

## 疾患特異的ヒトマスト細胞のフェノタイプの解析と フェノタイプの変化の機序の解明

岡山吉道<sup>1)</sup>, 布村聡<sup>2)</sup>, 下川敏文<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>3)</sup>, 齋藤修<sup>1)</sup>, 山本樹生<sup>1)</sup>, 照井正<sup>1)</sup>

### Analysis of disease-specific human mast cell phenotype and investigation of mechanisms of the phenotypic changes

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Satoshi NUNOMURA<sup>2)</sup>, Toshibumi SHIMOKAWA<sup>1)</sup>,  
Kyoko TAKAHASHI<sup>3)</sup>, Shu SAITO<sup>1)</sup>, Tatsuo YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

#### 要旨

慢性蕁麻疹, アトピー性皮膚炎, 関節リウマチ病変部におけるマスト細胞のフェノタイプを同定し, その性状を解析した。マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え, 疾患特異的な活性化機構が存在している。重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞はMrgX2を有意に高く発現している。上皮細胞由来サイトカインであるIL-33とthymic stromal lymphopoietin (TSLP) はその発現を増加させなかった。アトピー性皮膚炎のマスト細胞はFcεRI β鎖を高く発現している。その発現増加の機序としては上皮細胞から産生されるTSLPがその一因である。関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞はCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1を変形性膝関節症の滑膜マスト細胞と比較して有意に高く発現している。これら遺伝子の発現増強は滑膜組織の微小環境によるのではなくエピジェネティックな変化であると考えられた。ヒト脱落膜組織のマスト細胞の特徴を解析し, 脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。

#### 1. はじめに

我々は, 今まで皮膚, 肺, 扁桃腺および腸管のヒトマスト細胞の薬物に対する反応の多様性<sup>1-3)</sup> や組織マスト細胞のサイトカイン産生能の多様性<sup>4,6)</sup> を報告してきた。また, 各組織のマスト細胞を分離培養して組織特異的な分子の発現を報告してきた。例えば扁桃腺組織などのリンパ節のマスト細胞にはOX40Lが発現しており<sup>7)</sup>, 肺マスト細胞では血小板活性化因子 (PAF) 受容体を, 皮膚マスト細胞ではMrgX2を発現していることを報告した<sup>8)</sup>。ヒトマスト細胞はinterferon-γに曝露されるとそのフェノタイプを変え, FcγRI<sup>9-12)</sup>, Toll様受容体4<sup>13,14)</sup> や, NOD2<sup>15)</sup> を発現することを報告したが, 関節滑膜マスト細胞では構成的にFcγRIを発現していることを報告した<sup>16)</sup>。また, マスト細胞のフェノタイプの変化に関して, マスト細胞から産生されるGroup III Phospholipase A2が線維芽細胞に働き, L型のprostaglandin (PG) 合成酵素の活性を上げ, その結果, 線維芽細胞から

PGD<sub>2</sub>が産生される。そのPGD<sub>2</sub>がマスト細胞のPGD<sub>2</sub>受容体DP1を介してマスト細胞を成熟させることを我々は最近報告した<sup>17)</sup>。マウスでは粘膜型のマスト細胞を結合織に移植するとマスト細胞のフェノタイプが変ることから, マウス細胞周囲の微小環境がフェノタイプの決定に重要であることが報告された<sup>18)</sup>。粘膜型マスト細胞を線維芽細胞と共培養すると, 結合織型マスト細胞に変化させる因子および成熟因子として膜結合型stem cell factor, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) とIL-33が同定されている<sup>19-22)</sup>。このように, それぞれの炎症性疾患においてマスト細胞が疾患特異的にフェノタイプを変えているのは, マスト細胞の存在する微小環境によって影響を受けているという仮説を立て, 関節リウマチ, 慢性蕁麻疹およびアトピー性皮膚炎のフェノタイプの変化の機序と病態への関与を明らかにし, 新規治療薬の開発に資する研究を行うことを目的とした。また脱落膜組織マスト細胞の特徴を解析した。

