

論文の内容の要旨

論文題目 IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of FcεRI

IgE による FcεRI の凝集を介したマスト細胞の活性化

氏 名 北浦 次郎

高親和性 IgE レセプター(FcεRI)を介したマスト細胞活性化機序の解明はアレルギーの病態解析に不可欠である。長年の研究結果は以下のような定説(今でも基本的に正しい)を導いた。「最初に抗原特異的な IgE がマスト細胞上の FcεRI に結合する準備段階(sensitization)が必要である。この時点においてマスト細胞は活性化されない。次に特異的抗原が IgE に結合し FcεRI を架橋凝集したときマスト細胞は活性化される。」つまり、二段階のステップがマスト細胞の活性化には不可欠であると考えられてきた。しかし、近年、単量体 IgE が FcεRI に結合するだけで引き起される現象に注目が集まった。その代表例は、(Yamaguchi らが報告した)単量体 IgE によりマスト細胞表面の FcεRI 発現量が増加する現象と (Asai, Kitaura らと kalesnikoff らが報告した)単量体 IgE によってマスト細胞の生存が延長する現象である。後者の発表が特に関心を呼んだのは、単量体 IgE の機能の新奇性と、二つのグループにより同一雑誌 (Immunity) に報告された現象の相違点にある。両グループが見出した共通の現象は、増殖因子 (IL-3) を除いたときにおこるマスト細胞(BMMC)のアポトーシスが IgE によって抑制されることであった。kalesnikoff らは、単量体 IgE の刺激によって細胞内シグナル伝達分子が活性化されて各種サイ

トカインが産生されることを示し、IgEによるアポトーシス抑制効果はオートクラインの機序で説明できると考えた。一方、Asai, kitauraらは、同様の実験においてマスト細胞の活性化を示唆する結果を認めなかった。これは従来の単量体 IgE の概念に合致していたが、単量体 IgE による抗アポトーシス効果を説明するには不十分であった。両者の研究結果の相違は何に由来するのか？その疑問に答えることを出発点とし、単量体 IgE の機能とその生物学的意義に迫ることを本研究の目的とした。

両グループが使用した単量体 IgE に注目して、由来の異なる単量体 IgE を複数 (DNP に対するモノクローナル抗体として H1-ε-206, H1-ε-26, SPE-7、dansyl に対するモノクローナル抗体として 27-74、TNP に対するモノクローナル抗体として IgE-3, C38-2, C48-2) を用意して機能を比較した。その結果、単量体 IgE による BMMC のサイトカイン産生が H1-ε-26, SPE-7, C38-2 の刺激によって認められ、特に SPE-7 IgE による産生量は顕著であった。一方、H1-ε-206, 27-74, IgE-3, C48-2 による刺激ではサイトカインの産生量は検出感度以下であった。したがって、単量体 IgE はそのサイトカイン産生能により 2 種類に大別可能で、前者を highly cytokinergic (HC) IgE、後者を poorly cytokinergic (PC) IgE と命名した。

細胞生存延長効果はいずれの単量体 IgE によっても誘導されたが、その程度は PC IgE に比べて HC IgE で強く、HC IgE の中ではサイトカイン産生能と同じく SPE-7 が最強であった。次に、野生型と FcεRIα欠損 BMMC を種々の比率で混合し HC IgE あるいは PC IgE の存在下で両細胞の生存率を調べた結果、HC IgE によるマスト細胞生存延長効果においてのみ産生される液生あるいは膜結合型因子の関与が示された。

さらに、単量体 IgE によるヒスタミン遊離 (脱顆粒)、ロイコトリエンの産生、DNA 合成能を調べたが、いずれも HC IgE においてのみ明らかであった。また、HC IgE によるヒスタミン放出は IgE と抗原による刺激の場合と比較して緩徐で弱かった。以上から、IgE と抗原の刺激によりマスト細胞におこる現象を HC IgE がほぼ再現できること、ただし HC IgE はサイトカイン産生能が高いけれども相対的に脱顆粒を起こしにくいことが示された。また、これらの現象の差異 (PC vs HC IgE) と一致して単量体 IgE の刺激によるマスト細胞内シグナル伝達分子の活性化にも顕著な差が認められた。以上より、単量体 IgE には機能的に大別して二種類の IgE (PC vs HC) が存在して幅広いサイトカイン産生能や細胞生存延長効果を有することが示された。

