

図5 抗原特異的免疫療法の作用機序：免疫応答の改変

バ花粉症においても免疫療法70日後に制御性T細胞が誘導され、本細胞がアレルゲン特異的増殖応答を抑制し、さらにこの抑制は抗IL-10抗体または抗TGF-β抗体の添加で解除される⁸⁾。我々の検討でも、スギ特異的SITを行った患者の末梢血単核細胞はSIT非施行の患者と比較して、Cry j1刺激に対してCD4陽性CD25強陽性細胞の比率が有意に増加した(図4)。しかしながらCry j1刺激による末梢血単核細胞のIL-10あるいはTGF-βの有意な産生は、SITの有無に関わらず確認できなかった。

5. SITの樹状細胞への作用

樹状細胞は代表的な抗原提示細胞であるが、免疫反応の“on-off”，すなわちT細胞の活性化と免疫寛容の成立に対して共に中心的に働く。免疫寛容を誘導する“抑制性”樹状細胞への分化は、細胞系列(骨髓系樹状細胞や形質細胞様樹状細胞など)、成熟度、アジュバントや抗原の種類と量などが影響する。一般的に抑制性樹状細胞は非成熟である一方、SLAMやDEC-205などの抑制機能分子を発現し、さらに前述のIL-10やTGF-βなどを産生することにより各種の制御性T細胞を誘導する¹³⁾。マウスでは形質細胞様樹状細胞を

除去すると本来感作を引き起こさない量のアレルギー吸入によって感作が成立し、気道への好酸球浸潤やTh2サイトカイン産生が誘導される。さらに形質細胞様樹状細胞の移入は喘息の発症を阻止することから、気道での免疫寛容に本細胞が重要であることが示されている¹⁴⁾。これまでにSITによってB細胞、単球およびマクロファージなどのAPCからのIL-10産生が誘導されることが報告され、Tr1などの制御性T細胞を誘導する可能性が示唆されている^{15), 16)}。

6. SITの抗体産生への影響

SITを行うことによって特異的IgG, 特にIgG 4抗体の産生が誘導されることはよく知られており、スギSITにおいても報告されている¹⁷⁾。一方、花粉症に対するSITは特異的IgE抗体価の季節性の上昇を抑制する^{17), 18)}。前述のようにIL-10はIgG4産生を誘導し、逆にIgEへのクラススイッチを抑制することから、これらの抗体産生の変化はSITにより産生されたIL-10の作用による可能性が高く、SITが生体内に導入されたことを反映していると考えられる。

アレルギー特異的なIgGの血中濃度とSITの臨床効果に関しては相関するという報告があるが、逆に否定的な意見もあり見解は統一されていない^{17), 18)}。一方シラカンバ花粉症では、SITにより産生されたIgG4は鼻汁中にもみられ、鼻汁中のIgG4濃度はシラカンバで誘発された鼻粘膜過敏性と逆相関することから、局所におけるIgG4濃度の臨床的な重要性が示唆されている¹⁹⁾。

一方アレルギー特異的IgGの機能に関しては、古くからIgGはIgEと同じエピトープを

認識し遮断抗体として働くという考えがある¹⁸⁾。またIgGは抑制性IgG受容体であるFcγRIIと結合することにより好酸球浸潤を抑制する²⁰⁾。さらに最近では、SITにより誘導されたIgGの機能として、肥満細胞や好塩基球の脱顆粒の抑制、アレルギー特異的なメモリーB細胞数の抑制、あるいはIgEによる抗原提示の活性化の抑制などが知られている^{21), 22)}。

おわりに

以上、免疫療法の作用機序について、スギ花粉症を中心に概説した(図5)。制御性T細胞や抑制性樹状細胞が免疫療法の奏功機序に関与することは想像に難くないが、その誘導機序に関しては未だ不明な点が多い。また最近、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞によるCD4⁺CD25⁻細胞からの抗原特異的IL-13産生の抑制作用はペプチド免疫療法を行っても変化しないという報告がみられ²³⁾、用いる治療エキスの種類により制御性T細胞の関与の程度が異なる可能性も示唆されている。今後それぞれの免疫療法の効果発現機序に関するさらなる解明がなされ、より簡便で安全性が高く、かつ効果的な治療法の確立が求められる。

