

■原著■

CD40 依存性非依存性 IL-4 誘導 Ig クラススイッチの ヒト IgFcγ-IgFcε キメラ蛋白による抑制効果

山田武千代, 高橋 昇, 藤枝 重治

福井大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科

The inhibitory effect of human Ig Fcγ-Fcε chimeric protein on CD40-dependent -and-independent IL-4-induced Class Switch Recombination

Takechiyo Yamada, Noboru Takahashi, Shigeharu Fujieda

Department of Otorhinolaryngology, University of Fukui

ABSTRACT

CD40 plays an important role in B cell proliferation, survival, memory, and Ig class switch recombination (CSR). With the engagement of CD40 on B cells, IL-4 determines Ig CSR to epsilon and in particular, production of IgE that plays an important role in the pathogenesis of allergic diseases. On the other hand, B lymphocyte stimulator (BLyS) has been recently reported to have the ability to induce CD40-independent Ig CSR and plasmacytoid differentiation. We have found that a human Ig Fcγ-Fcε bifunctional chimeric protein (Ig Fcγ-Fcε) inhibited IL-4-induced CSR to epsilon in human B cells. Also, we have previously established a switch vector assay by using GFP as an indicator for substrate switch recombination (SSR) in human B cell line Ramos 2G6. In this study, the inhibitory effect of Ig Fcγ-Fcε on CD40-dependent IL-4-induced CSR was confirmed and quantified by employing this switch vector assay. At the same time, we examined the effect of Ig Fcγ-Fcε on BLyS-dependent IL-4-induced CSR. Ig Fcγ-Fcε inhibited both CD40-dependent and BLyS-dependent IL-4-induced SSR in a dose dependent manner, significantly reducing it at concentrations at or above 5 μg/ml.

Key words: IL-4, class switch recombination, IgE, chimeric protein, B cell, BLyS

Abbreviations: Ig Fcγ-Fcε: human Ig Fcγ-Fcε bifunctional chimeric protein, CSR: class switch recombination, BLyS: B lymphocyte stimulator, SSR: substrate switch recombination

はじめに

CD40 は、B 細胞の増殖、アポトーシス、Ig クラススイッチにおいて重要な働きをしている。B 細胞膜の CD40 が活性化すると、IL-4 の共同作用によって IgE へのクラススイッチが起こり IgE が産生される¹⁾。IgE はアレルギー疾患において最も重要な役割を果たしており、IgE 産生に必須の IgE へのクラススイッチを制御できれば治療に応用できる。

IgE 産生に関与する B 細胞において、CD23 (FcεRII, low affinity trimeric IgE receptor) は以前より IgE 産生を制御していることが報告されている²⁾。ヒトにおいても抗 CD23 抗体にて IgE 産生が抑制され、その効果は IgG の Fc γ domain 依存性である³⁾。つまり、IgG の Fc γ domain に結合する CD32 (FcγRIIA または FcγRIIB) と CD23 の架橋

により IgE 産生が抑制されると考えられる。そこで我々は CD32 に結合する IgG と CD23 に結合する IgE を結合させたヒト IgFcγ-IgFcε キメラ蛋白 (IgFcγ-Fcε) を作製した。

IgFcγ-Fcε は、IgE 受容体 (FcεRI, FcεRII) に結合する IgE Fc 部位とヒト IgG Fc 部位をもつキメラ分子である (図 1A)。抗 CD23 抗体と同様に、CD32 と CD23 を架橋することが可能で (図 1B)、IgE 産生を抑制する可能性がある。実際、ヒト B 細胞を用い、IgFcγ-IgFcε で前処理し、IL-4 及び抗 CD40 抗体で刺激後、ε germline transcripts (εGTs), switch circle transcripts (CTs) の発現を観察し、IgFcγ-IgFcε が IgE へのクラススイッチを減弱させることを証明した⁴⁾。

一方で我々は、IL-4 誘導クラススイッチを定量する系を確立させた⁵⁾。IL-4 誘導クラススイッチが起こると GFP が発現するベクターをヒト B 細胞株 Ramos2G6 に遺伝子導入し、GFP 陽性細胞数の割合よりクラススイッチを定

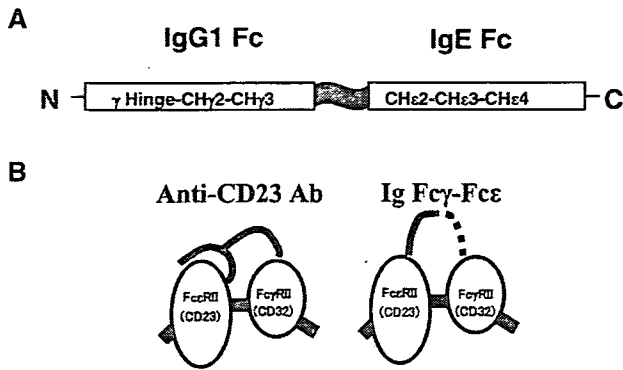


図1 (A) Schematic diagram of a gamma-epsilon fusion protein (Ig Fc γ-Fcε) whose structure is γHinge-CH₂-CH₃-15aa linker-CH_{ε2}-CH_{ε3}-CH_{ε4}. N=n terminal. C=c terminal. (B) Engagement of CD23 and CD32 in B cell by anti-CD23 antibody or Ig Fcγ-Fcε.

量するものである。本実験では、この系を用いて、IgFcγ-IgFcεが、CD40によるIL-4誘導Igクラススイッチを抑制可能か検討した。

最近、TNF ligand スーパーファミリーに属するB Lymphocyte Stimulator (BLyS)がCD40非依存性にIgクラススイッチを誘導することが報告された⁹⁾。IL-4誘導クラススイッチベクターにて、BLySによるIL-4誘導Igクラススイッチへの影響も観察した。

方 法

キメラ蛋白作製 Polymerase Chain Reaction (PCR)により、ヒトIgG Fc部位のCH1からCH3までのcDNAと、IgE Fc部位のCH2からCH4までのcDNAを作製してお互いを結合させ、このキメラcDNAをpAN発現ベクターに組み込んだ。次にエレクトロポレーションにてSP2/0細胞に遺伝子導入し、この細胞をIMDM液(Irvine Scientific, Santa Ana, CA)中でFCSを枯渇させながら10日間培養し、Glutamaxで細胞を死滅させ、1から2リットルの上清を得た。抗ヒトIgE抗体カラムによりIgFcγ-Fcεを精製した⁹⁾。**GFP発現ベクターとクラススイッチ** ヒトS_μとS_γの間にGFPを逆方向に存在させ、クラススイッチが起こるとGFPが発現するベクターをヒトB細胞株Ramos2G6(ATCC, Manassas, VA)にエレクトロポレーションにて遺伝子導入した。Geneticinを用いてセレクションし、細胞をRPMI 1640(2mM glutamine, 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin, 10% FCS)で培養した⁹⁾。**フローサイトメトリー解析** 遺伝子導入されたヒトB細胞株Ramos2G6をIgFcγ-Fcεを前処理し、IL-4(R&D system, Minneapolis, MN)及び抗CD40抗体(ATCC, Manassas, VA)またはBLyS(Human Genome Sciences, Rockville, MD)で刺激した。4日後に、フローサイトメトリーにてGFP陽性細胞の数を定量比較した。

結 果

IgFcγ-Fcεは、分子量約140kDaで2量体を形成する。抗ヒトε chain抗体と抗ヒトγ chain抗体で認識される。FcεはヒトFcεRIを高発現させた細胞を用いて結合能があることを確認した。

