

## 難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発

岡山吉道<sup>1)</sup>, 豊島翔太<sup>1)</sup>, 鐘ヶ江佳寿子<sup>1)</sup>, 布村 聡<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>2)</sup>, 浅野正岳<sup>3)</sup>, 千島史尚<sup>1)</sup>, 斎藤 修<sup>1)</sup>, 山本樹生<sup>1)</sup>, 菅井和子<sup>4)</sup>, 松本健治<sup>5)</sup>, 村上 誠<sup>6)</sup>, 伊崎聡志<sup>1)</sup>, 西盛信幸<sup>1)</sup>, 遠藤嵩大<sup>1)</sup>, 藤澤大輔<sup>1)</sup>, 柏倉淳一<sup>1)</sup>, 葉山惟大<sup>1)</sup>, 藤田英樹<sup>1)</sup>, 坂本朋美<sup>1)</sup>, 羅 智靖<sup>1)</sup>, 長澤洋介<sup>1)</sup>, 岩田光浩<sup>1)</sup>, 北村 登<sup>1)</sup>, 武井正美<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>, 照井 正<sup>1)</sup>

## Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Shouta TOYOSHIMA<sup>1)</sup>, Kazuko KANEGAI<sup>1)</sup>, Satoshi NUNOMURA<sup>1)</sup>, Kyoko TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Masatake ASANO<sup>3)</sup>, Fuminao CHISHIMA<sup>1)</sup>, Shu SAITO<sup>2)</sup>, Tatsuo YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Kazuko SUGAI<sup>4)</sup>, Kenji MATSUMOTO<sup>5)</sup>, Makoto MURAKAMI<sup>6)</sup>, Satoshi IZAKI<sup>1)</sup>, Nobuyuki NISHIMORI<sup>1)</sup>, Takahiro ENDO<sup>1)</sup>, Daisuke FUJISAWA<sup>1)</sup>, Jun-ichi KASHIWAKURA<sup>1)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>, Hideki FUJITA<sup>1)</sup>, Tomomi SASAKI-SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Chisei RA<sup>1)</sup>, Yosuke NAGASAWA<sup>1)</sup>, Mitsuhiro IWATA<sup>1)</sup>, Noboru KITAMURA<sup>1)</sup>, Masami TAKEI<sup>1)</sup>, Shuuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

## 要旨

1. OAおよびRA患者の滑膜組織マスト細胞はIL-17Aの主要な産生細胞でないことを確認した。
2. ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞および培養脱落膜マスト細胞のプロテアーゼの発現パターンは, tryptasehighchymaselowのMCTCタイプであり, ヒスタミン産生能を有していた。
3. 慢性特発性蕁麻疹患者の血清において, 抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体はFcεRIを架橋する能力を有していることから, 慢性特発性蕁麻疹の病態に関与していることが示唆される。
4. ヒトEBV感染hu-NOGマウスでは, EBV感染によりB細胞にヒトRANKL発現が誘導され, ヒト破骨細胞の分化および活性化が異常亢進し, 関節に骨びらんを形成することが示唆された。
5. Liquid covered culture したヒト気管支上皮細胞と気道上皮前駆細胞である基底細胞株VA10をdsRNA, ATPで刺激した結果, コントロールと比較してTrans Electric Resistanceを減弱させ, 傍細胞透過率を増加させた。

## 1. はじめに

罹患率が増加し社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患は, 遺伝因子と環境因子が複雑に関与した多因子疾患である。近年, 疾患モデル動物の解析により免疫・アレルギー疾患の病態の解明が進み治療法の開発が進んでいるが, 未だに既存の治療法では効果が少ない難治例が存在する。難治例の病態解明には, 個々の疾病の臨床検体からの取り組みが

必須である。本事業は, 免疫・アレルギー疾患を扱う六つの臨床各科のベツトサイドから得られた臨床検体を基に臨床医, 免疫・アレルギー学者と生物学者が連携し研究拠点を形成し, 難治性免疫・アレルギー疾患の予防と治療に資する研究を行うことを目的とした。具体的な目的は, 1. 免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明 2. 感染による関節リウマチ, 気管支喘息の発症と増悪の

1) 日本大学医学部  
2) 日本大学生物資源科学部  
3) 日本大学歯学部  
4) 国立病院機構福山医療センター小児科  
5) 独立行政法人国立成育医療研究センター  
6) 公益財団法人東京都医学総合研究所  
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp  
照井 正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

機序の解明である。

また、各分野の研究に際して倫理的配慮を行っている。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定に定める学長の確認を受けて実施している。

