

論文の内容の要旨

TNF 受容体スーパーファミリーの 4-1BB と 高親和性 IgE 受容体によるマスト細胞の共刺激

指導教官 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年入学 医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻 学生証番号 41-27458

西本 創

I 型アレルギーにおいて最も重要な役割を果たすマスト細胞は造血幹細胞から産生されるが、成熟細胞は末梢血中には存在せず、粘膜組織、血管周囲に局在する。表面には高親和性 IgE 受容体 ($Fc\epsilon RI$) が存在し、産生された IgE はこの受容体と結合する (感作)。抗原により架橋された $Fc\epsilon RI$ はマスト細胞内にその刺激を伝達することによりヒスタミンやサイトカインを放出し、瞬時に意識消失を来す程の激しい反応を引き起こす。これまでのマスト細胞の研究はこの $Fc\epsilon RI$ を介したシグナル伝達を中心として行われてきた。

一方、T 細胞は、抗原提示細胞 (APC) によって提示された抗原を、T 細胞受容体を介して認識する (シグナル 1) が、完全な T 細胞の活性化が起こるためには共刺激受容体を介した刺激 (シグナル 2) が必要であることが知られている。このシグナルを欠いた T 細胞はアナジーになるとされる。この共刺激分子 (Co-stimulatory molecule) は大きく 2 つのグループに分けることができ、ひとつは CD28 や ICOS (inducible T cell co-stimulator) を代表とする immunoglobulin super family、そして TNFR (tumor necrosis factor receptor) super family である。しかし、マスト細胞において $Fc\epsilon RI$ を介した刺激にそのような「シグナル 2」が

必要かどうかということとはわかっていない。近年、Fc ϵ RI を介した抗原刺激によってマスト細胞の TNFR super family の 4-1BB (CD137) の遺伝子発現レベルが著明に上昇するということがマイクロアレイを用いた実験で示された。これまで、マスト細胞におけるシグナル伝達の研究は Lyn、Btk、PKC といった細胞内分子についてのみ行われてきた。抗原刺激によってマスト細胞表面に新たに分子を表出することは、その分子がマスト細胞の活性化状態に関与している可能性があると考えられる。

4-1BB が分類されている TNFR super family は、共通のシステインに富む細胞外ドメインを持つことが特徴の I 型膜貫通型受容体で、3 量体を形成している。4-1BB は元々、活性化 T 細胞において刺激によって発現する分子としてクローニングされた。対して ligand である 4-1BBL は II 型膜貫通型受容体で樹状細胞、活性化 B 細胞、活性化マクロファージが表出している。T 細胞において 4-1BB は T 細胞の増殖、サイトカイン分泌を増強する働きがあると報告されている。

しかしマスト細胞における 4-1BB の働きは全く知られていない。そこで今回、4-1BB ノックアウトマウス骨髄由来のマスト細胞 (Bone marrow derived mouse mast cell :BMMC) を用いて Fc ϵ RI の刺激における共刺激の重要性を検討した。

まず、IgE による感作、抗原による Fc ϵ RI の架橋後の 4-1BB、4-1BBL の mRNA 発現レベルを RT-PCR によって調べた所、4-1BB の mRNA 量は感作によりやや上昇し、過去の報告通り抗原刺激によって著明に上昇していた。一方、ligand は刺激後一過性の増強が見られるものの常に発現していた。FACS において観察された蛋白レベルのマスト細胞表面への発現についても同様の結果が得られた。マスト細胞において、抗原により Fc ϵ RI を刺激し 4-1BB が充分に表出された時点で、抗原と同時に 4-1BB 刺激抗体を加えた所、サイトカイン分泌の亢進が見られた。このことから、T 細胞と同様にマスト細胞においても、Fc ϵ RI による「シグナル 1」に対し、4-1BB を介した「シグナル 2」が加わることによって、より強い活性化状態となることが示された。