最初に、クラススイッチGFP発現ベクター(図2A)を遺伝子導入したヒトB細胞株Ramos2G6を、IL-4(1ng/ml)と抗CD40抗体(0.1μg/ml)で4日間刺激すると、23.2%のGFP陽性細胞がフローサイトメトリーにて確認された。このGFP陽性細胞数はIL-4誘導クラススイッチの頻度を示している。次に、Ig Fcγ-Fcε(5μg/ml)を45分間前処理しIL-4と抗CD40抗体と同様に刺激するとGFP陽性細胞は14.8%に減少した(図2B)。即ち、IL-4誘導クラススイッチをIg Fcγ-Fcεは抑制した。

Ig Fcγ-Fcεを種々の濃度で(1μg/mlから20μg/ml)同様の条件下で作用させると、濃度依存性にCD40によるIL-4誘導クラススイッチを抑制した(図3)。Ig Fcγ-Fcεは、5μg/mlの濃度から有意に抑制し、この濃度はヒトB細胞における抑制効果の濃度と同様であった⁴⁾。

このクラススイッチGFP発現ベクターでは、スイッチ領域が切り出され環状のDNAが生じる場合には、RSV LTRプロモーターによりGFPの発現が誘導される。一方、スイッチ領域が切り出され、逆向きに結合(inversion)した場合には、CMVプロモーターによりGFPが発現されるため、GFP陽性細胞はこの両者を検討した結果である(図2A)。

クラススイッチGFP発現ベクター遺伝子導入されたヒトB細胞株Ramos2G6を、IL-4(1ng/ml)とBLyS(500ng/ml)で4日間刺激すると、GFP陽性細胞が確認された(GFP陽性率16.6%, 図4)。Ig Fcγ-Fcεを種々の濃度で作用させ検討すると、濃度依存性にBLySによるIL-4誘導クラススイッチを抑制した。Ig Fcγ-Fcεは、同様に5μg/mlの濃度から有意に抑制し、抑制効果は50%であった。

考 察

我々は、CD32とCD23を架橋することが可能なIgFcγ-Fcεによって、CD40によるIL-4誘導クラススイッチ並びにBLySによるIL-4誘導クラススイッチを抑制することを、IgクラススイッチGFP発現ベクターを用いて証明した。

CD40は、IgE産生におけるIL-4誘導クラススイッチにおいて重要な働きをしている。一方、SLE⁷⁾やシェーグレン症候群⁸⁾と深く関わっているBLySもIL-4誘導クラススイッチを起こすことから、気道粘膜において何らかの働きをしている可能性がある。

IgFcγ-Fcεは抗原特異的IgEによるヒト好塩基球からの

ヒスタミン放出を抑制する作用がある⁹⁾。マスト細胞や好塩基球の FcεRI は、抗原により受容体が凝集すると Lyn が活性化され、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) の Tyr 残基がリン酸化され、Syk がこの部位に結合し立体構造の変化と Lyn により完全に活性化し、最終的にヒスタミン放出などが起こる (図 5A)。IgG 受容体である FcγRIIb の ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) は、FcεRI からのシグナルを負に制御する。リン酸化チロシン脱リン酸化酵素である SHP-1 とイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素 SHIP を会合させ¹⁰⁾¹¹⁾、IgE と IgG が抗原を共有し、FcεRI と FcγRIIb が会合すると Syk とその下流のシグナルが阻害される (図 5B)。IgFcγ-Fcε はこれと同様の作用があると考えられる。実際、抗原特異的 IgE 架橋による Syk リン酸化の抑制も観察され、ヒト FcεRIα トランスジェニックマウス (マウス FcεRIα ノックアウト) を用いた PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応も IgFcγ-IgFcε 前処置で劇的に減少した⁹⁾。ヒト臍帯血マスト細胞においても、抗原特異的 IgE 架橋によるヒスタミン遊離抑制と TNFα 産生抑制が確認された¹²⁾。

ランゲルハンス様樹状細胞は、抗原により受容体が凝集すると FcεRI 架橋による IL-16 を産生するが、IgFcγ-IgFcε 前処置で FcεRI 架橋による IL-16 産生の抑制効果が認められて

いる¹³⁾。FcεRI は、好酸球、血小板、好中球において αβγ2 の 4 量体構造をしており、単球では、αγ2 の 3 量体構造をしている。IgFcγ-IgFcε の効果は、これらの細胞に対しても作用する可能性がある。ヒト B 細胞における IL-4 誘導 IgE クラススイッチの抑制は CD23 (FcεRII) を介するものであったが、FcεRII は、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞などにも存在し、IgFcγ-IgFcε が何らかの細胞機能に影響を与える可能性もある。

鼻アレルギーや IgE 依存性気管支喘息に代表される IgE 依存性アレルギー反応において、1) IgE 受容体である FcεRI での阻害 (マスト細胞や好塩基球) と、2) IgE 産生抑制 (B 細胞などリンパ球や抗原提示細胞) の二つが特異的制御可能な方法である。IgFcγ-IgFcε は、IgE クラススイッチ抑制と IgE 受容体である FcεRI の活性化阻害の両方の作用があり、新しいタイプのアレルギー治療戦略として期待される。

本研究は米国カリフォルニア大学ロスアンゼルス校臨床免疫学教室との共同研究である。

文 献

- 1) Zhang, K., Clark, E.A., et al.: CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J. Immunol.* 146: 1836-1842, 1991.
- 2) Sutton, B.J., Gould, H.J.: The human IgE network. *Nature* 366: 421-428, 1993.
- 3) Nakamura, T., Kloetzer, W.S., et al.: In vitro IgE inhibition in B cells by anti-CD23 monoclonal antibodies is functionally dependent on the immunoglobulin Fc domain. *Int. J. Immunopharmacol.* 22: 131-141, 2000.
- 4) Yamada, T., Zhu, D., et al.: Inhibition of IL-4-induced Class Switch Recombination by a Human Ig Fcγ-Fcε chimeric protein. *J. Biol. Chem.* 278: 32818-32824, 2003.
- 5) Yamada, T., Zhu, D., et al.: CD45 controls interleukin-4-mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *J. Biol. Chem.* 277: 28830-28835, 2002.
- 6) Litinskiy, M.B., Nardelli, B., et al.: DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat. Immunol.* 3: 822-829, 2002.
- 7) Zhang, J., Roschke, V., et al.: A role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 166: 6-10, 2001.
- 8) Mariette, X., Roux, S., et al.: The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 62: 168-171, 2003.
- 9) Zhu, D., Kepley, C.L., et al.: A novel human immunoglobulin Fc gamma Fc epsilon bifunctional fusion protein inhibits Fc epsilon RI-mediated degranulation. *Nature Medicine.* 8: 518-521, 2002.
- 10) Ono, M., Bolland, S., et al.: Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 383: 263-266, 1996.
- 11) Malbec, O., Fong, D.C., et al.: Fc epsilon receptor I-associated