以下に各領域の研究の概要について述べる。

## 2. 整形外科領域

### 関節リウマチ滑膜マスト細胞におけるIL-17Aの発現

**背景：**Interleukin (IL) -17Aは、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態においてreceptor activator for NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の発現を誘導し破骨細胞の分化を亢進させ過剰な骨破壊を生じさせている。RAや変形性関節症 (osteoarthritis; OA) 患者の滑膜組織マスト細胞は、IL-17Aを発現していると報告されているが、そのIL-17Aの発現頻度は報告により様々である。また、ヒトマスト細胞からIL-17Aが産生されるという報告はあるが詳細は不明である。

**目的：**OAおよびRA患者の滑膜組織マスト細胞におけるIL-17Aの発現頻度について検討することと、各種刺激によって滑膜マスト細胞からIL-17Aが産生されるかどうかについて検討することを目的とした。

**方法：**RAおよびOA患者の人工膝関節置換術によって得られた滑膜組織を、免疫組織化学染色を行い共焦点顕微鏡で観察し陽性細胞数を数えた。RAおよびOA患者の滑膜組織から培養マスト細胞を樹立し、各種刺激後の滑膜培養マスト細胞におけるIL-17AのmRNAの発現とマスト細胞 (マスト細胞数を $10^5$ 個/100  $\mu$ lとした) からのIL-17Aの産生をそれぞれmicroarray解析および定量的reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) とenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で定量化した。

**結果：**全マスト細胞数中のIL-17A陽性細胞数頻度、全IL-17A陽性細胞数中のIL-17A陽性マスト細胞数頻度はOAとRA患者の滑膜において有意差を認めなかった。OAにおいて全IL-17A陽性細胞数中のIL-17A陽性マスト細胞数頻度は25%、RAでは8%であった。培養滑膜マスト細胞は、構成的に少量(10~20 pg/ml)のIL-17Aを分泌していたが、IgEおよ

びIgG依存性刺激、IL-33, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), complement component 5a (C5a), lipopolysaccharide (LPS), IL-23+IL-1 $\beta$ の刺激によってIL-17A産生の増加はみられなかった。

**結論：**滑膜マスト細胞は、RAにおけるIL-17の主な産生細胞ではないと考えられた。

## 3. 婦人科領域

### ヒト脱落膜マスト細胞の特徴と培養ヒト脱落膜マスト細胞の樹立

**背景：**母体にとって胎児は父親の抗原を有するsemi-allograftと考えられるが、胎児は拒絶されず妊娠は維持される。これには胎盤の母体側すなわち脱落膜で免疫寛容をはじめとする妊娠維持機構が成立していると思われる。脱落膜natural killer (NK) 細胞、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞は妊娠で重要な役割を演じていることが示され、子宮マスト細胞も着床、胎盤形成および子宮収縮に関与していることが、げっ歯類の研究で示唆されているが、ヒト子宮マスト細胞の妊娠における役割に関しては不明な点が多い。

**目的：**基礎的な検討としてヒト脱落膜組織におけるマスト細胞の特徴を解析し、脱落膜組織より培養マスト細胞を樹立することを目的とした。

#### 対象と方法：

##### (1) 妊娠脱落膜由来マスト細胞の分離

ヒト脱落膜由来マスト細胞は、妊娠初期では、妊娠初期の患者が人工妊娠中絶術を施行された際にその組織の一部から採取した。ヒト脱落膜マスト細胞の組織を酵素処理し細胞を分散した後、単核細胞層をパーコール比重遠心法にて回収した。

##### (2) ヒト脱落膜由来培養マスト細胞の樹立

採取したマスト細胞をSCFおよびInterleukin (IL)-6, 0.1% bovine serum albumin (BSA), Insulin-Transferrin-Seleniumを含んだIscove methylcellulose mediumに懸濁し、24穴プレート用いて37°C, CO<sub>2</sub> 5%の条件で培養した。2週間毎にSCF, IL-6, メチルセルロース無血清培地を追加した。6週目に細胞を50 ml tubeに回収し、液体培地に移して培養継続した。

(3) フローサイトメトリーによるマスト細胞の解析  
組織から抽出したマスト細胞を検索するため、フローサイトメトリーを用いて検討した。マスト細胞

の表面マーカーとしてCD117 (Kit) と高親和性IgE受容体 $\alpha$ 鎖 (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ), 細胞内マーカーとしてtryptaseとchymaseを染色した。