文献

- 1) Bousquet J, et al.: J Allergy Clin Immunol. 102: 558-562, 1998.
- 2) Rotrosen D, et al.: J Allergy Clin Immunol. 110: 17-23, 2002.
- 3) Okano M, et al.: Am J Resp Crit Care Med. 164: 1501-1507, 2001.
- 4) Akdis M, et al.: J Exp Med. 199: 1567-1575, 2004.

- 5) Kakinoki Y, *et al.*: Scand J Immunol. 51: 202-208, 2000.
- 6) Wilson DR, *et al.*: J Allergy Clin Immunol. 107: 971-976, 2001.
- 7) Blaser K, and Akdis CA: Clin Exp Allergy. 34: 328-331, 2004.
- 8) Jutel M, *et al.*: Eur J Immunol. 33: 1205-1214, 2003.
- 9) Nasser SM, *et al.*: Eur J Immunol. 31: 3704-3713, 2001.
- 10) Francis JN, *et al.*: J Allergy Clin Immunol. 111: 1255-1261, 2003.
- 11) Savolainen J, *et al.*: Clin Exp Allergy. 34: 413-419, 2004.
- 12) Sakaguchi S.: Ann Rev Immunol. 22: 531-562, 2004.
- 13) Rutella S, *et al.*: Blood. 108: 1435-1440, 2006.
- 14) de Heer HJ, *et al.*: J Exp Med. 200: 89-98, 2004.
- 15) Akdis CA, *et al.*: J Clin Invest. 102 : 98-106, 1998.
- 16) Nouri-Aria KT, *et al.*: J Immunol. 172: 3252-3259, 2004.
- 17) Ohani Y, *et al.*: Laryngoscope. 107: 1270-1275, 1997.
- 18) Durham SR *et al.*: J Allergy Clin Immunol. 102: 157-64, 1998.
- 19) Reisinger J, *et al.*: J Allergy Clin Immunol. 116: 347-354, 2005.
- 20) Watanabe T, *et al.*: Am J Respir Crit Care Med. 169: 105-112, 2004.
- 21) Mothes N, *et al.*: Clin Exp Allergy. 33: 1198-1208, 2003.
- 22) van Neerven R, *et al.*: J Immunol. 163: 2944-2952, 1999.

＜話題あれこれ＞

第14回 日本免疫毒性学会

日本免疫毒性学会は下記日程で学術総会を開催します。

会 期：2007年9月10日(月)～12日(水)

会 場：神戸市・兵庫県民会館

会 長：吉野 伸（神戸薬大教授）

招聘講演：「マスト細胞とKIT受容体チロシンキナーゼ」北村幸彦（大阪大学名誉教授、塩野義製薬顧問）

特別講演：「トキシコゲノミクスプロジェクトデータベース（TG-GATEs）を用いた肝毒性の予測」
漆谷徹郎（同志社女子大学薬学部教授）

シンポジウム：「生殖免疫毒性」

1. 「妊娠維持における胎盤特異的免疫担当細胞の役割」中村織江（大阪府母子保健総合医療センター研究所）

2. 「Ontogeny and Post-natal Development of the Rodent Immune System」

Dr. Hayssam Khali (Charles River Labs)

3. 「Immune System Development in the Primate」

Prof. Gerhard Weinbauer(Covance Labs GmbH)

4. 「Regulatory Concerns for Developmental Immunotoxicology」

Dr. Kenneth Hastings (FDA, USA)