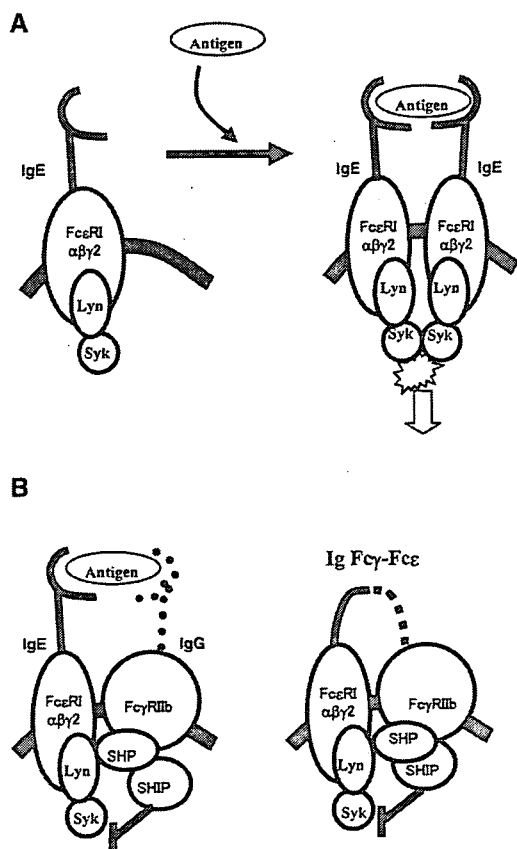


図5 (A) Activation and intracellular-signaling of mast cell by IgE and antigen. (B) Inhibitory signaling through FcγRIIb by Ig Fcγ-Fcε in mast cell.

lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation. *J. Immunol.* **160**: 1647-1658, 1998.

- 12) Kepley, C.L., Taghavi, S., et al.: Co-aggregation of Fc gamma RII With Fc epsilon RI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J Biol Chem.* **279**: 35139-35149, 2004;
- 13) Kepley, C.L., Zhang, K., et al.: FcRI-FcRII Coaggregation inhibits IL-16 production from human langerhans-like dendritic cells *Clin Immunol*; **108**: 89-94, 2003.



I. 鼻アレルギー

1) 鼻アレルギーにおけるリモデリング

Yamada Takechiyo

山田武千代*¹⁾

Kubo Seita

窪 誠太*

Mori Shigehito

森 繁人*

Fujieda Shigeharu

藤枝 重治*²⁾

Takahashi Noboru

高橋 昇*

*福井大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科 ¹⁾ 講師 ²⁾ 教授

Summary

鼻アレルギーのリモデリングとして、基底膜の肥厚、好酸球を含めた細胞浸潤、血管新生が存在する。鼻腔でも下気道と同様にリモデリングを生じるが、その相違点は粘膜の深部が骨であるということと、手術によってリモデリングが修復可能という点である。VEGFとEotaxinはリモデリングに深く関わっているが、粘膜下下甲介骨切除術で得られた下甲介骨由来線維芽細胞において、アセチルコリン作動性物質によりVEGF、Eotaxin-1の発現が有意に増強した。リモデリングの制御は、鼻アレルギーや鼻茸の治療において手術と併用で病態の完治を意味する重要な課題である。

Keywords

線維芽細胞 / 下甲介骨 / アセチルコリン / VEGF / Eotaxin

はじめに

リモデリング (remodeling) とは、傷害 (injury) されたことに対して起こる組織学的再構築である。傷跡を残さずに全く元通りに再生する完全修復 (repairment) に向かって進んでいく過程がリモデリングであるが、不可逆性の傷跡を残して再生する不完全修復の状態が存在する。刺激や傷害が軽ければ完全修復となり、刺激が強いと深部に到達しリモデリングとなる。気管支喘息における下気道のリモデリングでは、

上皮の脱落が生じ、それを修復する過程で、基底膜の肥厚、杯細胞増殖、気管支平滑筋肥大・増殖、血管新生、細胞浸潤、粘膜下腺の肥大・過形成が認められる¹⁾。鼻アレルギーでは、上皮の脱落はほとんど観察できないが上皮バリア傷害は存在する。下甲介の組織所見において血管新生や細胞浸潤が認められ、鼻アレルギーでは、非アレルギーに比べると、基底膜の肥厚 (van Giesen 染色) (図 1 A, B) が有意に高度であることを確認した。基底膜部の線維化は基底膜直下とその下層にコラーゲン (I,

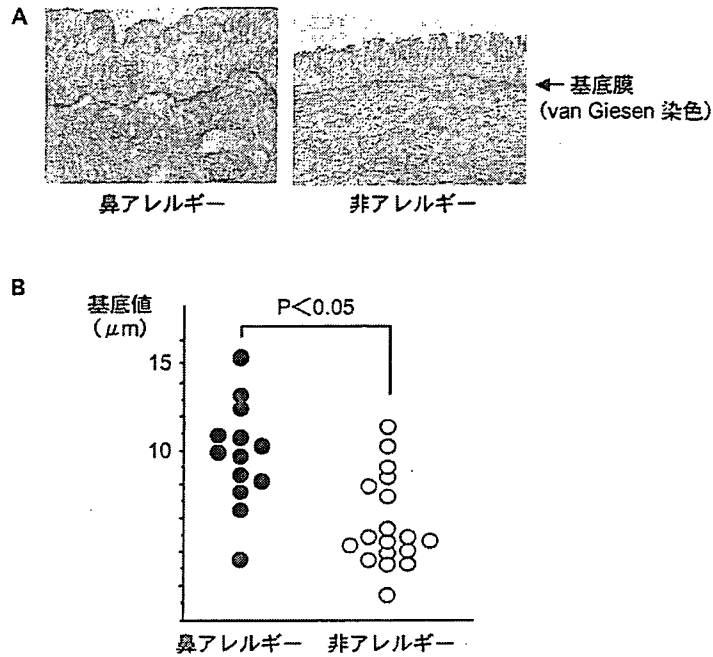


図1 鼻アレルギーにおけるリモデリング(基底膜の肥厚)
鼻アレルギーでは、非アレルギーに比べて基底膜の肥厚・線維化が高度である。

III, V型)やフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス(ECM)が沈着したもので、線維芽細胞が重要な働きを演じている。鼻アレルギーにおける線維芽細胞とリモデリング、下甲介骨由来線維芽細胞におけるアセチルコリン作動性物質によるVEGF(vascular endothelial growth factor)とEotaxinの発現量の変化、粘膜下下甲介骨切除術によるリモデリング修復について述べる。

I. 鼻アレルギーにおける線維芽細胞とリモデリング

花粉やダニなどの抗原、細菌感染、ウイルス感染、大気汚染物質のガス成分である

NO₂や非ガス成分であるDEP(ディーゼル排気微粒子)などの酸化ストレスやプロテアーゼなどの影響を気道で最初に受けるのは鼻腔の下甲介である。下甲介には、気道上皮細胞、樹状細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、肥満細胞、好塩基球、好酸球、単球、線維芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞、血小板、骨芽細胞、破骨細胞などが存在する。その中で、線維芽細胞は膠原線維を生成し、疎性結合組織の細胞成分のうちで最も重要で創傷治癒過程では刺激に応じて大切な働きをしている。一方、気道疾患やアレルギー病態においては、線維芽細胞が異常な作用を示しリモデリングを成立させている。

I. 鼻アレルギー 1) 鼻アレルギーにおけるリモデリング

図2に示すように、種々の刺激で、VEGF, PDGF (platelet-derived growth factor), NGF (nerve growth factor), KGF (keratinocyte growth factor), RANTES (regulated upon activation normal T cells expressed and secreted), Eotaxin, MCP (monocyte chemoattractant protein)-1, TARC (thymus and activation-regulated chemokine), IL(interleukin)-8, IL-6, BLyS (B lymphocyte stimulator), SCF (stem

cell factor), Fibronectin, Collagen, ICAM (intercellular adhesion molecule)-1, VCA M(vascular cell adhesion molecule)-1の産生, または発現の亢進が線維芽細胞で起こる。通年性アレルギー性鼻炎患者下鼻甲介由来線維芽細胞をDEP (5 µg/mL)で刺激し6時間後にマイクロアレイ (Atlas™ human 1.2 array)で検討すると, KGF, EGF (epidermal growth factor), MCP-1, IL-6, IL-1 β, BMP (bone morphogenetic