#### (4) 蛍光免疫組織化学染色法

マスト細胞の局在とその数を調べるため, 脱落膜組織を蛍光免疫組織化学染色した。新鮮凍結切片を作製しHematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い, 脱落膜であることを確認した後tryptaseの染色を行った。

#### (5) 電子顕微鏡による観察

組織は, グルタルアルデヒドと四酸化オスミウム液で固定後エポキシ樹脂に浸透させ, 薄切片を作製し透過型電子顕微鏡を用いて観察した。分離したマスト細胞は固定後, サイトスピンを行い透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

#### (6) マスト細胞のhistamine遊離実験

細胞は1 wellあたり $5 \times 10^2$ 個の濃度で96穴プレートに加え, 抗IgE抗体, 陽性コントロールとして $10^{-6}$ MのA23187を添加し37°C, 30分間インキュベートした。培養上清中のhistamineの測定にはenzyme immunoassay (EIA) kitを用いた。histamine遊離率は, (放出されたhistamine量/未刺激のマスト細胞に含まれる総histamine量)  $\times 100\%$ として算出した。

#### 結果:

##### (1) ヒトの脱落膜の蛍光免疫組織化学染色

蛍光免疫組織化学染色法によって, tryptaseは細胞質に認められた。マスト細胞数は約25個/400倍視野であり, 母体面に多く存在していた。

##### (2) ヒトの脱落膜マスト細胞の分離

妊娠初期中絶検体12例より組織を採取した。採取した検体の妊娠週数は6週から9週であった。脱落膜組織は酵素を用いて細胞を分散した後, パーコールによる比重遠心法で単核細胞層を回収した。脱落膜組織1gあたりキムラ染色陽性マスト細胞数は $14.8 \pm 18.3 \times 10^5$ 個であった。

##### (3) 初期ヒト脱落膜マスト細胞の培養系の樹立

妊娠初期ヒト脱落膜からマスト細胞を分離し, 培養開始後, 12週間目にほぼ100%の純度のマスト細胞が得られた。

(4) 妊娠初期(6週~9週)脱落膜マスト細胞と培養脱落膜マスト細胞におけるtryptaseとchymaseの発現検討

マスト細胞の表面マーカーであるCD117 (Kit) とFc $\epsilon$ RI $\alpha$ に対する抗体を用いて, 妊娠初期脱落膜細胞のフローサイトメーターによる解析を行った。全細胞中のCD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞は $0.3 \pm 0.2\%$  (n = 11)であった。

脱落膜CD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞のフェノタイプを解析するため, 脱落膜CD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞にgateを設定し, CD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞におけるtryptaseとchymaseの発現を検討した。両者の発現を認めたがtryptase発現のMFIが $12.7 \pm 9.3$ に対して, chymase発現のMFIは $4.5 \pm 5.0$ であった。培養脱落膜マスト細胞においてもtryptaseとchymaseの発現は同程度であった。

(5) 妊娠初期(6週~9週)脱落膜マスト細胞と培養脱落膜マスト細胞の電子顕微鏡による観察

両者の細胞の顆粒は格子型が有意であった。

#### (6) 脱落膜組織マスト細胞の機能の検討

脱落膜分離直後マスト細胞および脱落膜組織培養マスト細胞に抗IgE抗体を添加すると濃度依存性にhistamineを遊離した

**考察・結論:** ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞および培養脱落膜マスト細胞のプロテアーゼの発現パターンは, tryptasehighchymaselowのMCTCタイプであった。顆粒も格子型でありMCTCタイプであった。また, IgEによるhistamineの遊離を検討したところ, 濃度依存性にhistamineの遊離が認められ, 脱落膜マスト細胞は培養および分離直後の両者でhistamine産生能があることが確認された。ヒトではhistamineはblastocyteの着床や絨毛の浸潤, 増殖, 接着因子を発現して胎盤の形成に関与しているとされるので, マスト細胞からのhistamine産生はこれらの機能を担うと推察される。本研究で脱落膜マスト細胞の長期培養系を樹立できたことから, この培養系の確立により脱落膜マスト細胞の着床や胎盤の形成, 早産・陣痛・分娩のメカニズムの解明や解析に役立つと考えられる。

## 4. 皮膚科領域

慢性特発性蕁麻疹患者における抗Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖自己抗体および抗IgE自己抗体の機能解析

