

# 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>, 千島史尚<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>, Fumihisa CHISHIMA<sup>1)</sup>,  
Tatsuo YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

### 要旨

慢性特発性蕁麻疹および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。重症の慢性特発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。関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞はCOX1およびCOX2を変形性膝関節症患者の滑膜マスト細胞と比較して有意に高く発現している。IgG依存性刺激においてPGD<sub>2</sub>産生量は関節リウマチ患者マスト細胞の方が有意に高かった。miR-199a-3pとPTGS2の発現量の相関を調べたところ、変形性膝関節症患者マスト細胞では相関がなかったが、関節リウマチ患者マスト細胞では負の相関がみられた。これら遺伝子の発現増強はマスト細胞周囲の組織の微小環境によるのみだけでなく、エピジェネティックな変化もあると考えられた。さらに、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、ヒト関節滑膜のマスト細胞がIgG受容体を発現し、関節リウマチ (RA) 患者では、免疫複合体の刺激によってマスト細胞が多量のTNF- $\alpha$ を産生すること<sup>1)</sup>、重症の慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞がGタンパク共役型受容体のひとつであるMas-related gene X2 (MrgX2)を高く発現しており、神経ペプチドや好酸球顆粒タンパクをリガンドとしてヒスタミンを遊離することを報告した<sup>2)</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報告した<sup>3)</sup>。この機構によって肺マスト細胞はMrgX2を発現することを見出した。すなわち、MrgX2の発現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考えられることから、今回我々は、疾患特異的マスト細胞のフェノタイプの解析としてRAおよび慢性特発性蕁麻疹患者のマスト細胞と脱落膜マスト細胞を用いて解析し、さらに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。

### 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

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

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>4)</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, PeproTech EC Ltd, London, UK) と IL-6 (50 ng/ml, PeproTech 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>5)</sup>、皮膚マスト細胞<sup>2)</sup> および脱落膜マスト細胞は、それぞれ滑膜組織、皮膚組織および脱落膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織、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、はさみを用いてできるだけ細切した。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), 5x 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>6)</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>6)</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), 抗 chymase 抗体、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) 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>mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で 30 分間刺激した。細胞を一度洗浄後 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) 慢性特発性蕁麻疹

重症の慢性特発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>2)</sup>。

##### 2) RA

RAと変形性膝関節症(OA)患者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。RA患者マスト細胞は*COX1*, *COX2*, *LTC4S*及び*TBXAS1*をOA患者のマスト細胞と比較して有意に高く発現していることを発見した(未発表)。Real-Time RT-PCRにてその結果を確認した。一方、prostaglandin E synthase (PTGES)の発現量は低く、有意差は見られなかった。造血型prostaglandin D synthaseであるH-PGDSの発現量を測定したが有意差は見られなかった。IgE依存性刺激において、PGD<sub>2</sub>産生量はRA患者マスト細胞の方が有意に高かった。一方、LTB<sub>4</sub>産生量はOA患者マスト細胞で高い傾向にあった。IgG依存性刺激においてPGD<sub>2</sub>産生量はRA患者マスト細胞の方が有意に高かった。したがって、OAおよびRA患者マスト細胞は、異なった性質を有していることが明らかになった。

##### 3) 脱落膜組織マスト細胞

脱落膜組織の蛍光免疫組織化学染色法による観察ではマスト細胞は、母体面に多く存在していた。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。脱落膜CD117<sup>+</sup>FcεRIα<sup>+</sup>マスト細胞のフェノタイプは、tryptaseとchymaseの両者の発現を認めMCrc typeであった。妊娠初期ヒト脱落膜からマスト細胞を分離し、SCFとIL-6を用いて12週間培養す

るとほぼ100%の純度のマスト細胞が得られた。脱落膜分離直後のマスト細胞および培養マスト細胞の両者でIgE依存性の刺激で脱顆粒が惹起された。また、両者のマスト細胞を電顕で観察したところ顆粒の形態は類似して格子型をしていた。GeneChipで両者を比較解析中である。

#### 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) 重症慢性特発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

皮膚マスト細胞に、substance P, histamine, dexamethasone, histamine receptor 1 antagonist及びhistamine receptor 2 antagonistを添加し、MrgX2の発現を検討したが明らかな変化はなかった。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。皮膚組織は、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共培養実験を施行したが、臍帯血由来培養マスト細胞におけるMrgX2発現は構成的に高く有意な発現上昇は見られず、細胞表面上のMrgX2の発現の低い末梢血由来培養マスト細胞を用いて、皮膚線維芽細胞の培養実験を開始した。

##### 2) RA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

RA患者線維芽細胞においてPTGS1, PTGS2, *TBXAS1*及び*LTC4S* mRNAの発現量はOA患者線維芽細胞と同程度であった。またOAおよびRA患者線維芽細胞培養上清中のPGD<sub>2</sub>量を測定したがEIA検出感度以下であった。マスト細胞の顆粒成熟や細胞表面分子の発現は、微小環境に存在する線維芽細胞に影響を受けることが報告されている。これらの報告から、RAとOA患者マスト細胞の脂質メディエーター合成酵素発現の違いは、病態局所の滑膜を構成する線維芽細胞に依存しているという仮説を立てた。その仮説を検証するために、OA患者由来培養マスト細胞とRA患者由来線維芽細胞を共培養した。マスト細胞と線維芽細胞間の相互作用によってPTGS1, PTGS2, *TBXAS1*および*LTC4S* mRNAの発現量に変化があるかどうかを調べた。OA患者マスト細胞をRA患者線維芽細胞と共培養しても