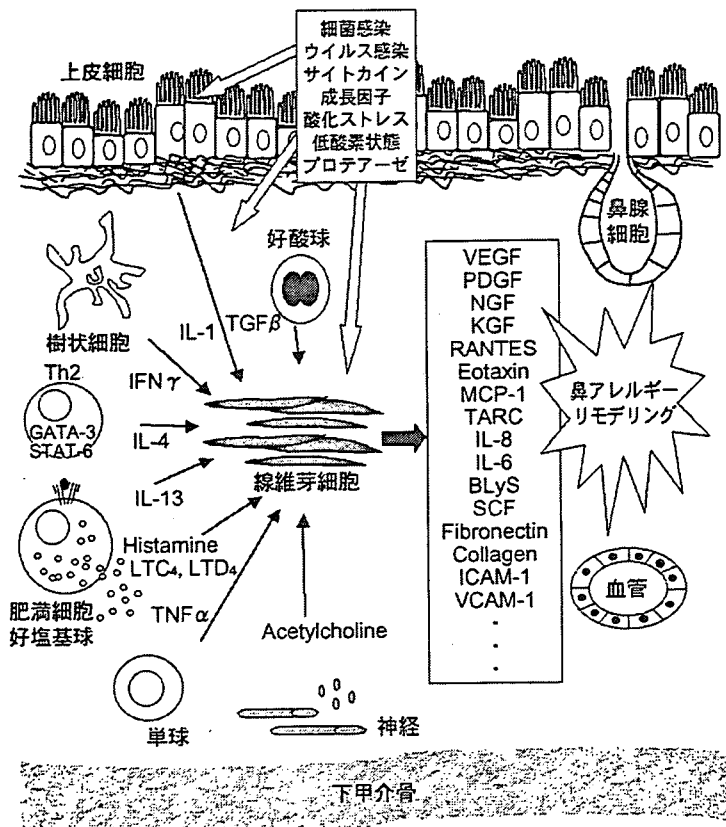


図2 鼻アレルギーにおける下甲介由来線維芽細胞とリモデリング
鼻由来線維芽細胞では、種々の刺激で、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、細胞外基質を産生し、接着分子の発現亢進が起こり、リモデリングを成立させる。

protein)-1, VEGF の RNA (ribonucleic acid) 発現亢進が観察された。

II. 下甲介骨由来線維芽細胞におけるアセチルコリン作動性物質による VEGF と Eotaxin の発現量の変化

刺激が強いと深部にまで病態の変化が及び、深部に存在する組織が強く関わってリモデリングとなる。気管支喘息では、気管支平滑筋肥大・増殖、血管新生、細胞浸潤が認められる。気管支粘膜下部は平滑筋が存在するが、下甲介深部は骨であり、これが上気道である鼻腔の特徴で、下気道との

違いである。当科で行っている粘膜下下甲介骨切除術では、下甲介の土台となっている下甲介骨を摘出する(図3A)。この下甲介骨から線維芽細胞を培養継体し(図3B)、手術時に同時採取した鼻粘膜由来の線維芽細胞と比較した。VEGF と Eotaxin-1 の発現を real time PCR (polymerase chain reaction) で測定すると、下甲介骨由来線維芽細胞では、鼻粘膜由来線維芽細胞に比べて6倍、VEGF の発現が有意に増強していた(図4A)。

アレルギー性鼻炎では副交感神経が有意でアセチルコリン受容体が過剰な鼻汁の分

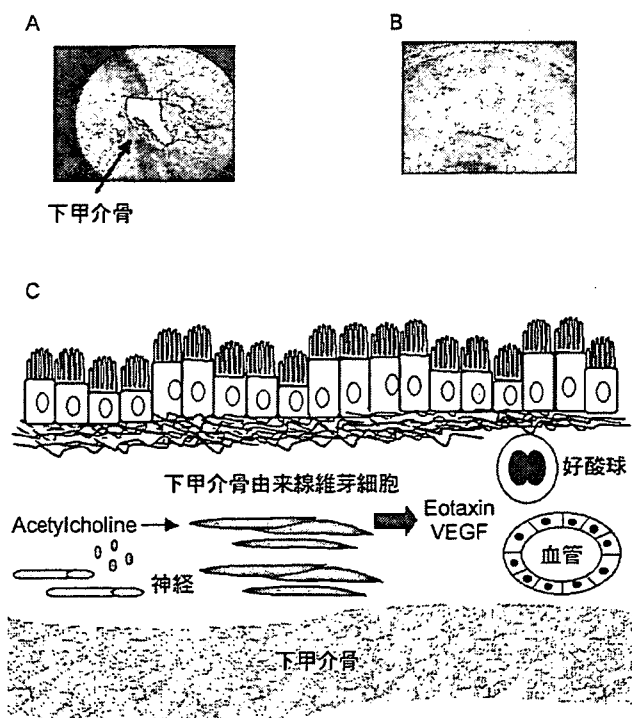


図3 下甲介骨由来線維芽細胞とリモデリング

- A: 粘膜下下甲介骨切除
- B: 下甲介骨由来線維芽細胞の分離
- C: 鼻アレルギーにおける下甲介骨由来線維芽細胞

I. 鼻アレルギー 1) 鼻アレルギーにおけるリモデリング

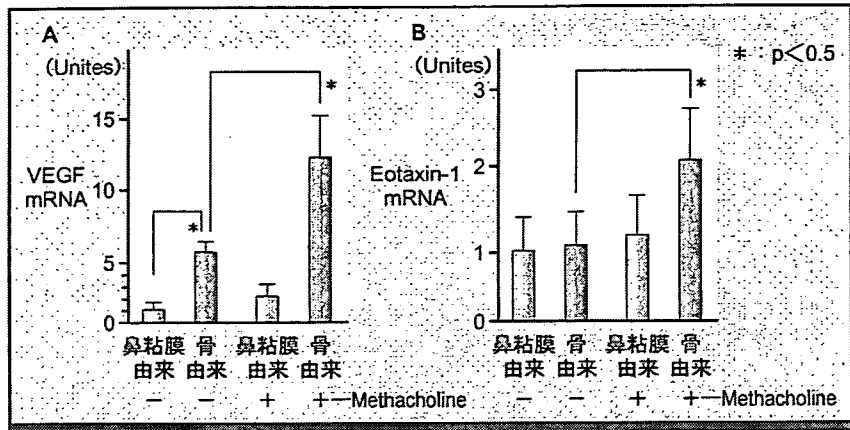


図4 下甲介骨由来線維芽細胞におけるアセチルコリン作動性物質による VEGF と Eotaxin の発現量の変化
 A : 下甲介骨由来線維芽細胞と鼻粘膜上皮由来線維芽細胞の Methacholine 刺激による VEGF 発現量変化。
 B : 下甲介骨由来線維芽細胞における Eotaxin-1 発現量変化の比較。

泌を促し病態を悪化させている。線維芽細胞にアセチルコリン作動性物質であるメサコリンを作用させ前後で比較すると、特に下甲介骨由来線維芽細胞では、アセチルコリン作動性物質により VEGF, Eotaxin-1 の発現が有意に増強した(図 3 C, 図 4 A, B)。好酸球に対して強力な遊走能を持つ Eotaxin と血管新生作用を有す VEGF は、アレルギーの病態やリモデリングで重要な役割を果たしており^{2)~5)}、アセチルコリン作動性物質の刺激で下甲介骨由来線維芽細胞での発現が亢進することが証明された。