連絡先：神戸薬科大学薬理学講座：TEL (078) 441-7577 / FAX (078) 441-7577

※バックナンバーを会場で販売予定です。お立ち寄り下さい。

好酸球の抑制と花粉症

松本理恵 岡野光博

まつもと りえ、おかの みつひろ：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科

● はじめに

アレルギー性鼻炎患者の鼻汁中に好酸球が増加することはすでに Eyer mann CH(1927)¹⁾により記載され、非アレルギー性鼻炎との鑑別診断に用いられてきた。骨髄で分化成熟した好酸球が血流を介して鼻粘膜に集積し、さらに粘膜上皮層を通過した後、鼻腔へ遊走し脱顆粒するメカニズムについては、最近解明が進んでいる。本稿では、花粉症を含むアレルギー性鼻炎における好酸球の役割について、諸家の報告に自験例を交え概説する。

● 鼻粘膜好酸球浸潤の経時的变化

抗原曝露後の鼻汁中の好酸球数の経時的变化を調べた結果では、誘発される鼻症状が軽微な場合には、即時相に上昇ピークをつくるが、著明な症状が誘発された場合には即時相のみならず

遅発相にもいくつかのピークを形成して上昇する²⁾(図1)。このような患者は RAST スコアが高く、重症度も高い傾向にある。また、遅発相に鼻閉を呈し、過敏性の亢進も著しいことから、鼻粘膜浸潤好酸球は重症度や過敏性亢進を含め、鼻炎の病態に深く関与することが示唆されている。

● 鼻粘膜における好酸球集積のメカニズム

好酸球が炎症局所に動員されるステップとして、まず種々の反応により産生された IL-5 等のサイトカインなどにより、骨髄において幹細胞の好酸球への分化・増殖が誘導される。ついで成熟した好酸球が循環血液へ移行し、さらに局所へ遊走する³⁾(図2)。一方、ヒト鼻粘膜においては CD34 陽性の好酸球前駆細胞が存在し、IL-5 の作用により鼻粘膜局所で好酸球に分化

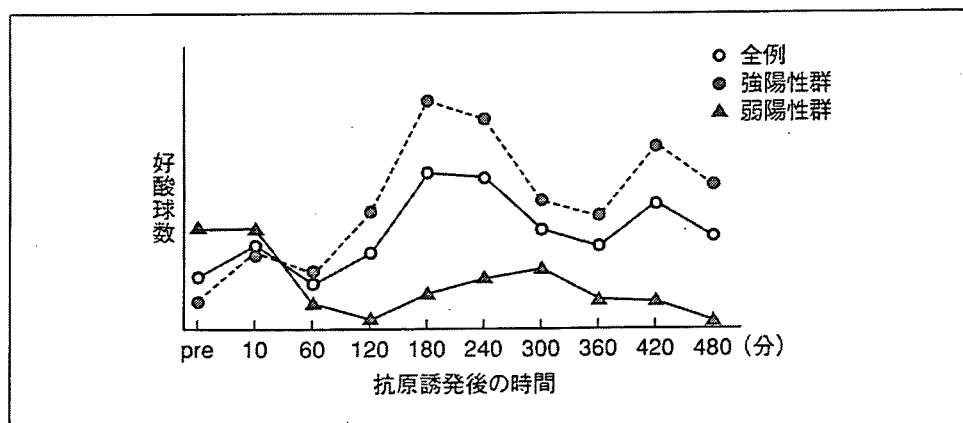


図1 抗原誘発後の鼻腔洗浄液中好酸球数の変化—誘発強陽性群と弱陽性群との比較 (文献2より引用)