1) 日本大学医学部

2) 佐賀大学医学部

3) 日本大学生物資源科学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

## 2. 対象及び方法

**倫理的考慮：**生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規程に定める学長の確認を受けて実施した。

**細胞：**ヒト末梢血および臍帯血培養マスト細胞はすでに報告した方法を用いて樹立した<sup>23)</sup>。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞 (CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>, および CD19<sup>-</sup> 細胞) を分離したのち、臍帯血では CD34<sup>+</sup> 細胞を分離したのち、stem cell factor (SCF; 200 ng/ml, Pepro-Tech EC Ltd, London, UK) と IL-6 (50 ng/ml, Pepro-Tech EC Ltd) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada と Iscove's modified Dulbecco's medium [IMDM]) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。ヒト滑膜マスト細胞<sup>16)</sup>、肺マスト細胞<sup>7,8)</sup> と皮膚マスト細胞<sup>7,8)</sup> は、それぞれ滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織から分離培養した。新鮮な滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織を採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いて 1mm<sup>3</sup> 以下に細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後、SCF (200 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。また、滑膜組織は酵素で細胞を分散後、培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

**RT-PCR：**マスト細胞の総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し、精製した。500 µg/mL oligo (dT<sub>12-18</sub>) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写を行った。COX1, COX2, LTC4S,

TBXAS1 および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, 東京) のものを使用した。

**フローサイトメトリー：**マスト細胞のフローサイトメーターによる解析はすでに報告した方法を用いて行った<sup>13)</sup>。以下の抗体を用いて細胞を染色した。PE あるいはビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA), ビオチン標識抗 chymase モノクローナル抗体 (クローン B7), 抗 tryptase モノクローナル抗体 (クローン G3, Chemicon International, CA), PE 標識抗 CD117 (クローン YB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA), 抗 MrgX2 モノクローナル抗体 (クローン 477533, R&D Systems, Minneapolis, MI)。PE/Cy5-streptavidin は Biolegend (San Diego, CA) から購入した。

**免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析：**共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った<sup>13)</sup>。滑膜組織、皮膚組織あるいは、細胞を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Flour 488 標識抗 tryptase 抗体、ビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1), Alexa Flour 555 標識抗 FcεRIβ 鎖抗体<sup>24)</sup>、アイソタイプコントロールマウス IgG1 およびウサギ IgG とインキュベートした。ビオチン標識抗 FcεRIα 陽性細胞は、streptavidin-Cy3 (Biolegend) を用いて可視化した。FV1000 型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, 東京) を用いた。

**マスト細胞の活性化：**IgE 感作したマスト細胞を 0.1, 1.0, 10 µg/ml の抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1) あるいはカルシウムイオノフォア A23187 (10<sup>-6</sup>M) で 30 分間刺激した。FcγRI の架橋は、マスト細胞を 1.0, 10 µg/ml の抗ヒト FcγRI 抗体の F(ab')<sub>2</sub> fragments (F(ab')<sub>2</sub>αFcγRI, clone 10.1, IDLabs, London, カナダ) で 30 分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1 の F(ab')<sub>2</sub> fragments (F(ab')<sub>2</sub>m IgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で 30 分間刺激した。細胞を 1 度洗浄後 FcγRI を架橋させるため、抗マウス IgG F(ab')<sub>2</sub> fragments のヤギ F(ab')<sub>2</sub> fragments (gF(ab')<sub>2</sub>αmF(ab')<sub>2</sub>, Jackson Immune Laboratory) を添加しさらに 30 分間刺激した。ヒスタミン遊離と PGD<sub>2</sub> 産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。サイトカイン測定では 6 時間刺激後、細胞上清を回収した。**脱顆粒, PGD<sub>2</sub> 産生, サイトカイン産生測定：**ヒスタ

ミン遊離とPGD<sub>2</sub>産生は酵素免疫法、サイトカイン産生はELISA法を用いた。

統計解析：臨床データの2群間の統計学的解析およびin vitroの実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。in vitroの実験の2群間の統計学的解析はunpaired Student *t*-testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。

### 3. 結果

#### 疾患特異的マスト細胞のフェノタイプの同定

##### 1) 慢性蕁麻疹：

重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞はMrgX2を有意に高く発現していることと、MrgX2はsubstance Pの受容体であるのみならず、好酸球顆粒タンパクのなかでmajor basic proteinとeosinophil peroxidaseの受容体であることを報告した<sup>25)</sup>。