PTGS1, PTGS2, TBXAS1 及び LTC4S mRNA の発現量に変化は見られなかったことから、両マスト細胞の性質の違いは、線維芽細胞に起因しないことが示唆された。次に、遺伝子発現を制御する因子として、miRNA が重要な役割を担っていることが知られている。OA と RA 患者マスト細胞に発現量の差がみられた遺伝子群を制御する miRNA の発現を解析するために、OA3 ドナーと RA3 ドナーを用いて miRNA chip 解析を行った。その結果、OA 患者マスト細胞の方が、RA 患者マスト細胞より 3 倍以上発現量が高い miRNA を 20 個見出した。これら 20 個の miRNA のうち PTGS2 の発現制御に寄与する miRNA は miR-199a-3p であった。実際に miR-199a-3p の発現に、RA および OA 患者マスト細胞間で違いが見られるかを検証するために、15 ドナーの OA 患者マスト細胞と 9 ドナーの RA 患者マスト細胞における miR-199a-3p の発現を定量的 RT-PCR 法で比較した結果、OA 患者マスト細胞の方が、miR-199a-3p の発現が高い傾向にあったが有意差を認めなかった。しかしながら、miR-199a-3p と PTGS2 の発現量の相関を調べたところ OA 患者マスト細胞では相関がなかったが、RA 患者マスト細胞では負の相関がみられた (図 1)。関節液中の PGD<sub>2</sub> 量は、RA 患者の方が有意に高かったのに対し、PGE<sub>2</sub> 量は両群間に有意な差は見られなかった。

### 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

#### 1) 重症慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞の MrgX2 の病態への関与の解析

MrgX2 は、substance P のみならず、好酸球顆粒タンパクの中の major basic protein と eosinophil cationic protein の受容体であることを発見した。すなわち、好酸球炎症の場においてもマスト細胞が活性化されることを示唆している。また、neuropeptide である hemokinin-1 が MrgX2 のリガンドであり、マスト細胞の脱顆粒を惹起することを見出した。慢性特発性蕁麻疹患者の血清中に hemokinin-1 は、検出された。すなわち、MrgX2 は慢性特発性蕁麻疹患者のマスト細胞に高発現することにより、症状の増悪に深く関与していることが示唆された。

#### 2) RA 患者の病変滑膜マスト細胞における COX1, COX2, LTC4S 及び TBXAS1 の病態への関与の解析

Fc 受容体を介する刺激で RA 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 RA の病態にどのように関与しているのかを検討している。RA 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。実際に関節液中の PGD<sub>2</sub> 量を測定すると、RA 患者で有意に高いことが分かった。PGD<sub>2</sub> 受容体および PGD<sub>2</sub> 合成酵素の欠損マウスを用いた研究から PGD<sub>2</sub>、特に HPGDS 由来の PGD<sub>2</sub> は炎症の抑制効果を持つことが示されている。その機序としては① PGD<sub>2</sub> が樹状細胞表面の DP1 を介して

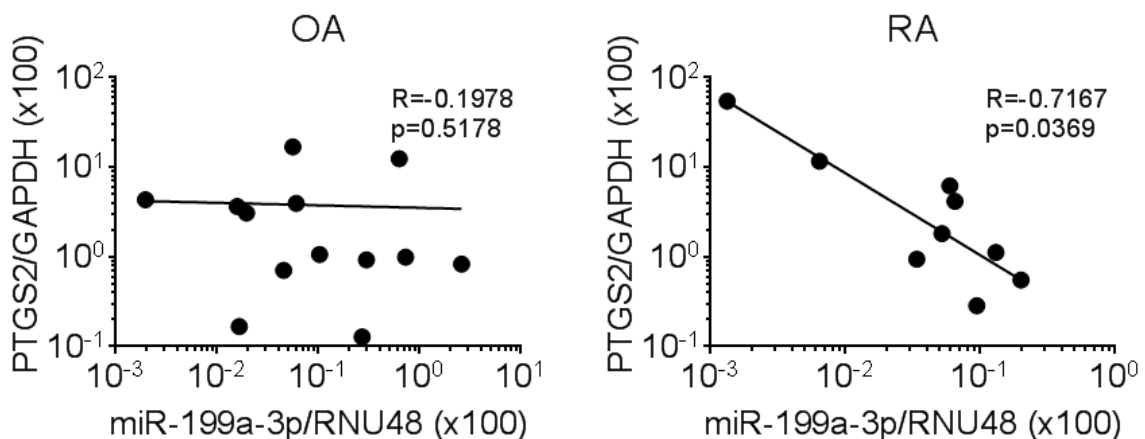


図 1 OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における miR-199a-3p と PTGS2 発現量の相関

樹状細胞の遊走と機能を抑制し、結果としてT細胞機能を抑制すること、② PGD<sub>2</sub>の分解産物である15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) が peroxisomeproliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  依存性および非依存性の系を介して好中球の遊走を抑制することによって炎症を抑制すること、③ 炎症の際にT細胞とB細胞から産生されるIL-10を増加させ、マクロファージから産生される炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ を低下させることが示唆される。実際、関節炎マウスモデルにおいて、PGD<sub>2</sub>受容体の阻害薬、PGD<sub>2</sub>受容体欠損マウスを用いた報告からもPGD<sub>2</sub>は炎症抑制効果をもつことが示唆される。これらの報告と本研究の結果から、RA患者マスト細胞が免疫複合体の刺激によって過剰なPGD<sub>2</sub>を産生することにより、RAの炎症を抑制している可能性が示唆された。

#### 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た。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28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) 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 Fc $\gamma$  receptor I and Fc $\gamma$  receptor II. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):109-19.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2178-83.
- 5) Kan JI, Mishima S, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, et al. Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Allergol Int.* 2016;65(Suppl):S11-16.
- 6) 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 Fc $\epsilon$ RI. *Blood.* 2003;102(7):2547-54.