

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト好塩基球の活性化調節

—サイトカインと抗原の役割に関する考察—

指導教員 山本一彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 瀨瀬 力也

アトピー型喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎などのアレルギー性疾患は、抗原によりマスト細胞・好塩基球表面の特異的 IgE 抗体が架橋されて起こる I 型反応に分類される。I 型反応は多く 2 相性の経過をとり、IgE 架橋刺激により直ちに起こる即時相（主にマスト細胞が関与）の後、抗原曝露後 4 ～ 8 時間後に遅発相が出現する。アレルギー疾患患者の検討により、組織に流入した好酸球、好塩基球などの炎症細胞とそれらに由来するメディエーターが遅発相の症状発現に重要な役割を担うと考えられている。近年マウスモデルにおいて遅発相の後に T リンパ球、マスト細胞非依存、好塩基球依存超遅発相も報告され、このような遅発相、超遅発相は、アレルギー疾患の病態に重要な役割を果たす慢性アレルギー性炎症の一局面を示すと考えられる。炎症局所では好酸球、好塩基球、好中球、Th2

リンパ球などの炎症細胞の集積が見られ、炎症細胞と組織に常在する細胞とが何らかの関連を形成していると考えられる。近年の分子標的療法の臨床試験の報告では、好酸球を対象とした抗 IL-5 療法が血液中の好酸球数は激減させるものの喘息症状、気道過敏性の改善には無効と判明した。好中球を対象とした抗 TNF 療法は、重症喘息における気道過敏性の低下に寄与するが、軽症から重症までの幅広い喘息の中心的治療とは言い難い。一方 IgE を中和する抗 IgE 療法はアレルギー性鼻炎や喘息に有効で欧米では臨床使用されており、この事実は慢性アレルギー性炎症の形成に、IgE が深く関与していることを示している。以上総合すると、IgE、および、慢性アレルギー性炎症において局所に遊走する FcεRI 高発現細胞である好塩基球と組織に常在し FcεRI を高発現するマスト細胞が重要な役割を果たしている可能性が推察される。本研究では特に好塩基球に着目し、第 1 章において、アレルギー性炎症局所で産生の増加が認められ、リモデリングへの関与が指摘されている SCF および当研究室で以前報告され、好塩基球に対する独特の活性化パターンが SCF と類似する IGF-I の示す活性化作用を脱顆粒と CD11b・CD69 という代表的な活性化マーカーの点から検討した。第 2 章では、直接的に好塩基球を活性化させない低濃度の抗 FcεRI α 鎖モノクローナル抗体 (CRA-1 抗体) による架橋刺激を行うとそれに引き続く刺激に対する脱顆粒、脂質メディエーターの産生が高まるという priming 作用を検討し、更にヒト臍帯血由来培養マスト細胞との比較も行った。

## 第 1 章

### <方法>

1. ヒト末梢血から好塩基球を分離した。好塩基球を  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  を含有する PIPES 緩衝液に浮遊させ、SCF および IGF-I の各サイトカイ

ンの存在、非存在下で 30 分間 37°C の前処理を行った。その後刺激物質を添加し、45 分 37°C で刺激を行い、遠心後上清を回収した。好塩基球から上清中に放出されたヒスタミンを測定し脱顆粒を算出した。

2. 表面マーカー CD69 解析は、SCF および IGF-I を添加して好塩基球を 24 時間培養した。CD11b 表面発現の解析には、好塩基球を 37°C 30 分間刺激した。CD69 及び CD11b は flow cytometry にて測定した。

< 結果 >

1. SCF による直接の好塩基球脱顆粒は認めなかった。一方、SCF 10 nM で 30 分間前処理を行うと、その後の抗 IgE 抗体、抗 FcεRIα 鎖抗体 (CRA-1)、及び TPA 刺激による好塩基球脱顆粒は有意に増強された。この増強の程度は SCF の濃度および処理時間に依存した。当研究室より既に報告されているが IGF-I は、抗 IgE 抗体、CRA-1 抗体、TPA およびカルシウムイノフォア A23187 による好塩基球脱顆粒を有意に増強した。しかし SCF もしくは IGF-I 前処理を行っても、ケモカイン MCP-1、及び FMLP や C5a によるヒスタミン遊離の増強は認めなかった。以上の結果よりヒスタミン遊離に関し SCF, IGF-I 共に比較的高濃度を必要としており、増強を受ける、受けない刺激の種類が SCF と IGF-I で類似すると考えられた。

2. 好塩基球活性化マーカー CD11b に関しては、1-10 nM の SCF と IGF-I 単独では有意な発現上昇はなかった。しかし SCF 10nM と IGF-I 10nM 同時添加で CD11b 発現は有意に増強した。CD69 発現においても SCF 10 nM と IGF-I 10 nM を同時添加にて有意な発現誘導作用を示したが、SCF あるいは IGF-I の単独では、有意な誘導作用を示さなかった。