背景: 慢性特発性蕁麻疹 (CSU) は, 誘発因子が特定できず痒痒と膨疹の消退を6週以上繰り返す蕁麻疹である。CSU患者の血清中には, 皮膚マスト細

胞や好塩基球を活性化させる因子の存在が報告されており、その因子として高親和性IgE受容体(FcεRI)のα鎖およびIgEに対する自己抗体(抗FcεRIα鎖自己抗体, 抗IgE自己抗体)が知られている。このことから、CSUの発症には自己免疫学的な機序が関与している可能性が考えられている。しかしながら、抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体は、健常者や他の自己免疫疾患患者からも検出されているため、実際にCSUの病態にどのように関与しているかは明らかにされていない。本実験では抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体の機能を解析し、CSUにおける役割を明らかにすることを目的とした。

**対象および方法：**CSU患者114名、健常人(NC)55名の血清からIgGを精製し、抗FcεRIα鎖抗体濃度および抗IgE抗体濃度を酵素免疫測定法(ELISA)で測定した。改良型IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法を用い、抗IgE抗体および抗α鎖抗体によるFcεRIの架橋能を測定した。ROC曲線からカットオフ値を求めた。

**結果：**抗FcεRIα鎖自己抗体濃度および抗IgE自己抗体濃度はCSU患者の方がNC群よりも有意に高かった。抗IgE自己抗体によるFcεRIの架橋能はCSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高かった。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は1.153であり、その感度は70.3%、特異度は95.2%であった。抗FcεRIα鎖自己抗体によるFcεRIの架橋能もCSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高かった。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は1.283であり、その感度は57.9%、特異度は80.0%であった。抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体の濃度とFcεRIの架橋能および臨床的なパラメーター(重症度、罹患期間、男女比、年齢など)とは有意な相関を認めなかった。

**考察：**CSU患者において、抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体はFcεRIを架橋する能力を有していることから、CSUの病態に関与していることが示唆される。また、これら自己抗体のFcεRIの架橋能を測定することは、自己抗体が関与するCSUの診断予測に応用できる可能性が考えられる。今後、抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体のFcεRIの架橋能が、CSUの治療にどのような影響を及ぼすかを検討し、CSUの診断・治療に資する研究

を行なって行く予定である。

## 5. 血液膠原病内科領域

### Epstein-Barrウイルスと関節リウマチ

**背景：**我々は、NOD/Shi-scid/γcnul (NOG) マウスに臍帯血由来ヒトCD34陽性造血幹細胞を移植し、免疫系をヒト化したヒト化NOG (hu-NOG) マウスを作製し、Epstein-Barrウイルス(EBV)感染により関節リウマチ(RA)類似びらん性関節炎を発症するモデルの作製に成功した。我々はこれまでに、本マウスモデルにおけるびらん性関節炎の発症機序を検討し、骨びらん形成の主役がヒト破骨細胞であり、マウス骨髄に存在するヒト破骨細胞前駆細胞から破骨細胞が分化し、骨吸収能を持つ成熟破骨細胞に至ることを明らかにした。そこで本年度は、ヒト破骨細胞の分化・活性化機序を解明するために、破骨細胞の分化・活性化に必須となるreceptor activator nuclear factor-κB (RANK) シグナルを誘導するRANK ligand (RANKL)の供給細胞とEBVとの関係について検討を行った。

**対象および方法：**過去の報告に準じてhu-NOGマウスを作製し、EBVをマウス尾静脈から感染させた。EBVはB95-8細胞株あるいはAkata細胞株から産生されるウイルスを、既存の方法で力価測定を行い低力価で用いた。EBV感染後、びらん性関節炎の発症が認められる8~10週でマウス末梢血を採取し、RANKL発現および発現細胞の解析をflow cytometryにより行った。また、提供者の両親から同意を得て採取した臍帯血から分離した単核球とRamos (EBV-negative B-cell lymphoma cell line, ATCC)細胞をEBVと共にin vitroで培養し、マウス末梢血と同様手法によりRANKL発現について解析した。同時に、EBV DNA量をreal-time PCR法で測定した。

**結果：**EBV (B-95-8, Akata)感染hu-NOGマウスの末梢血にヒトRANKL発現が認められ、発現細胞のほとんどがEBVの第一標的となるB細胞であった。EBV未感染マウスではヒトRANKL発現は認められなかった。次に、EBV感染によりB細胞にRANKL発現が誘導されるかどうかを検討するため、臍帯血単核球およびRamos細胞にEBV (B95-8, Akata)をin vitroで感染させたところ、臍帯血のB細胞そしてRamos細胞にRANKL発現が誘導された。両細胞