次に、FcεRI の凝集が単量体 IgE の刺激によっておこるかどうかを確かめるため、Erythrosin でラベルした PC IgE と HC IgE をマスト細胞株 (RBL 細胞) の FcεRI に結合させて、その動きをナノからマイクロ秒の範囲で定量する、time-resolved phosphorescence anisotropy の測定を施行した。これは FcεRI の凝集を直接評価できる方法で、二つの重要な所見、HC IgE のみならず PC IgE でも FcεRI の凝集が自発的に起こること、その凝集の程度は HC IgE の方がはるかに大きいこと、が認められた。この所見は、PC IgE で認められる濃度依存的な (BMMC 表

面における) FcεRI 発現量の上昇が、高濃度の HC IgE では FcεRI の internalization のため抑制される結果とも合致していた。興味深いことに、単量体 IgE による FcεRI の凝集、細胞生存延長効果など上記した機能はすべて特異的なハプテンによって濃度依存的に抑制されるため、単量体 IgE の抗原認識部位の構造に FcεRI を凝集させる要因があると推定された。

また、FcεRI の直下で重要な働きをする二つのチロシンキナーゼ Syk と Lyn の欠損マスト細胞を使って単量体 IgE の機能を調べた。その結果、単量体 IgE により誘導される機能はすべて Syk 欠損マスト細胞において消失した。単量体 IgE(特に PC IgE)による細胞生存延長効果に関しては Lyn 欠損マスト細胞において減弱を認めた。

以上の結果を総合すると、単量体 IgE の刺激によっておこる現象はすべて FcεRI の凝集、およびその下流の Syk チロシンキナーゼの活性化が不可欠であり、PC IgE と HC IgE による現象の差は FcεRI を凝集させる強さに依存していると考えられた。

さらに単量体 IgE が示す細胞生存延長効果を in vivo で検討する実験を施行した。マウスに高い IgE 値を維持させるため腹腔に H1-ε-206 (PC IgE), H1-ε-26 (HC IgE)、コントロールとして IgG2b のハイブリドーマを一定細胞数注入して、2週間後の組織におけるマスト細胞数、および血清 IgE 値を調べた。その結果、胃粘膜や空腸粘膜のマスト細胞数は IgE ハイブリドーマ群で有意に高く、しかも HC IgE ハイブリドーマ群でより高い値を示した。さらにマスト細胞数の上昇と血清 IgE 値の間には相関が認められ、単量体 IgE による細胞生存延長効果が in vivo の系でも示された。

次に、PC IgE、HC IgE、IgE と抗原(IgE + Ag)、IgE と抗 IgE 抗体(IgE + anti-IgE)の刺激によっておこる現象の違いを説明するために、刺激の強さ、凝集の強さを評価する系として FcεRI の internalization に注目した。その結果、Ag あるいは anti-IgE の濃度により internalization の速度は大きく異なること、緩徐な internalization をおこす弱い刺激の際にマスト細胞生存延長効果が認められること、急速な internalization をおこす強い刺激に際して脱顆粒が認められること、サイトカイン産生はその中間から強い刺激により認められることが明らかとなった。Internalization の初速度 (V) を測定すると、V が刺激の強さに相関し、V が高いとき(IgE+high dose Ag) に脱顆粒が、V が低いとき(IgE+low dose Ag)に細胞生存延長効果が、強く誘導された。また、IgE の刺激による internalization は濃度依存的に HC IgE の場合に生じる (PC IgE により誘導されない) ので、単量体 IgE の刺激の強さと internalization の程度も相関していることが示された。

さらにこれらの現象のチロシンキナーゼ Lyn および Syk に対する依存度を調べた結果、以下のことが判明した。IgE による FcεRI の upregulation には Lyn、Syk ともに無関係である。弱い〜中等度の刺激 (IgE+low dose Ag、HC IgE、IgE+anti-IgE) では Lyn 依存的 Syk 非依存的に internalization が、強い刺激 (IgE+high dose Ag) では Lyn 依存度が低下し Syk 非依存的

に **internalization** が生じる。また、種々の刺激によるサイトカイン産生や脱顆粒はすべて **Syk** 依存的である。弱い刺激によるサイトカイン産生には **Lyn** 依存性が認められるが、強い刺激によるサイトカイン産生は **Lyn** 非依存的であり **Lyn** 欠損細胞ではその産生がむしろ亢進する。このように刺激の種類により **FcεRI** を凝集する強さ (**internalization** の速度と相関する) が規定され、シグナル伝達分子 (**Lyn/Syk**) のはたらきとともにマスト細胞の機能 (細胞生存延長効果、サイトカイン産生、脱顆粒) が変化する。単量体 **IgE** の機能解析を通じて、**FcεRI** を介したシグナル伝達機序の一旦が解明された。