III. 粘膜下下甲介骨切除術後の組織変化

我々は保存的治療に抵抗性の重症鼻閉通年性アレルギー性鼻炎に対して、粘膜下下甲介骨切除術と後鼻神経(選択的)切断術を行っている。下甲介骨の深部は骨であ

り、これを取り除くのが粘膜下下甲介骨切除術である。後鼻神経切断術では副交感神経線維、三叉神経第 2 枝からの知覚線維の一部が処理されることになる。図 5 に術前後の下甲介組織の浸潤細胞と新生血管を示した。術後に浸潤細胞と CD34 陽性血管(新生血管)数の変化を認め(図 5 A, B), IgE(immunoglobulin E)陽性細胞数(B細胞, 形質細胞, 好塩基球, 肥満細胞)と好酸球数が有意に減少している(図 5 C)。鼻アレルギーのリモデリングが改善した結果となっている。

IV. 展望

鼻アレルギーや鼻茸など鼻腔でも下気道と同様にリモデリングが存在するが、その相違点は粘膜の深部が骨であるということ、手術によってリモデリングが解除可能という点である。我々は粘膜下下甲介骨切

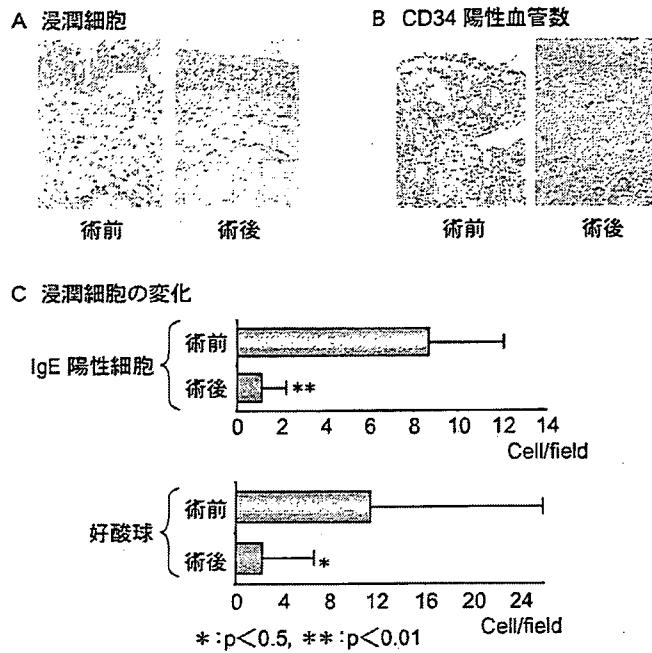


図5 粘膜下甲介骨切除術後の組織変化
鼻アレルギーのリモデリングは、術後に改善している。

除術と後鼻神経切断術を併用することにより、鼻アレルギーの症状を有意に改善することが可能であるというデータを得ているが、手術のみですべての症例を治癒することは出来ない。

リモデリングの研究では機能分子に注目が集まっている。小児喘息では気道リモデリングから難治化し成人に移行する症例があるために、それを予防しなければならない。重症鼻アレルギーや喘息を伴う鼻茸に対しては手術でリモデリングを解除し、リモデリングを予防できれば、難治例を治癒することが可能となる。抗原反復曝露による気道炎症マウスモデルでは、抗CCR3抗体や抗IL-5抗体で気道のリモデリングが予防可能であった⁶⁾。アレルギー疾患では、

抗IgE抗体、抗IL-4抗体、抗IL-13抗体、抗IL-5抗体、抗Eotaxin抗体、抗CD23抗体、抗CCR3抗体、抗MCP-1抗体、抗IL-9抗体が臨床試験中であるが、効果が示されても抗体療法が低額にならない限りリモデリングの予防薬としては使用が困難である。抗ヒスタミン薬、抗脂質メディエーター薬、鼻噴霧用ステロイド薬、Th2サイトカイン抑制薬、Syk阻害剤⁷⁾、経口減感作療法、ペプチド免疫療法、CpG DNA抗原療法が候補として挙げられるが、果たして好酸球浸潤を含めたりモデリングを完全に制御可能であろうか。リモデリングの制御は、鼻アレルギーや鼻茸の治療において手術と併用で病態の完治を意味する重要な課題である。

I. 鼻アレルギー 1) 鼻アレルギーにおけるリモデリング

文献

- 1) Busse W, Elias J, Sheppard D et al : Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 160 : 1035-1042, 1999
- 2) Ding C, Li J, Zhang X : Beclimomab Cambridge Antibody Technology Group. *Curr Opin Investig Drugs* 5 : 1213-1218, 2004
- 3) Feistritzer C, Kaneider NC, Stum DH et al : Expression and function of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 in human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30 : 729-735, 2004
- 4) Chetta A, Zanini A, Foresi A et al : Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodeling in asthma. *Clin Exp Allergy* 35 : 1437-1442, 2005
- 5) Lee KS, Min KH, Kim SR et al : Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* : 2006, in press
- 6) Tanaka H, Komai M, Nagao K et al : Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31 : 62-68, 2004
- 7) Meltzer EO, Berkowitz RB, Grossbard EB : An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol* 115 : 791-796, 2005

鼻由来線維芽細胞によるB細胞の制御

福井大学医学部耳鼻咽喉科

山田 武千代, 高橋 昇, 藤枝 重治

1. はじめに

クラススイッチ後に産生される各クラスの免疫グロブリン (Ig) は, IgA や IgG の neutralization, IgG の opsonization, IgG と IgM による補体活性化, 寄生虫に対する IgE の作用など抗原を排除するために生体で生理的に働いている。一方, アレルギーや IgA 腎症などでは抗原特異的な IgE や IgA が局所で病態を形成するなど様々な疾患とも深く関わっており, Ig クラススイッチのメカニズム解明は重要な課題である。Th2 細胞からの IL-4 や IL-13 の存在下で B 細胞上の CD40 が活性化されると IgM から IgE へクラススイッチして形質細胞に分化し IgE を産生する。BLyS (B cell stimulator) は, シェーグレン症候群¹⁾, SLE²⁾, リウマチ性関節炎³⁾ などの自己免疫疾患の病因の一つとして知られているが, CD40 非依存性に BLyS が免疫グロブリンのクラススイッチを誘導することも報告されている⁴⁾。

鼻由来線維芽細胞は Th2 サイトカイン, LPS, ウイルス感染など活性化され, RANTES, Eotaxin, TARC などのケモカイン, サイトカイン, 接着分子の発現が亢進し, 上気道構築細胞と免疫系の細胞の役割を同時に果たしている^{5,6)}。

本稿では, Ig クラススイッチに対する BLyS の影響, 鼻由来線維芽細胞における BLyS の発現, BLyS 発現における細胞内シグナル伝達について検討した。

2. 方法

手術時に同時採取した鼻粘膜, 下甲介骨を用いてそれぞれ線維芽細胞を単離培養し 4~5 継体で使用した。Toll-like receptor (TLR), BLyS の発現を real-time PCR で測定し, 刺激後の発現の変化を鼻粘膜由来線維芽細胞と下甲介骨由来線維芽細胞で比較検討した。刺激 48 時間後に培養上清を採取し, ウェスタンブロット法にて BLyS の蛋白産生の変化を観察した。

