

慢性特発性蕁麻疹 (CSU)患者において、 hemokinin-1 は ヒトマスト細胞の脱顆粒を惹起する

Hemokinin-1 induces degranulation of human mast cells in patients with chronic spontaneous urticaria (CSU)

西盛信幸^{1), 2), 3)}、 豊島翔太^{1), 2), 4)}、 鐘ヶ江佳寿子^{1), 2), 4)}、 坂本朋美^{1), 2), 4)}、 柏倉淳一⁵⁾、 布村 聡⁶⁾、 遠藤嵩大^{1), 2), 3)}、 藤澤大輔^{1), 2), 3)}、 葉山惟大^{1), 2), 3)}、 藤田英樹^{1), 2), 3)}、 羅 智靖⁷⁾、 照井 正^{1), 2), 3)}、 岡山吉道^{1), 2), 4)}

Nobuyuki NISHIMORI^{1), 2), 3)}, Shota TOYOSHIMA^{1), 2), 4)}, Kazuko KANEGAE^{1), 2), 4)}, Tomomi SAKAMOTO^{1), 2), 4)}, Jun-ichi KASHIWAKURA⁵⁾, Satoshi NUNOMURA⁶⁾, Takahiro ENDO^{1), 2), 3)}, Daisuke FUIAWA^{1), 2), 3)}, Koremasa HAYAMA^{1), 2), 3)}, Hideki FUJITA^{1), 2), 3)}, Chisei RA⁷⁾, Tadashi TERUI^{1), 2), 3)}, Yoshimichi OKAYAMA^{1), 2), 4)}

¹⁾日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、²⁾日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、³⁾日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、⁴⁾日本大学医学部 IR・医学教育センター、⁵⁾北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学講座、⁶⁾佐賀大学医学部 分子医化学分野、⁷⁾日本大学医学部 微生物学教室

[要旨]

CSU 患者の一群で、HK-1 が蕁疹を惹起していることが示唆された。この群は、自己抗体が原因となる蕁麻疹群とは別の群の可能性がある。

[背景]

最近、神経伝達を担うタキキニン類神経ペプチドの一つであるサブスタンス P (Substance P: SP)が、CSU 患者の血清中で有意に増加し、SP 濃度と重症度との間に正の相関関係があることが報告され、^{1), 2)} SP が CSU の病因の一つであることが示唆された。また、我々は、Mas-related gene X2 (MrgX2)が SP の受容体であり、UAS7 が³⁾ 30 以上の重症 CSU 患者において、皮膚マスト細胞における MrgX2 の発現が有意に増強していることを報告した。³⁾ SP とヘモキニン-1(Hemokinin-1: HK-1)は、11 個のアミノ酸からなり、N 末端側に 6 個の共通のアミノ酸を有している。とりわけ、HK-1 は、その他のタキキニン類神経ペプチドとは異なり、血球系の細胞が産生源であるという特徴を有し、がん細胞の浸潤や動脈圧降下などに寄与することも知られているが、⁴⁾ CSU への関与は不明である。

[目的]

CSU 患者における HK-1 の役割を明らかにすること。

[対象および方法]

(1) 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およびRK-160112-2)。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。

(2) プロトコール

日本大学医学部附属板橋病院皮膚科を受診したCSU患者68名と対照群(健常コントロール、normal control: NC)44名から採血し血清を分離した。さらに、血清からC-18カラムを用いてペプチドを抽出した。血清中のペプチド濃度を5倍に濃縮し、このペプチド溶液をHK-1およびSPの測定に用いた。HK-1濃度と抗FcεRIα鎖自己抗体濃度および抗IgE自己抗体濃度を比較した。またヒトマスト細胞を培養し、HK-1刺激によるヒトマスト細胞からのヒスタミン濃度を測定した。