##### 2) アトピー性皮膚炎：

アトピー性皮膚炎と疾患コントロールである乾癬患者の皮膚組織のFcεRIβ鎖の発現を免疫組織化学染色にて調べたところ、アトピー性皮膚炎患者ではマスト細胞数が有意に増加しているのみならず、FcεRIβ鎖の発現が有意に増加していた。

##### 3) 関節リウマチ：

関節リウマチ患者と変形性膝関節症の病変滑膜マスト細胞に発現している遺伝子をDNAチップで比較した。関節リウマチ患者マスト細胞は*COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1*を変形性膝関節症のマスト細胞と比較して有意に高く発現していた。Real-Time RT-PCRにてその結果を確認した。

##### 4) 脱落膜組織マスト細胞：

ヒト脱落膜マスト細胞を酵素的に分散させる方法を確認した。ヒト脱落膜マスト細胞のフェノタイプはtryptaseおよびchymaseを持つMC<sub>trc</sub> typeであった。ヒト脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。

#### 疾患特異的にマスト細胞がフェノタイプを変える機序の解明

##### 1) 重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞におけるMrgX2の高発現の機序の解明：

ヒト上皮細胞由来サイトカインであるTSLPおよびIL-33は慢性蕁麻疹の上皮細胞で発現が上昇しているという報告<sup>26)</sup>があるが、これらサイトカインはヒト皮膚マスト細胞表面のMrgX2の発現を増強

しなかった。皮膚マスト細胞を皮膚線維芽細胞と共培養する実験準備としてヒトの皮膚線維芽細胞の培養系を確立した。皮膚マスト細胞は、入手数が少ないため、臍帯血由来培養マスト細胞と皮膚線維芽細胞の培養実験を開始した。

##### 2) アトピー性皮膚炎の皮膚マスト細胞におけるFcεRIβ鎖の高発現の機序の解明：

アトピー性皮膚炎の上皮細胞においてはTSLPが高発現していることが知られている。そこで、TSLPがヒトのマスト細胞のFcεRIβ鎖発現を増強するかどうかを調べた。TSLPをマスト細胞に添加し、5日間でFcεRIβ鎖タンパクの発現が増強された。しかしながらFcεRIβ mRNAの有意な発現増強はみられなかった。

##### 3) 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞における*COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1*の強発現の機序の解明：

変形性膝関節症の滑膜マスト細胞を関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞と共培養し、変形性膝関節症の滑膜マスト細胞における*COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1*の発現をReal Time RT-PCRで検討したが、これら遺伝子発現には関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞は、何ら影響を及ぼさなかった。また、変形性膝関節症の滑膜マスト細胞にTSLPを添加し、*COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1*の発現をReal Time RT-PCRで検討したが影響はなかった。

#### 疾患特異的にマスト細胞で発現している分子の疾患の病態への関与の解析

##### 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞における*COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1*の病態への関与の解析：

Fc受容体を介する刺激で関節リウマチ患者の滑膜マスト細胞がより多量のPGD<sub>2</sub>を産生することが、関節リウマチの病態にどのように関与しているのかを検討した。FcεRI架橋およびFcγRI架橋の刺激による変形性膝関節症および関節リウマチ患者の滑膜マスト細胞からのPGD<sub>2</sub>産生量を比較したところ、関節リウマチ患者の滑膜マスト細胞からのPGD<sub>2</sub>産生量が有意に高いことが分かった。また、関節滑液中のPGD<sub>2</sub>量を測定すると、関節リウマチ患者で有意に高いことが分かった。関節リウマチ患者の滑膜組織でのPGD<sub>2</sub>産生細胞はマスト細胞のみでなく滑

膜線維芽細胞やマクロファージも産生細胞であるので、変形性膝関節症および関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞の培養上清中のPGD<sub>2</sub>量を測定したが、その量はアッセイの感度以下だった。

#### 4. 考 察

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在している。疾患特異的にマスト細胞に高発現している遺伝子の発現増強機構は炎症組織の微小環境によるものとエピジェネティックな変化によるものがあると考えられた。

#### 5. 結 語

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在し、マスト細胞は炎症組織の微小環境によってそのフェノタイプを変化させるものとエピジェネティックな変化によるものがあることが示唆された。

