクターの力価は、NIH3T3細胞を用いて算出した。

3. 実験結果及び考察

Crpをコードする遺伝子配列を、遺伝子工学的にMHCクラスII分子のα鎖β鎖の間に結合させ、融合タンパク質MHC-Crpとして生産させた。初めにMHC-Crpの生産を評価するために、目的遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを293FT細胞より一過性で作製し、CHO細胞へ遺伝子導入を行っ

た(図2a)。抗Mycおよび抗mFcγ抗体を用いてウエスタンプロット法で解析したところ、MHC-crpおよびMHC-crp-Fcどちらの融合タンパク質においても、細胞上清および細胞ライゼートにて適切な分子量で生産されていることがわかった(図2b)。そこで、超遠心機を用いて高濃度に濃縮したウイルスベクターを調製後、ウイルス溶液をニワトリ胚へ遺伝子導入したところ、平均55%で孵化させることに成功した。現在遺伝子導入ニワトリにおける発現解析を進めており、その結果についても報告する。

(1) Kamihira *et al.* J Virol. (2005) 79; 10864-74.

*phone: 092-802-2743, FAX: 092-802-2793

e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

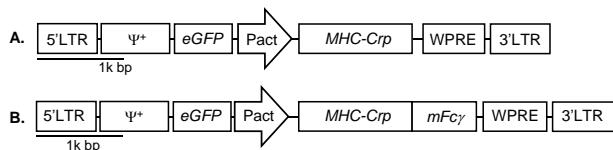


図1. レトロウイルスベクターの構造

A) MSCV/eGΔAMHC-CrpW,

B) MSCV/eGΔAMHC-CrpFW

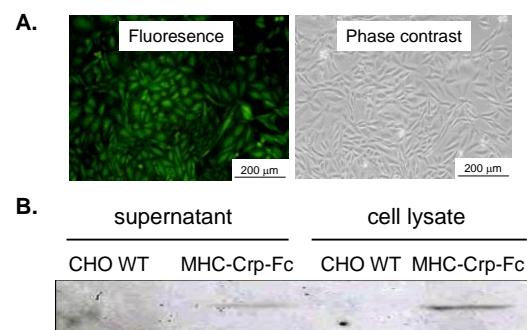


図2. MHC-Crp融合タンパク質の発現解析

A) 遺伝子導入CHO/MHC-Crp細胞

B) ウエスタンプロット法による発現

表1. 作製した遺伝子導入ニワトリ

Target genes	Viral titer (IU/ml)	Number of embryos	
		Injected	Hatched
MHC-Crp	6.9×10^8	18	10 (56%)
MHC-Crp-Fc	4.6×10^8	13	7 (54%)