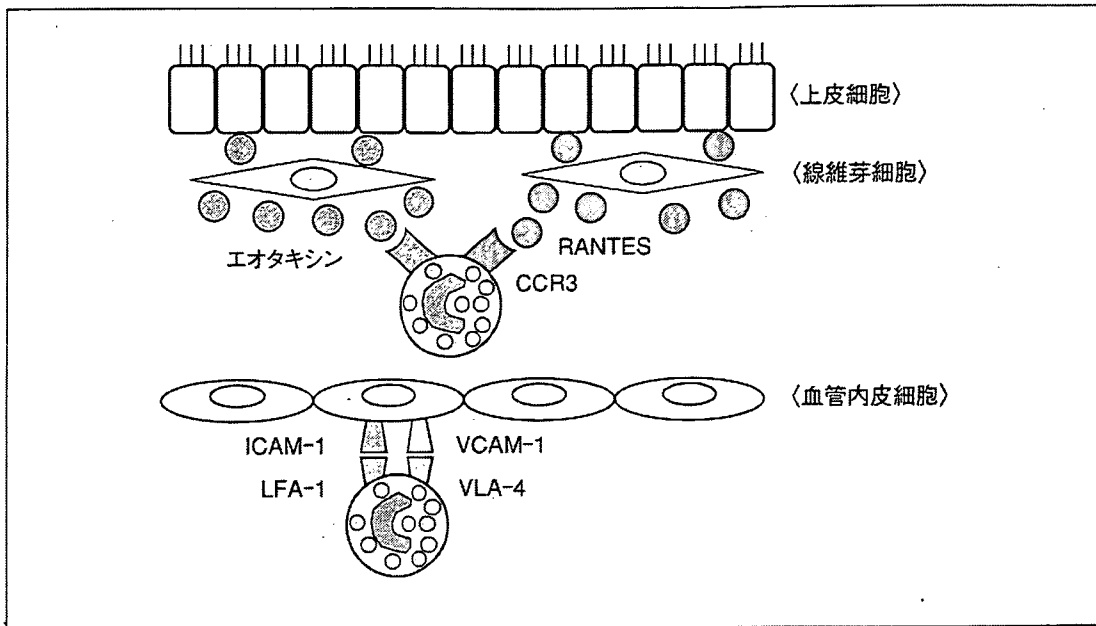


図 2 好酸球の鼻粘膜への遊走メカニズム

しうることも示されている⁴⁾。

好酸球の骨髄での増生、血流への流入には IL-5 や PGD₂ などがおもに関与する⁵⁾。また局所への遊走・浸潤には、血管内皮上の細胞接着分子の発現が重要である。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜の血管壁には ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトリンなど種々の細胞接着分子が発現しており、アレルゲン曝露後にこれら細胞接着分子の蛋白や mRNA レベルでの発現増強が起こる^{6,7)}。IL-4 や IL-13 は、血管内皮細胞上の VCAM-1 発現を特異的に誘導する。また ICAM-1 や VCAM-1 の局所での発現程度は、好酸球や CD4 陽性 T 細胞、とくに Th2 サイトカイン陽性細胞の浸潤細胞数と相関する。血管内皮細胞に接着した好酸球は、上皮細胞や線維芽細胞由来の RANTES やエオタキシン、単球由来の MCP などの CC ケモカイン、あるいは肥満細胞からの LT, PAF などのケミカルメディエーターの作用で、組織内へ遊走する。遊出した組織内好酸球は IL-5 の作用により生存が延長する。この過程に関与する IL-5, IL-4, IL-13 は、アレルゲン特異的活性化 Th2 リンパ球からおもに放出される⁸⁾。

