

自己免疫・アレルギー疾患の難治化における マスト細胞の役割の解明

岡山吉道¹⁾, 豊島翔太¹⁾, 伊崎聡志¹⁾, 遠藤嵩大¹⁾, 柏倉淳一²⁾, 布村 聡³⁾, 中村亮介⁴⁾,
秋山晴代⁵⁾, 鐘ヶ江加寿子¹⁾, 高橋恭子⁶⁾, 葉山惟大¹⁾, 吉原重美⁷⁾, 斎藤 修¹⁾, 照井 正¹⁾

Elucidation of roles of mast cells in the pathogenesis of refractory autoimmune and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Shota TOYOSHIMA¹⁾, Satoshi IZAKI¹⁾, Takahiro ENDO¹⁾,
Jun-ichi KASHIWAKURA²⁾, Satoshi NUNOMURA³⁾, Ryosuke NAKAMURA⁴⁾,
Haruyo AKIYAMA⁵⁾, Kazuko KANEGAE¹⁾, Kyoko TAKAHASHI⁶⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾,
Shigemi YOSHIHARA⁷⁾, Shu SAITO¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

一部の慢性特発性蕁麻疹患者血清中にはIgEに対する自己抗体（抗IgE抗体）あるいは高親和性IgE受容体（FcεRI）α鎖に対する自己抗体（抗α鎖抗体）が存在することが報告されているが、これら自己抗体によるマスト細胞活性化能は明らかにされていない。さらに、これら自己抗体のマスト細胞活性化能と臨床症状との関連性は不明である。そこで、CSU患者の抗IgE抗体、抗α鎖抗体のマスト細胞活性化能と臨床的特徴の関連性およびその役割を調べることを第一の目的とした。ウイルス感染は、喘息発作の誘因であり喘息の難治例では、感染型喘息も多く、ウイルス感染はその重要な誘因である。そこでRSウイルスによるヒトマスト細胞の活性化機序を明らかにすることを第二の目的とした。慢性特発性蕁麻疹患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、健常コントロール群と比較して有意に高値であり、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た。マスト細胞にRSVを暴露すると、おそらくRSVがマスト細胞に接着し、これによってIgE依存性のIL-8産生を増強させた。従ってRSVによる急性細気管支炎罹患時にアレルゲンに暴露されると気道炎症が増強されることが示唆された。

1. はじめに

免疫・アレルギー疾患の難治化の病態解明、さらには難治例の治療薬の開発には、疾患モデル動物の解析のみならず、重症患者の組織、血液や鼻汁などを用いた病変部の直接的な解析が必須である。慢性特発性蕁麻疹（chronic spontaneous urticarial; CSU）や気管支喘息の難治化は、患者のQOLを著しく低下させることから社会的な問題となっており、高額な医療費が掛かる点から医療経済学的にも解決すべき課題となっている。

CSUは、原因が不明な6週間以上持続する蕁麻疹であり、マスト細胞の活性化が病態の本態であるが、マスト細胞の活性化機構は解明されていない。私達は、CSUに関しては、substance Pの新規受容体MrgX2が重症CSU患者のマスト細胞に高発現していることおよびsubstance Pのみならず好酸球顆粒タンパクが皮膚マスト細胞上のMrgX2を介して活性化することを報告した¹⁾。一方、CSU患者血清の5～10%にIgEに対する自己抗体（抗IgE抗体）、30～45%に高親和性IgE受容体（FcεRI）α鎖に対す

1) 日本大学医学部
2) 北海道大学大学院薬学研究院衛生化学研究室
3) 佐賀大学医学部分子医化学分野
4) 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学
5) 帝京平成大学薬学部薬学科
6) 日本大学生物資源科学部
7) 獨協医科大学医学部小児科
岡山吉道：okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

る自己抗体（抗 α 鎖抗体）が存在することが報告されているが、これら自己抗体によるマスト細胞活性化能は明らかにされていない。さらに、これら自己抗体のマスト細胞活性化能と臨床症状との関連性は不明である。そこで、CSU患者の抗IgE抗体、抗 α 鎖抗体のマスト細胞活性化能と臨床的特徴の関連性およびその役割を調べることを第一の目的とした。

気管支喘息・喘鳴に関しては、乳幼児の反復喘鳴を起こすbiomarkerとして鼻汁中のMIP-1 α が有意に高いこと、初回喘鳴の段階ですでに鼻汁中にマスト細胞のメディエーターであるtryptaseやRSVウイルス（RSV）に対するIgE抗体が存在している例があることを発見した²⁾。ウイルス感染は、喘息発作の誘因であり喘息の難治例では、アレルゲンの明らかでない所謂、非アトピー型喘息（感染型喘息とも言う）も多く、ウイルス感染はその重要な誘因である。そこでRSVによるヒトマスト細胞の活性化機序を明らかにすることを第二の目的とした。