ヒト S μ と S γ の間に GFP を逆方向に存在させ, クラススイッチが起こると GFP が発現するベクターをヒト B 細胞株 Ramos2G6 にエレクトロポレーションにて遺伝子導入した⁷⁾。IL-4 及び抗 CD40 抗体または BLyS で

刺激 4 日後に, フローサイトメトリーにて GFP 陽性細胞の数で Ig クラススイッチを定量比較した。ヒト B 細胞を IL-4 及び BLyS で刺激し, 2 日後の RNA を用い, RT-PCR で Activation-induced cytidine deaminase (AID) の発現⁸⁾ を検討した。ヒト B 細胞を IL-4 及び抗 CD40 抗体で刺激し, 14 日後の上清を採取⁹⁾ し, IgE を ELISA にて測定し, BLyS 中和抗体前処理の場合と比較した。

タンパク質リン酸化アレイとウェスタンブロットにより細胞内情報伝達を解明した。サンプルを Laemuli sample buffer にて 3 分間煮沸し, ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行ない, PVDF 膜に転写し, それぞれの抗体を用いて, タンパク質の発現とリン酸化を検出した (ウェスタンブロット法)。BLyS 発現を誘導したリガンドを用いて, 線維芽細胞を 30 分間処理し, 細胞をホモジェネートし, 目的タンパク質を含む試料に対する各抗体が膜に吸着してある膜とインキュベートした。膜を洗浄した後, あらかじめ標識してあるリン酸化チロシン抗体で反応させ, 発色させた。この実験ではリガンド刺激後にリン酸化が亢進する分子または複合体を形成する分子の同定が可能になる (タンパク質リン酸化アレイ)。

3. 結果

ヒト B 細胞を IL-4 及び BLyS で刺激すると AID の発現が誘導された。AID はクラススイッチ及び抗体可変領域遺伝子の体細胞突然変異に必須の, 即ち, 抗原刺激後に起こる B 細胞の抗体遺伝子改編反応のすべてに重要な酵素である^{10,11)}。ヒト B 細胞を IL-4 及び抗 CD40 抗体で刺激し, 14 日後の上清を採取し, IgE を ELISA にて測定すると, BLyS 中和抗体前処理により IgE 産生が減少した。BLyS により Ig クラススイッチが誘導されるが, CD40 架橋で BLyS が誘導されるなど, 実際生体内では CD40 架橋と BLyS による刺激が同時に存在する可能性がある。Ig クラススイッチベクターを用い共刺激における実験では, 抗 CD40 抗体が低濃度では BLyS は Ig クラススイッチを有意に増強したが, CD40 架橋が強い状態では BLyS は影響を与えなかった。また, BLyS が低濃度では CD40 架橋は Ig クラススイッチを増強したが, BLyS が高濃度では影響を与えず, Ig クラススイッ

チだけを検討するとお互いに補い合っている結果であった。

下甲介粘膜由来線維芽細胞では TLR3, LTR4, TLR9 の発現が多く, Poly IC と LPS 刺激により BlyS 発現が誘導された。刺激48時間後に培養上清を採取し, ウエスタンブロット法にて BlyS の蛋白産生も確認された。BlyS 発現誘導は, Poly IC の作用で最も強く濃度依存性に誘導され, 扁桃由来線維芽細胞と比べると, 下甲介粘膜由来線維芽細胞では特に強く10倍であった。Poly IC による BlyS 発現誘導は, 粘膜由来線維芽細胞と同様に下甲介骨由来線維芽細胞でも強く起こった。Poly IC により JNK, p38 MAPK, AKT はリン酸化され¹²⁾, PI 3K 阻害剤により Poly IC 誘導 BlyS 発現が抑制された。細胞内情報伝達をタンパク質リン酸化アレイで検討すると, Rho, Syk, Vav, c-Src, TRAF6, p-Selectin の関与が証明された。

4. 考 察

生体防御機構は自然免疫反応と適応免疫反応に大きく分類される。自然免疫反応は初期の免疫応答として重要であり好中球, マクロファージ, 好酸球, 好塩基球, 肥満細胞, 樹状細胞, NK細胞, NKT細胞が関与する。獲得免疫反応は抗原特異的なものでT細胞とB細胞が担っているが, 自然免疫反応と適応免疫反応は単独に働くのではなく, お互いに働きあいながら機能を果たしている。今回, 我々は, 自然免疫の受容体である TLR3 を介して, BlyS が産生され, BlyS が IL-4 存在下で Ig クラススイッチを誘導し, 抗原特異的 Ig 産生に関与していることを示した。

細菌感染, ウイルス感染, IFN γ , TNF α , CD40L などの刺激で, 樹状細胞, 単球, マクロファージなどの産生細胞に BlyS の発現が誘導される。今回の鼻由来線維芽細胞の実験から, 気道の構築細胞に BlyS が発現していることを初めて証明した。膜貫通型の分子であるが, furin-like protease の作用により切断され細胞外に放出されホモトリマーの状態で作作用する。B細胞にある受容体に働き, 細胞内のシグナルが作動すると, B細胞の増殖や生存の延長を促す。サイトカインの働きで, Ig クラススイッチが生じ, 最終的に, IgA, IgG, IgE の産生を増強する。B細胞は MHC クラス I, クラス II を細胞表面に発現して, T細胞に対する抗原提示細胞としても機能し, T細胞共刺激分子に対するリガンドも存在する。BAFF-R, BCMA を介して MHC の発現を増強するなどの作用もあり, 鼻科領域の炎症及び免疫反応において, BlyS は重要な役割を担う分子であると考えられ

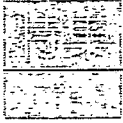
る。

参 考 文 献

- 1) Mariette X, Roux S, Zhang J, et al: The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome, *Ann Rheum Dis* 62: 168-171, 2003.
- 2) Zhang J, Roschke V, Baker KP, et al: A role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus, *J Immunol* 166: 6-10, 2001.
- 3) Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al: Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases, *Arthritis Rheum* 44: 1313-1319, 2001.
- 4) Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al: DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL, *Nat Immunol* 3: 822-829, 2002.
- 5) Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, et al: Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production, *J Immunol* 166: 538-543, 2001.
- 6) Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, et al: IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TRAF-6 in nasal fibroblast lines, *J Immunol* 167: 283-288, 2001.
- 7) Yamada T, Zhu D, Saxon A, et al: CD45 controls interleukin-4-mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase, *J Biol Chem* 277: 28830-28835, 2002.
- 8) Yamada T, Zhang K, Yamada A, et al: B Lymphocyte Stimulator Activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Human Ig Class Switch Recombination, *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 388-394, 2005.
- 9) Yamada T, Zhu D, Zhang K, et al: Inhibition of interleukin-4-induced class switch recombination by a human immunoglobulin Fc γ -Fc ϵ chimeric protein, *J Biol Chem* 278: 32818-32824, 2003.
- 10) Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, et al: Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells, *J Biol Chem* 274: 18470-18476, 1999.

- 11) Okazaki IM, Kinoshita K, Muramatsu M, et al : The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts, *Nature* 416 : 340-345, 2002.
- 12) Takahashi N, Yamada T, Narita N, et al : Double-

stranded RNA induces production of RANTES and IL-8 by human nasal fibroblasts, *Clin Immunol* 118 : 51-58, 2006.