からは高レベルのEBV DNAが検出され、臍帯血B細胞およびRamos細胞のEBV感染が確認された。

**考察：**以上の結果から、B細胞にEBV感染が成立すると、破骨細胞分化・活性化に必須なRANKLがB細胞に発現し、EBV感染RANKL陽性B細胞が破骨細胞を誘導し関節局所で骨びらんを起こす可能性が考えられ、EBVは破骨細胞の病的分化・活性化を誘導することでRAに関与する仮説が浮かび上がった。今後は、EBVのB細胞RANKL誘導にかかわるEBV関連遺伝子とシグナル伝達の検討を行うと共に、EBV感染hu-NOGマウスに発症するびらん性関節炎形成におけるRANKL陽性B細胞の重要性について検討を行う考えである。一方で、本モデルで、EBVがRA類似びらん性関節炎発症のtriggerとなることは証明できたと考えられるが、RAの自己免疫疾患としての特徴を再現するまでには至っていない。そこで今後、RAと相関を示すHLA-DR4遺伝子を導入したNOGマウスに、同DR4アリルを保有する臍帯血造血幹細胞を移植したヒト化マウスを作製し、EBVを感染させ、これまでのEBV感染hu-NOGマウスと比較を行い、関節炎の程度や自己抗体産生などのRA病態の再現性について検討を行う予定である。

**結語：**ヒトEBV感染hu-NOGマウスでは、EBV感染によりB細胞にヒトRANKL発現が誘導され、ヒト破骨細胞の分化および活性化が異常亢進し、関節に骨びらんを形成することが示唆された。

## 6. 呼吸器内科領域

### 喘息病態における気道上皮バリア調節機構の解析

**背景：**気管支喘息（以下、喘息）患者の気道上皮バリア機能は、健常者と比較して脆弱であることが証明され、喘息の病態形成に上皮バリア機能が重要な役割を担っていることがわかった。上皮バリア機能が形成される初期段階に脆弱化を決定する何らかの機序が存在することが推測される。ウイルス感染は、気道上皮細胞の傷害とそれに伴うバリア機能の破綻を誘導し、喘息を増悪させる。また、ダニアレゲン刺激で気道に産生される細胞外アデノシン三リン酸（adenosine triphosphate；ATP）は、喘息病態形成に関与する内因性の環境因子の一つである。これらの環境因子に対する防御機構である上皮バリアの形成に、気道上皮細胞への分化能を有する基底

細胞が重要な役割を果たしていることがわかってきた。

本研究の目的は、上皮バリア形成の初期段階への環境因子曝露が、その後のバリア脆弱化、さらには喘息病態形成につながりうる分子病態を明らかにすることである。そのために初代ヒト気管支上皮細胞（NHBE）と気道上皮前駆細胞である基底細胞株VA10を用いて、ウイルス感染を模倣するdsRNA刺激やalarminの一つであるATPによる気道上皮バリア形成に及ぼす影響について検討した。

**対象及び方法：**NHBE、VA10は、Transwellに培養液をカバーした状態で3日間培養（Liquid covered culture；LCC）した後、気道上皮細胞の分化を誘導する培養（Air Liquid Interface；ALI）とした。LCC期のNHBEに、基底細胞の形質を持った細胞が存在することを確認するために基底細胞のマーカーであるCK5、CK14、p63の免疫染色を行なった。LCC期のみならずALI期におけるバリア機能（Trans Electric Resistance（TER）、デキストランによる傍細胞透過率）を経時的に測定した。また、バリア形成関連分子であるE-cadherinおよびZO-1などの蛍光免疫染色を行い、dsRNA、ATP刺激によるバリア調節機構への影響も検証した。

**結果：**LCC期のNHBEにCK5、CK14、p63陽性細胞の存在を確認した。そのLCC期のNHBEに対するdsRNA、ATP刺激は、コントロールと比較してTERを減弱させ、傍細胞透過率を増加させた。VA10でも同様の結果が得られ、さらにE-cadherinおよびZO-1の細胞間結合部位での発現を減弱させた。

**考察：**dsRNA、ATPは基底細胞に作用し、気道上皮バリア形成を減弱させる可能性がある。上皮バリア形成の初期段階へのウイルス感染やダニアレゲン曝露が、バリアを脆弱化し、喘息病態の形成に関与する可能性が推測された。

**結語：**今後は、環境因子曝露による上皮バリア機能脆弱化の分子病態を詳細に解析するために、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、標的分子およびシグナル伝達経路を同定し、機能解析を進める予定である。