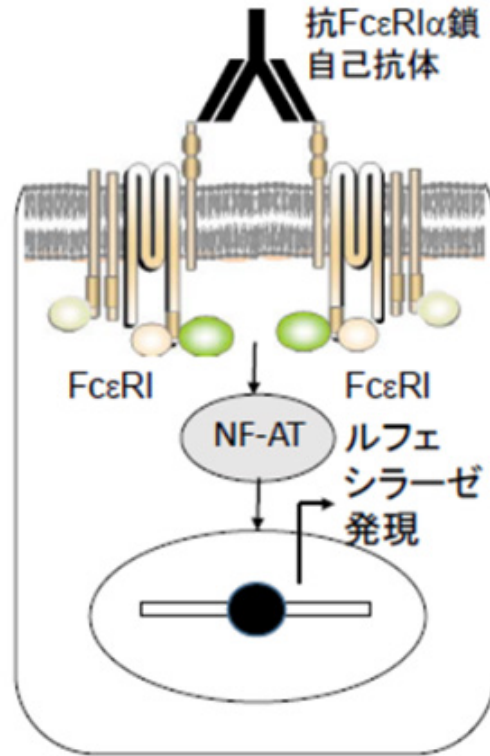


図1 改良型EXiLE法の原理

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（RK-15908-12, RK-160112-2およびRK-100910-11）。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

対象：CSU患者108人、健常者コントロール（NC）56人の血清からIgG分画を精製した。

抗IgE抗体、抗 α 鎖抗体濃度の測定：酵素免疫測定法により、精製IgG分画中の抗IgE抗体および抗 α 鎖抗体濃度を測定した。抗 α 鎖抗体のIgG1分画とIgG4分画およびavidityも測定した。

抗 α 鎖抗体および抗IgE抗体によるFcεRIの架橋能の測定：IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) 法を用い、CSU患者群とNC群の抗 α 鎖抗体および抗IgE抗体によるFcεRIの架橋能（マスト細胞活性化能）を測定し、それぞれを比較した。図1は、改良型EXiLE法の原理である。ラット好塩基球白血病細胞にヒト高親和性IgE受容体FcεRIとNF-AT-responsive ルシフェラーゼreporter遺伝子を強制発現させた細胞を用いると抗FcεRI α 鎖自己抗体によるFcεRIの架橋能を簡便かつ高感度に測定できる。抗IgE自己抗体の場合、IgEで感作した後、

患者の精製IgGを添加する。

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³⁾。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球からlineage negative細胞（CD4⁻, CD8⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD16⁻, およびCD19⁻細胞）を分離した後、臍帯血ではCD34⁺細胞を分離した後、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は、滑膜組織から分離培養した⁴⁾。できるだけ新鮮な滑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 medi-

um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。

RT-PCR：ヒト培養マスト細胞にRSV (long strain, ATCC[®], Manassas, VA)を添加した後、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 mg/mL oligo (dT₁₂₋₁₈) 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。RSV Fusion (F) proteinのprimerとprobeは、F, 5'-GCCAGAAGAGA ACTACCAAGGTTTAT-3'; R, 5'-CTGGCGATTGCAGATCCAA-3'; probe, 5'-ACCAAAAAACCAATGTAAC-3'を使用した。GAPDHおよびIL-8のprimerとprobeは、Applied Biosystems社 (Foster City, CA) から購入した。

免疫化学組織染色による解析：ヒト培養マスト細胞にRSVを添加し、RSV Fタンパク質に対する抗体を用いた免疫染色を行った。ヒト培養マスト細胞を固定して、膜の穴あけをした後、FITC標識抗RSV Fタンパク質モノクローナル抗体 (IMAGEN[™], Dako-Cytomation, Glostrup, Denmark) およびアイソタイプコントロールマウスIgG1とインキュベートした。

マスト細胞の活性化：IgE感作したヒト培養マスト細胞にRSVを添加し、3時間インキュベートした後、細胞を洗浄した。その細胞を0.1, 1.0, 10 mg/mlの抗FceRIa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^{-6} M)で30分間あるいは24時間刺激した。ヒスタミン遊離とPGD₂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24時間刺激後、細胞上清を回収した。

脱顆粒, PGD₂産生, サイトカイン産生測定：ヒスタミン遊離とPGD₂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は、Mann-Whitney U testまたはFisher's exact testを用いた。in vitroの実験の群間の統計学的解析は、Two-way ANOVA and Sidak's testsを用いた。 $P < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞活性化機構の解明 慢性蕁麻疹 (CSU) 患者における抗IgE自己抗体および抗FceRIa鎖 (α 鎖) 自己抗体の臨床的意義