II. 耳鼻咽喉科

1) 鼻粘膜由来線維芽細胞における RANTES・Eotaxin 制御

Yamada Takechiyo

Takahashi Noboru

Fujieda Shigeharu

山田武千代*1) 高橋 昇* 藤枝 重治*2)

*福井大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科 †講師 ‡教授



気道粘膜の再構築, リモデリングの観点から, アレルギー疾患における線維芽細胞の役割が最近注目されている。鼻粘膜由来線維芽細胞は, いろいろな刺激により, 細胞外基質 (ECM) の他, ケモカイン, サイトカイン, 成長因子を産生する。RANTES, Eotaxin, MCP-1, IL-8 は, 好酸球や好塩基球に作用があり, 鼻粘膜由来線維芽細胞が産生するケモカインである。鼻粘膜由来線維芽細胞における RANTES・Eotaxin 産生の制御について, Toll-like receptor (TLR) 3, TLR4, IL-4 受容体, IL-13 受容体の細胞内情報伝達系を中心に概説し, 将来のアレルギー治療の展望について考察する。



鼻粘膜由来線維芽細胞 / RANTES / Eotaxin / Syk

はじめに

細菌, ウイルス, 抗原, 酸化ストレスなどの影響を気道の最初に受ける下甲介には, 樹状細胞, T細胞, B細胞, 形質細胞, 肥満細胞, 好塩基球, 好酸球, 単球, 気道上皮細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, 神経細胞, 血小板などが存在し, アレルギー性鼻炎の病態に関与する。特に線維芽細胞は, これらの他の細胞の刺激を受け, 更に影響を与えることから, 状況によって悪循環を引き起こし, 最終的に下甲介の病的な肥厚の原因となる。RANTES (regulated

upon activation normal T expressed and presumably secreted), Eotaxin は, 好酸球や好塩基球に作用があり, 鼻粘膜由来線維芽細胞から大量に産生される。抗 Eotaxin 抗体¹⁾, Eotaxin と RANTES がリガンドとなる CCR3 に対する抗体による治療効果がアレルギーの病態を改善することから, これらのケモカインが病態において重要であることが判明した。RANTES, Eotaxin の産生を制御できれば治療へと結びつく。細菌, ウイルス, Th2 サイトカイン, 脂質メディエーター, アセチルコリン作動性物質などは, RANTES, Eotaxin の

発現や産生に影響を与えることから、これらの細胞内情報伝達とその抑制の可能性について述べる。

I. 種々の刺激による鼻粘膜由来線維芽細胞の反応

アレルギー疾患における気道粘膜の再構築, リモデリングでは, 基底膜直下のコラーゲンやエラスチンなどの異常な沈着が報告されており, そのほとんどが気道線維芽細胞から産生される。鼻粘膜由来線維芽

細胞は, 細菌感染, ウイルス感染, サイトカイン, 成長因子, 抗原に存在するプロテアーゼ, 酸化ストレス, 低酸素などの刺激により, ECM (extracellular matrix) の他, RANTES, Eotaxin, MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1), IL (interleukin)-8, TARC (thymus and activation-regulated chemokine) などのケモカイン, サイトカイン, 成長因子を産生する (図 1)。

Th2 細胞, 好塩基球, 肥満細胞からの

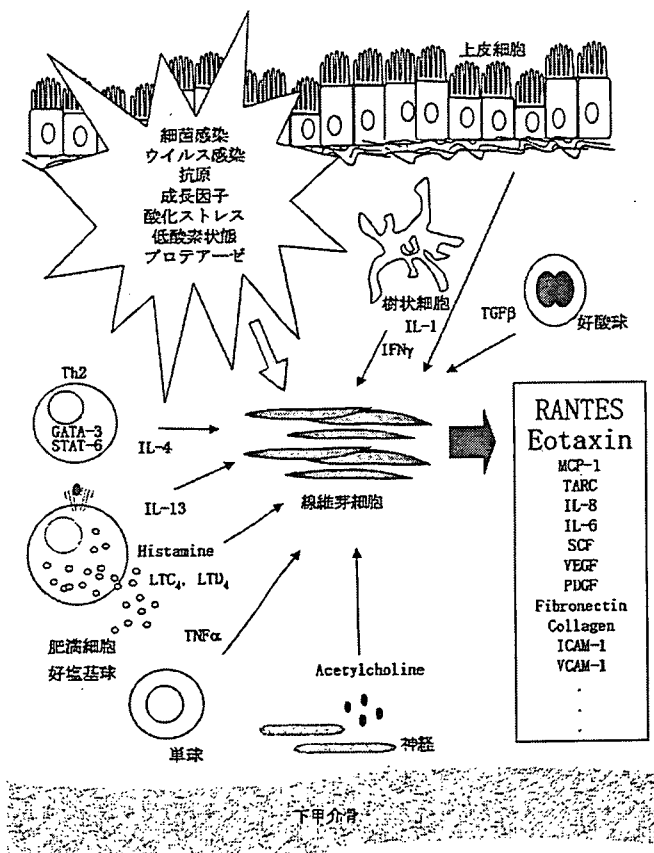


図 1 種々の刺激による鼻粘膜由来線維芽細胞の反応

鼻粘膜由来線維芽細胞は, 細菌・ウイルス・サイトカイン・抗原などの影響で, ケモカイン・サイトカイン・成長因子を産生する。

IL-4 や IL-13 の刺激で、線維芽細胞から Eotaxin²⁾ や TARC が産生され、接着分子である ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) の発現が亢進する。Eotaxin は強力な好酸球遊走能を持ち、TARC は CCR4 に結合し Th2 細胞に作用する。樹状細胞、単球、気道上皮からの IL-1, 単球から産生される TNF (tumor necrosis factor) α , LPS (lipopolysaccharide), double-stranded RNA (dsRNA) で鼻粘膜由来線維芽細胞が RANTES, IL-8 を産生する³⁾⁻⁵⁾。鼻粘膜由来線維芽細胞から産生されるフィブロネクチン, SCF (stem cell factor) は、好塩基球、肥満細胞の細胞遊走、増殖を促す。アレルギー性疾患では、好塩基球や肥満細胞の脱顆粒による即時相と、Th2 細胞や好酸球などの浸潤による遅発相が存在するが、線維芽細胞は、好塩基球、肥満細胞、好酸球に作用し、それぞれの病態を悪化させている。

TGF β (transforming growth factor β), IL-4 の刺激でコラーゲンなどの ECM の産生が促される。低酸素状態により線維芽細胞から産生される VEGF (vascular en-

dothelial growth factor) は、内皮細胞増殖と透過性亢進の作用があるが、アセチルコリン作動性物質でも発現が増強する。アレルギー性鼻炎では非アレルギーに比べると基底膜の肥厚と血管新生が強く起こっていることから、リモデリングと類似の変化が認められ、線維芽細胞が重要な役割を果たしている。

II. 鼻粘膜由来線維芽細胞が産生するケモカインの比較

RANTES, Eotaxin, MCP-1, IL-8 は、好酸球や好塩基球に作用があり、鼻粘膜由来線維芽細胞が産生するケモカインである(表1)。ケモカインは、最初の2つのシステムの位置関係から4つのサブファミリーとして、CXC, CC, C, CX₂C に分類される。RANTES, Eotaxin, MCP-1 は CC ケモカインで、IL-8 は CXC ケモカインである。アレルギー疾患の肺胞洗浄液や鼻洗浄中には、RANTES, Eotaxin, MCP-1 が多いことが知られている。CCR3 をリガンドとするケモカインの中で、Eotaxin は最も高親和性で、CCR3 以外の CCR には結合しない。Eotaxin は低濃度で好酸球と好