(3) ヘモキニン、SP、ヒスタミンの測定

HK-1、SPおよびヒスタミンの測定は、酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)を用いた。

(4) 抗IgE自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EXを用いて、患者の血清からIgG分画を精製した。maxisorp plateに1 μg/mLのヒトIgE、myelomaを100 μL添加し、4°Cで一晩静置して固相化した。洗浄液(Tween 20を0.1% になるように加えたTBS)でプレートを4回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、100μLのブロッキング液(FBSをPBSに溶解し10% FBSとした)を加え、室温で1時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを4回洗浄した。PBSで10倍に希釈した精製IgG分画を100 μL加え、室温で2時間静置した。洗浄液でプレートを4回洗浄し、PBSで1万倍に希釈したhorseradish peroxidase(HRP)標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体を100 μL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液でプレートを4回洗浄した後、3、3'、5、5'-tetramethylbenzidine(TMB) microwell peroxidase substrate systemを用い発色させた。2N H₂SO₄で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectrometerを用いて、450 nmの吸光度を測定した。また定量的に行うために、ヒトIgGを倍々希釈し、HRP標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度

をELISAで測定した。プレート間の補正のため、この基準となる精製IgGの抗IgE抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度を算出した。

(5) 抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度測定

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μg/mL のリコンビナント可溶性 α 鎖を 100 μL 加え、4°Cで一晩静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 FcεRIα 抗体(clone CRA2)を用いて作成した。

(6) ヒトマスト細胞の培養

ヒトマスト細胞は皮膚および関節滑膜から精製し、stem cell factor(SCF)とinterleukin(IL)-6を用いて培養した。

(7) マスト細胞脱顆粒実験

Plateにマスト細胞を播種し、1 μg/mLのヒトIgEを加え感作した。刺激した細胞を回収し、qRT-PCR用 plateへ分注し、試薬(HK-1、SP、抗ヒトIgE抗体、A23187)を加え反応させた後、ヒスタミン濃度をenzyme immunoassay(EIA)法で測定した。

(8) 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7(MDF, Tokyo, Japan)を使用した。2群間の連続変数はMann-Whitney *U* test、非連続変数は2-sided Fisher's exact testを行った。相関関係はSpearman's rank correlation testおよび3群間の解析はone way ANOVAもしくはtwo way ANOVAを行った。*p*値は、0.05未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果]

CSU 患者 68 名中 12 名(17.6%)において、HK-1 が検出され、一方 NC では HK-1 は感度以下 (5 pg/mL)であった。HK-1 は、NC よりも CSU の方が統計学的に有意に高かった (*p* = 0.0089)。CSU 患者において血清 HK-1 濃度と抗 FcεRIα 自己抗体濃度に負の相関関係がみられた。血清 HK-1 濃度と抗 IgE 自己抗体濃度との相関は認められなかった。また、HK-1 は濃度依存性にヒトマスト細胞からヒスタミンの脱顆粒を惹起した。

[考察]

CSU 患者群の血清中 HK-1 濃度は NC と比較し有意に高く CSU 患者群の HK-1 濃度は抗 α 鎖自己抗体と負の相関を持ち、抗 IgE 自己抗体濃度と相関しない。ヒト皮膚マスト細胞は MrgX2 受容体を介し HK-1 濃度依存性にヒスタミン遊離する、ということが

明らかになった。これらの結果から HK-1 は自己抗体とは独立した機序で CSU の病態に関与する可能性が示された。また HK-1 は SP 同様に MrgX2 を介してヒスタミン遊離を惹起しえるので、ヒト皮膚マスト細胞上の MrgX2 は、CSU の予防や新規治療のターゲットとなる可能性が示された。

[結論]

CSU 患者の一群で、HK-1 が MrgX2 を介し濃度依存性にヒトマスト細胞からのヒスタミンを遊離させた。CSU 患者において血清中 HK-1 濃度は NC 群と比較し有意に高値であった。また HK-1 濃度と抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度との間に負の相関がみられ、自己抗体が原因となる蕁麻疹群とは別の群の可能性があると示唆された。

[参考文献]

- 1) Metz M, Krull C, Hawro T, Saluja R, Groffik A, Stanger C, Staubach P, Maurer M: Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. *J Invest Dermatol.* 2014; 134: 2833-2836.
- 2) Zheng W, Wang J, Zhu W, Xu C, He S: Upregulated expression of substance P in basophils of the patients with chronic spontaneous urticaria: induction of histamine release and basophil accumulation by substance P. *Cell Biol Toxicol.* 2016; 32: 217-228.
- 3) Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, Kuroda K, Nunomura S, Hayama K, Terui T, Ra C, Okayama Y: 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: 622-633.
- 4) Borbély É, Helyes Z: Role of hemokinin-1 in health and disease. *Neuropeptides.* 2017; 64: 9-17.