一方、抗原曝露後の好酸球浸潤のプロセスを経時的に考えると、まず抗原誘発直後には肥満

細胞主導の反応が起こり、PAF などの好酸球遊出性のメディエーターの放出と同時に IL-1 β , TNF- α の放出も起こる。これらのサイトカインの刺激により、血管内皮上の細胞接着分子 (E-セレクトリン, ICAM-1, VCAM-1) の発現増強が生じる。また TNF- α の刺激によりエオタキシンの産生増加も起こる。さらに、やや遅れて肥満細胞より IL-4, IL-5, IL-13 の産生が起こる。IL-5 は好酸球の局所浸潤・活性化・生存率延長に強く関与し、IL-4, IL-13 は血管内皮上に VCAM-1 を特異的に誘導し、リガンドである VLA-4 を発現した好酸球や好塩基球, T 細胞の選択的浸潤を引き起こす。また肥満細胞は PGD₂ を産生するが、そのリガンドの一つである CRTH2 の鼻粘膜での mRNA 発現量と浸潤好酸球数は有意な正の相関を示す⁹⁾。一方遅発相では、浸潤してきた T 細胞が主体となって、IL-4, IL-5, IL-13 などの Th2 タイプのサイトカイン産生が盛んに行われ、さらなる好酸球浸潤を引き起こす。このように即時相では肥満細胞主導、遅発相では T 細胞主導で好酸球浸潤がコントロールされていると考えられる¹⁰⁾ (表 1)。

ヒト好酸球にはいくつかのサイトカインを産生する能力があることが次々と報告されている。さらに、好酸球による IL-3, GM-CSF 産

表 1 好酸球動員に関わる因子

	サイトカイン・ケモカイン	接着分子	受容体	ケミカルメディエーター	その他
産生・分化・増殖	IL-5 GM-CSF IL-3				
血管内皮への接着	<接着分子発現> TNF- α IL-1 IL-5 IL-4	<好酸球> LFA-1 (CD11a/CD18) Mac-1 (CD11b/CD18) VLA-4 PSGL-1	<血管内皮> ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 ICAM-1 VCAM-1 P-セレクチン		
局所への遊走・浸潤	エオタキシン-2, -3, MCP-2, MCP-3, MCP-4, RANTES, MIP-5 IL-16 IL-5 IL-3 & GM-CSF	CCR3		ECF-A LTB ₄ LTD ₄ PGD ₂ PAF ヒスタミン fMLP HETEs	C5a C567 シクロフィリン

生はいわゆるオートクライン機構を介して好酸球の生存延長に寄与している可能性も示唆されている。これらサイトカインの産生は *in vitro* だけでなく *in vivo* においても認められている。しかし、実際の病態においてどのような生理的刺激が好酸球のサイトカイン・ケモカイン産生に関わっているのかははっきりしていない。抗原刺激後遅発相に認められる IL-5 mRNA 発現細胞のおもなものは T 細胞であるが、好酸球にも数 % IL-5 陽性細胞が認められており、アレルギー炎症における効果細胞としての役割を示唆している可能性もある³⁾。

○ アレルギー性鼻炎における好酸球

喘息では、好酸球は脱顆粒により顆粒内容物を放出し、炎症ひいては組織傷害を起こすと考えられる。好酸球から放出される major basic protein (MBP)、好酸球カチオン性蛋白 (ECP)、好酸球ペルオキシダーゼ (EPO)、好酸球由来神経毒 (EDN) などのカチオン性蛋白は上皮層破

壊、気管支過敏性亢進、気管支筋痙攣、血管透過性亢進、上皮細胞線毛機能障害などをきたすといわれている¹¹⁾。

アレルギー性鼻炎の患者の鼻粘膜を電顕で観察すると、鼻粘膜上皮内に浸潤した好酸球は脱顆粒像を示しているものが多い。また、鼻粘膜組織中の活性化 (EG2 陽性) 好酸球の割合は、アレルギーのそれが非アレルギーのものに比べて有意に高いことが知られている。さらに、同一アレルギー患者で鼻汁中と血中の好酸球の比重を比較してみると、鼻汁中の好酸球は有意に低比重であった¹²⁾。また、鼻粘膜への抗原誘発により浸潤した好酸球の周囲には変性した鼻粘膜上皮細胞が観察されることが報告されている。すなわち、アレルギー性鼻炎の鼻粘膜局所では、好酸球が活性化され脱顆粒を起こし、気道炎症に何らかの関わりがあることが十分に推察される。しかし、鼻粘膜の粘液線毛輸送能は正常に保たれ、鼻汁好酸球増多と鼻粘膜ヒスタミン過敏性反応や抗原鼻誘発反応との間には相