4-1BB ノックアウトマウス由来の骨髄細胞は IL-3 存在化で野生型と同様に c-kit、Fc ϵ RI 両陽性によって定義されるマスト細胞となったものの、最終的な細胞数が少なかった。この原因として、4-1BB 欠損細胞における細胞死の増加、もしくは細胞増殖の抑制が考えられるが、増殖因子枯渇後の細胞死に両方で差がないのに対し、IL-3、SCF (Stem cell factor) による細胞増殖が 4-1BB 欠損 BMMC では抑制されて

いた。さらに4-1BB欠損BMMCにおいて、IL-6、IL-13、TNF- α 分泌の低下がみられ、ヒスタミン遊離の割合も低下していた。これらはマスト細胞のエフェクター細胞として重要な機能であり、完全な活性化には4-1BBを介した相互作用が必要なことを意味する。

マスト細胞からのヒスタミン遊離を含む脱顆粒、サイトカイン産生には適切な細胞内カルシウム遊離が必要であるが、4-1BB欠損BMMCにおいて、特に低濃度の抗原刺激の場合に低下していた。カルシウム遊離が低下する原因を探るため、BMMCを用いて種々のシグナル伝達分子の活性を調べたところ、SrcファミリーのLynの活性が低下していた。さらにFc ϵ RIの β 鎖にはITAMと呼ばれる、SH2ドメインをリクルートすることによって信号を増強する働きのあるTyrosineを含むモチーフがあるが、野生型では抗原による刺激後、これらの著明なリン酸化が見られるのに対し、4-1BB欠損BMMCでは低下していた。これはLyn欠損BMMCで見られる減少に良く似ている。BtkはTecファミリーに属するPTKでこの活性化を反映するリン酸化も低下していた。Btkによってリン酸化、活性化されるホスホリパーゼC γ (PLC γ)はPIP2を加水分解し、細胞内カルシウム遊離をきたすIP3と、PKCの活性をもたらすDAGを産生する。IP3は小胞体からカルシウムを遊離させる。ここでもBtkの活性低下を受けPLC γ 2のリン酸化低下が認められた。さらに、LAT(linker for activation for T cells)はLipid Raftに存在し、SLP-76、Grb2、PLC γ と複合体を形成することにより、反応の足場を提供していると考えられる。このリン酸化も4-1BB欠損マスト細胞にて低下していた。つまり、Lyn/Btk/PLCというマスト細胞のシグナル伝達で確立されている主要な経路が4-1BBの欠損によって抑制されているといえる。

また、4-1BBの細胞内ドメインにCys-Arg-Cys-Proという配列があり、これはLynと同じSrcファミリーであるLckのbindingモチーフCys-Xaa-Cys-Proに相当する。T細胞において4-1BBはLckと会合していることが報告されているが、マスト細胞におけるLckの発現レベルは非常に低い。そこで、マスト細胞において最も重要なSrcファミリーであるLynと4-1BBの会合を調べたところ、Lynは4-1BBに対する抗体によって免疫沈降した4-1BBと刺激に関係なく会合していることがわかった。

現時点では4-1BBと4-1BBLはお互いに唯一の受容体とLigandと考えられている。従って4-1BBL欠損マスト細胞においても4-1BB欠損細胞と同じ現象が期待される。

そこで 4-1BBL ノックアウトマウス由来の骨髓細胞を用いて同様の実験を行った。細胞増殖の減少、サイトカインの分泌低下、ヒスタミン遊離の抑制といった期待通りの結果が得られたものの、野生型に対する抑制の程度については 4-1BB 欠損マスト細胞と比較して軽いものであった。予備実験のデータは 4-1BBL とは全く別の 4-1BB と接着する分子がマスト細胞によって表出されていることを示唆している。今回、4-1BB と 4-1BBL 欠損マスト細胞の間で観察された違いは、この「新たな 4-1BBL」によるものであると考えられる。

以上のようにマスト細胞の完全な活性化には、今まで考えられていた $Fc\epsilon RI$ を介したシグナル以外にも、co-stimulatory 受容体による近傍の細胞との相互作用が必要であるという事実は、アレルギー疾患をより理解する上で非常に興味深い現象である。また、4-1BB が発現されるピークは即時型の反応よりも遅い遅発型の反応が見られる時期にあり、関連が予想される。