3. IL-3 により CD11b, CD69 の発現は強く誘導される。IL-3 と SCF

の間で、CD11bとCD69の発現に協調作用は見られなかった。以上より、SCFは、IGF-Iと協調して、好塩基球の細胞表面活性化マーカー発現を増強するが、IL-3との協調作用は認めない事が示された。

## 第2章

### <方法>

1. 好塩基球の分離は、第1章と同じである。ヒト臍帯血由来培養マスト細胞は、ヒト臍帯血よりCD34陽性細胞を分離し、SCFとIL-6の存在下で10週以上培養したマスト細胞(純度99%以上)を用いた。マスト細胞の刺激反応性を高めるため一部の実験ではIL-4 10 ng/ml添加して4日間培養、次いでヒトIgE 1  $\mu$ g/mlで2時間感作したのち、ヒスタミン遊離刺激を行った。

2. CRA-1抗体により好塩基球をまず60分間前処理し、その後洗浄しIL-3 300 pMで37°C 15分間前処理した後、第1章と同様に45分間37°Cでヒスタミン遊離刺激を行い、上清中に放出されたヒスタミンを測定した。また、上清中のLTC<sub>4</sub>は、EIAキットで測定した。

### <結果>

1. Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖に対するモノクローナル抗体CRA-1は0.1~1.0  $\mu$ g/mlの濃度で好塩基球に対し最大の脱顆粒を起こす。1 ng/mlという低濃度のCRA-1抗体は、IL-3の存在下でも脱顆粒を引き起こさない。しかし1 ng/mlのCRA-1抗体で前処理を1時間行った好塩基球はMCP-1、FMLPによる脱顆粒は有意に増強していた。またMCP-1、FMLPによる好塩基球脱顆粒は、IL-3により増強される事が知られているが、CRA-1抗体前処理により更に有意に増強した。また、CRA-1前処理を行うことで、MCP-1刺激反応閾値の低下(より低い濃度のMCP-1で脱顆粒が起こる)が見られた。一方、脂質メディエーターLTB<sub>4</sub>刺激による脱顆粒は、CRA-1 1 ng/ml単独でもIL-3

単独でも増強されたが、CRA-1 と IL-3 両者の前処理による更なる脱顆粒増強は認めなかった。

2. C5a刺激、TPA刺激、カルシウムイオノフォア刺激に関しては、CRA-1 前処理を行うことで、有意と言える遊離増強は認めなかった。

3. CRA-1 前処理時の濃度検討で、CRA-1 は、10 pg/mlという極めて低濃度から増強作用を示し始め、1 ng/mlにて最大の増強効果を示した。そして、直接的な脱顆粒を示しうる 10 ng/mlの濃度では、逆に増強効果が減少する傾向が見られた。

4. CRA-1 前処理時間について、15分～30分では増強効果は弱いが、60分で十分に増強効果は強まった。

5. CRA-1 と IL-3 は協調的にpriming作用を発揮しMCP-1 による脱顆粒を増強するが、IL-3 の代わりにIL-5、GM-CSFを用いても協調作用がみられた。

6. 脂質メディエーターLTC<sub>4</sub> 産生に関してもCRA-1 前処理は増強効果を発揮した。即ち、FMLP刺激によるLTC<sub>4</sub> 産生は、CRA-1 及びIL-3 両者の前処理を行うことで、飛躍的に高まった。

7. ヒト臍帯血由来培養マスト細胞においては、CRA-1 抗体前処理を加えてもA23187 やTPA刺激で惹起される脱顆粒の増強は見られなかった。

8. IL-4 培養により脱顆粒能を高めた培養ヒトマスト細胞を用いて同様に実験を行ったところ、CRA-1 100 ng/mlの前処理により、TPA 5 ng/ml 及び 10 ng/mlの刺激で惹起されるヒスタミン遊離が軽度ながら有意に増強した。以上より、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞では好塩基球と比べて、CRA-1 抗体前処理による脱顆粒増強作用は起こり難いと考えられた。

< 考察 >

本研究の第1章において、慢性アレルギー性炎症の局所においてリモデリングへの関与が指摘されている SCF と IGF-I が、好塩基球の脱顆粒を増強し、増強を受ける刺激の種類についても独特のレパートリーを示す事が判明した。また、SCF、IGF-I は CD11b, CD69 発現を協調して増加させることが示された。第2章においては、当研究室における最近の知見、即ち微量の抗原刺激により、eotaxin に対する好塩基球の遊走活性の増加や、CD69 活性化マーカーの発現増加に加えて、本研究では更にケモカイン MCP-1 や細菌由来ペプチド FMLP に対する脱顆粒も増強する事が示された。慢性的に微量の抗原に曝露されるアレルギー性炎症部位において、炎症局所の微小環境で認められるサイトカインが相互に、そして更に抗原とも協調しつつ好塩基球の活性化増強作用を発揮すると言う事は、慢性炎症の増悪に好塩基球が直接関わっており、その制御機構に複雑なメカニズムが存在する可能性の一端を示すものと考えられる。慢性アレルギー炎症のメカニズムを詳細に解明する事は、アレルギー疾患の治療戦略を考える上でも重要であり、今後さらなる研究の進展が期待される。