抗IgE抗体濃度は、CSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高値だった ($P < 0.0001$, cutoff value: 0.558 mg/mL)。抗IgE抗体濃度のcutoff値以上と未満のCSU患者の臨床的特徴を比較すると、cutoff値以上の患者で罹病期間が有意に長かった。抗 α 鎖抗体濃度は両者間に統計学的な有意差はなかった。EXILE法によるマスト細胞活性化能はCSU患者群の抗IgE抗体の方がNC群よりも統計学的に有意に高値であった ($P = 0.0106$, 図2)。抗 α 鎖抗体のIgG1/IgG4比はCSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高値だったが、avidityには有意差はなかった⁵⁾。

感染型気管支喘息におけるマスト細胞活性化機構の解明 RSウイルス暴露によるヒトマスト細胞からのIgE依存性のIL-8産生の増強

RSVを暴露したマスト細胞においてRSV Fタンパク質は検出されず、RSV RNAの増幅も見られなかった。RSVの暴露によってマスト細胞からのIgE依存性ヒスタミン遊離の増強はみられなかったが、刺激12時間後にIgE依存性のIL-8 mRNAの発現は増強され、刺激24時間後にIgE依存性のIL-8産生は増強された。

4. 考察

CSU患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC群と比較して有意に高値であったことから、CSU患者群の抗IgE抗体は、NC群と何か質的な違いがあることが示唆された。CSU患者において抗IgE抗体濃度と抗IgE鎖抗体によるマスト細胞活性化能には相関がなかったことから抗IgE抗体の一部がマスト細胞活性化能を有していることが示唆された。マスト細胞活性化能の機序としては、抗IgE抗体のエピトープの違い、avidityの違いやアイソタイプの違いなど様々な要因の結果である。

RSVは、ヒトマスト細胞に感染しないが、ヒトマスト細胞表面上のCX3CR1やTLR4を介して接着して細胞の活性化を増強した可能性がある。

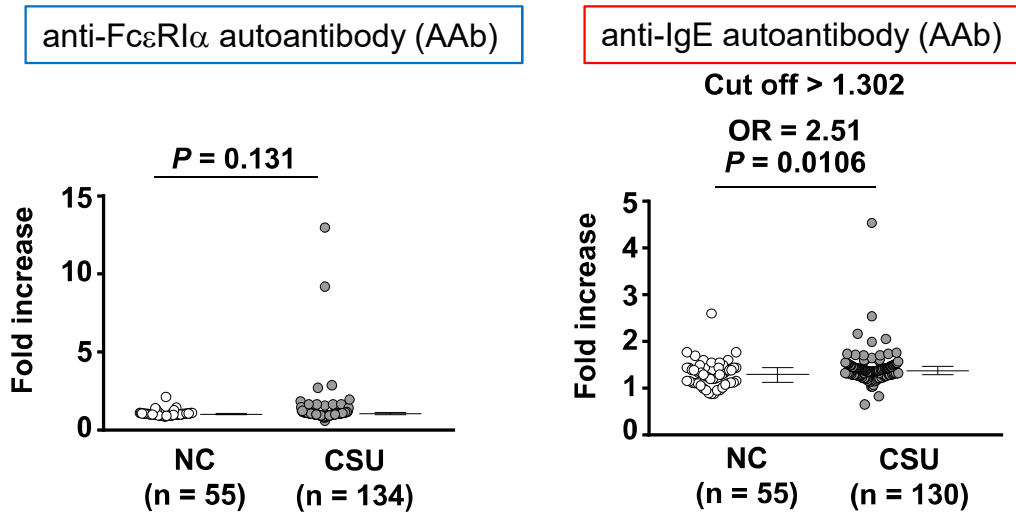


図2 抗 α 鎖抗体と抗IgE抗体によるマスト細胞活性化能
CSU患者の抗IgE自己抗体によるFceRIの架橋能がNC群に比較して有意に高いことが判明した(B)。
非刺激のfold increaseを1とした。

5. 結語

1. CSU患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC群と比較して有意に高値であり、CSUの病態に関与していることが示唆された。
2. マスト細胞にRSVを暴露すると、おそらくRSVがマスト細胞に接着し、これによってIgE依存性のIL-8産生を増強させた。従ってRSVによる急性細気管支炎罹患時にアレルギーに暴露されると気道炎症が増強されることが示唆された。

謝辞

本研究の成果は、平成30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) Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, 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* 134:622-33 e9, 2014.
- 2) Sugai K, Kimura H, Miyaji Y, et al. MIP-1alpha level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 137:774-81, 2016.
- 3) Saito H, Kato A, Matsumoto K, et al. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 1:2178-83, 2006.
- 4) Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura JI, et al. The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergol Int* 66S:S9-S20, 2017.
- 5) Izaki S, Toyoshima S, Endo T, et al. Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FcepsilonRI cross-linking, as compared to anti-FcepsilonRIalpha AAbs. *Allergol Int*, 2019 In press.