#### 謝辞

本研究の成果は、平成27年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

#### 文 献

- 1) Okayama Y, Benyon RC, Rees PH, Lowman MA, Hillier K, Church MK. Inhibition profiles of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on mediator release from mast cells of human skin, lung, tonsil, adenoid and intestine. *Clin Exp Allergy*. 1992;22(3):401-9.
- 2) Okayama Y, Church MK. Comparison of the modulatory effect of ketotifen, sodium cromoglycate, procaterol and salbutamol in human skin, lung and tonsil mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;97(3):216-25.
- 3) Okayama Y, Matsuda A, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Shimokawa T, et al. Highly expressed cytoplasmic FcεRIβ in human mast cells functions as a negative regulator of the Fcγ-mediated cell activation signal. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(2):238-49.
- 4) Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, et al. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med*. 1992;176(5):1381-6.
- 5) Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol*. 1995;155(1):297-307.
- 6) Okayama Y, Petit-Frere C, Kassel O, Semper A, Quint D, Tunon-de-Lara MJ, et al. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. *J Immunol*. 1995;155(4):1796-808.
- 7) Kashiwakura J, Yokoi H, Saito H, Okayama Y. T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells: comparison of gene expression profiles between human tonsillar and lung-cultured mast cells. *J Immunol*. 2004;173(8):5247-57.
- 8) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, et al. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1137-45 e6.
- 9) Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, FcγRI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-γ. *J Immunol*. 2000;164(8):4332-9.
- 10) Okayama Y, Hageman DD, Metcalfe DD. A comparison of mediators released or generated by IFN-γ-treated human mast cells following aggregation of FcγRI or FcεRI. *J Immunol*. 2001;166(7):4705-12.
- 11) Woolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, Metcalfe DD. IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of FcγRI by IFN-γ. *Eur J Immunol*. 2001;31(11):3298-307.
- 12) Okayama Y, Tkaczyk C, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Comparison of FcεRI- and FcγRI-mediated degranulation and TNF-α synthesis in human mast cells: selective utilization of phosphatidylinositol-3-kinase for FcγRI-induced degranulation. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1450-9.
- 13) Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, et al. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood*. 2003;102(7):2547-54.
- 14) Kobayashi R, Okamura S, Ohno T, Saito H, Mori M, Ra C, et al. Hyperexpression of FcγRI and Toll-like receptor 4 in the intestinal mast cells of Crohn's disease patients. *Clin Immunol*. 2007;125(2):149-58.
- 15) Okumura S, Yuki K, Kobayashi R, Okamura S, Ohmori K, Saito H, et al. Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn's disease patients: preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells. *Clin Immunol*. 2009;130(2):175-85.
- 16) Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, et al. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum*. 2013;65(1):109-19.
- 17) Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, et al. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol*. 2013;14(6):554-63.
- 18) Sonoda S, Sonoda T, Nakano T, Kanayama Y, Kanaku-

- ra Y, Asai H, et al. Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cell in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. *J Immunol.* 1986; 137(4): 1319-22.
- 19) Piliponsky AM, Gleich GJ, Nagler A, Bar I, Levi-Schaffer F. Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor. *Blood.* 2003;101(5):1898-904.
  - 20) Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol.* 2007;179(4):2051-4.
  - 21) Kaieda S, Shin K, Nigrovic PA, Seki K, Lee RT, Stevens RL, et al. Synovial fibroblasts promote the expression and granule accumulation of tryptase via interleukin-33 and its receptor ST-2 (IL1RL1). *J Biol Chem.* 2010;285(28):21478-86.
  - 22) Han NR, Oh HA, Nam SY, Moon PD, Kim DW, Kim HM, et al. TSLP induces mast cell development and aggravates allergic reactions through the activation of MDM2 and STAT6. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(10):2521-30.
  - 23) Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2178-83.
  - 24) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, Yokoi N, Hamuro J, Walls AF, et al. Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor-beta chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(6): 2871-7.
  - 25) Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, et al. Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(3):622-33 e9.
  - 26) Kay AB, Clark P, Maurer M, Ying S. Elevations in T-helper-2-initiating cytokines (interleukin-33, interleukin-25 and thymic stromal lymphopoietin) in lesional skin from chronic spontaneous ('idiopathic') urticaria. *Br J Dermatol.* 2015;172(5):1294-302.