表1 鼻粘膜由来線維芽細胞が産生するケモカインの比較

好酸球と好塩基球への作用とケモカイン受容体	RANTES	Eotaxin	IL-8	MCP-1
好酸球遊走	++	+++	+	-
好酸球脱顆粒	++	++	+	-
好塩基球遊走	++	+++	+	+
好塩基球脱顆粒	++	-	+	++
ケモカイン受容体	CCR1 CCR3 CCR5	CCR3	CXCR1 CXCR2	CCR2 CCR4

塩基球の遊走を誘導する。RANTESは、CCR1, CCR3, CCR4, CCR5を介して好酸球と好塩基球の遊走と脱顆粒を誘導する作用があり、また、B細胞に働きIL-4とCD40刺激によるIg (immunoglobulin) EとIgG₁の産生を亢進させる⁶⁾。IL-8は代表的な好中球走化性因子であるが、受容体としてはCXCR1, CXCR2があり、好塩基球やIL-5でプライミングされた好酸球にはCXCR2が発現しており、IL-8は遊走能を亢進させる。MCP-1は、CCR2を介して好塩基球の脱顆粒を誘導しヒスタミンの遊離を起こす。

III. 鼻粘膜由来線維芽細胞の RANTES 産生に関わる TLR3 と TLR4 からの細胞内情報伝達

細菌、ウイルス、寄生虫、植物などが体内に侵入した際にそれを排除しようとする免疫系には、自然免疫と獲得免疫があり、互いに関連しあい成り立っている。自然免疫は、抗体産生に関わる獲得免疫と比べて非特異的と思われてきたが、自然免疫の特異的な受容体であるTLRs(Toll-like receptors)が発見され、それぞれ特異的な反応を示すことが判明した。鼻粘膜由来線維芽細胞にも、TLRsが発現しており、TLR2,

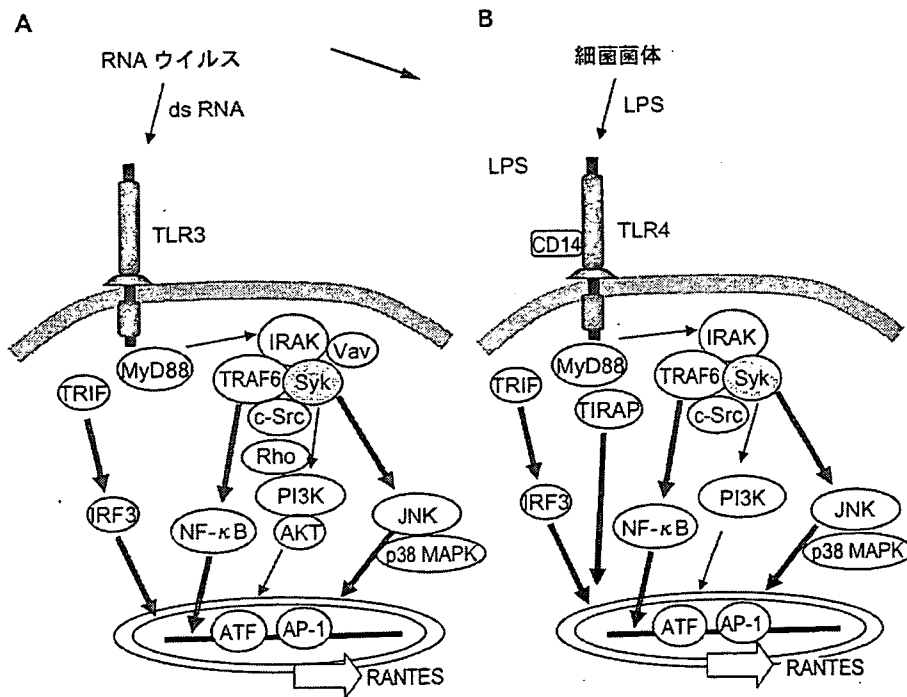


図2 鼻粘膜由来線維芽細胞のRANTES産生に関わるTLR3とTLR4からの細胞内情報伝達
TLR3・TLR4からの細胞内情報伝達には、TRIF・IRF3・MyD88・IRAK・NF-κB・Syk・PI3K・JNK・p38MAPKなどが関与する。

TLR3, TLR4, TLR9 が認められ, TLR3 と TLR4 の発現が最も強く, RANTES 産生に関与している。poly IC や LPS で, TLR3 と TLR4 が活性化すると RANTES の産生が亢進する。

TLR3 と TLR4 の細胞内情報伝達は, TRIF, IRF3 (interferon regulatory factor-3), MyD88, IRAK (IL-1 receptor associated kinase), TRAF (tumor necrosis factor receptor associated factor) 6 など を介して, NF- κ B (nuclear factor- κ B), JNK (c-jun N-terminal kinase), p38 MAPK (mitogen activated protein kinase), PI3K (phosphoinositide 3-kinase) を活性化させる (図 2)。我々は, IgE 受容体 (Fc ϵ RI [Fc epsilon receptor I]) のシグナルに中心的な働きをしておりアレルギー疾患や自己免疫疾患の治療の標的分子としても候補としてあげられている Syk が, TLR4 に関わる RANTES 産生に重要な働きをしており, TRAF6 に会合することを証明した。Syk に対するアンチセンスや mutant vector を用いて LPS による RANTES 産生を抑制することに成功した^{33, 41)}。

鼻粘膜由来線維芽細胞を dsRNA で刺激すると, JNK, p38 MAPK 以外に AKT がリン酸化され, 細胞内情報伝達をタンパク質リン酸化アレイで検討すると, Rho, Syk, Vav, c-Src, TRAF6 の関与が観察された。また, PI3K 阻害剤や JNK 阻害剤により dsRNA 誘導 RANTES 産生が抑制された³³⁾。

IV. 鼻粘膜由来線維芽細胞の Eotaxin 産生に関わる IL-4 受容体と IL-13 受容体からの細胞内情報伝達

Th2 細胞からの IL-4 が (CD40L や BlyS の存在下で) B 細胞を活性化させると IgE クラススイッチが起こり, 最終的に IgE を産生させる。抗原特異的 IgE はアレルギーの本体であるから, IL-4 は病態の中で最も重要なサイトカインである。鼻粘膜由来線維芽細胞においては, IL-4 と IL-13 は Eotaxin の産生を誘導する。IL-4 受容体 α 鎖 (IL-4 α R) は IL-4 受容体と IL-13 受容体の共有受容体であるため, IL-13 は IL-13 受容体のリガンドであるのに対し, IL-4 は IL-4 受容体と IL-13 受容体に作用する (図 3)。IL-4 は受容体に結合すると JAK1, JAK3 を介して STAT (signal transducer and activator of transcription) 6 をリン酸化させ, Eotaxin 産生に関与する。IL-13 受容体では JAK1, JAK2, Tyk2, STAT6 のリン酸化が起こる。

IL-4 や IL-13 による Eotaxin 産生では共刺激による実験でその影響が報告されている。IL-4 誘導 Eotaxin が LPS にて誘導される。ヒト由来線維芽細胞 (HFL-1) では, IL-13 により LTC₄ (leukotriene C₄), LTD₄ (leukotriene D₄) の受容体である CysLT₁R の発現が増強し, LTC₄ により IL-4 誘導 Eotaxin 産生が増強され, CysLT₁R 拮抗薬である pranlukast により抑制された。我々は, 鼻粘膜由来線維芽細胞を用いて同様の実験を行い, LTC₄ により IL-4 誘導 Eotaxin 産生が増強され, CysLT₁R 拮抗薬で抑制することを確認した。また, dsRNA