表 2 マウスアレルギー性鼻炎モデルにおける好酸球制御因子

因子	抗原特異的 IgE 産生	鼻粘膜内好酸球浸潤	文献
CD80	↑ (感作相)	↑ (感作相)	16
CD86	→ (感作相)	→ (感作相)	16
CD40	↑	↑	17
STAT-1	↑	↑	18
FcγR II B	↑ (BALB/c)	↓ (BALB/c)	19
IL-4	↑	→	20
男性ホルモン	↓	→	21
結核菌抽出抗原	↓ (感作相)	↓ (感作相)	22
エンテロトキシン	↑	↑	23
拘束ストレス	↓	→	24
住血吸虫卵抗原糖鎖	↑	↑	25
アスペルギルス抗原糖鎖	↑	↑	26

関がみられるものの、高くはないことも知られている⁵⁾。全般的にみて好酸球は、アレルギー性鼻炎では喘息でいわれるような組織学的な局所傷害は強くないといえる。

● 鼻過敏性亢進と好酸球

アレルギー性鼻炎患者ではアレルゲン刺激のみならず、気温の変化、乾燥、冷風、タバコの煙などの非特異的な物理的・化学的な刺激あるいはヒスタミンやメサコリンといったメディエーター刺激に対して過敏に反応して、くしゃみ、水様性鼻漏、鼻閉の症状が過大に出現する。この非特異的な過敏性亢進はアレルギー性鼻炎の大きな特徴の一つである¹⁰⁾。

鼻粘膜過敏性には、おもに三叉神経、とくに知覚性 C 線維を求心路とした神経反射が関与する。さらに非特異的過敏性の変化はほとんどの場合、局所の好酸球浸潤の変化と並行して変動する。したがって、アレルギー性鼻炎における非特異的過敏性の亢進は、好酸球浸潤を中心としたアレルギー性炎症反応がおもな原因となっていると考えられる。特異顆粒蛋白である MBP, EPO, ECP, EDN は鼻粘膜反応性を亢進されることで、ケミカルメディエーターによって惹起された鼻アレルギー症状を増幅させている。さらに、好酸球を sIgA と IL-5 で刺激すると、その上清に交感神経や知覚神経の成長に必須の因子である NGF の活性を認め、神経

芽の成長が促されることが示されている¹³⁾。またアレルギー性鼻炎患者の鼻汁中 NGF 濃度は、好酸球浸潤の程度と相関するようである。このことからアレルギー性炎症では好酸球から放出される NGF により知覚神経の成長が促進され、さらに局所の過敏性が増悪する可能性が示唆される¹⁴⁾。

● マウスアレルギー性鼻炎モデルにおける好酸球浸潤の制御因子 (表 2)

BALB/c などのマウスにマンソン住血吸虫卵抗原などの抗原を繰り返し点鼻感作すると、鼻粘膜内好酸球浸潤が誘導される¹⁵⁾。本モデルを用いることで、各種因子の *in vivo* 好酸球浸潤における関与を解析することが可能である。われわれのこれまでの検討では、CD80 や CD40 などの共刺激分子、あるいは転写因子 STAT-1 は好酸球浸潤を誘導し^{16~18)}、逆に IgG 受容体の一つである FcγR II B は好酸球浸潤を抑制する¹⁹⁾ (図 3)。また IL-4 や性差 (男性ホルモン) は好酸球浸潤に関与しなかった^{20,21)}。環境因子に目を向けると、結核菌抽出抗原 PPD の点鼻投与は鼻粘膜好酸球浸潤を抑制し、逆にブドウ球菌エンテロトキシン B の点鼻投与は鼻粘膜内好酸球浸潤を増悪させた^{22,23)}。アレルギー疾患増加の主要因子として最近注目されている衛生仮説 (hygiene hypothesis) を検証するうえでも興味深い。拘束ストレスは IgE 産生を抑制するもの

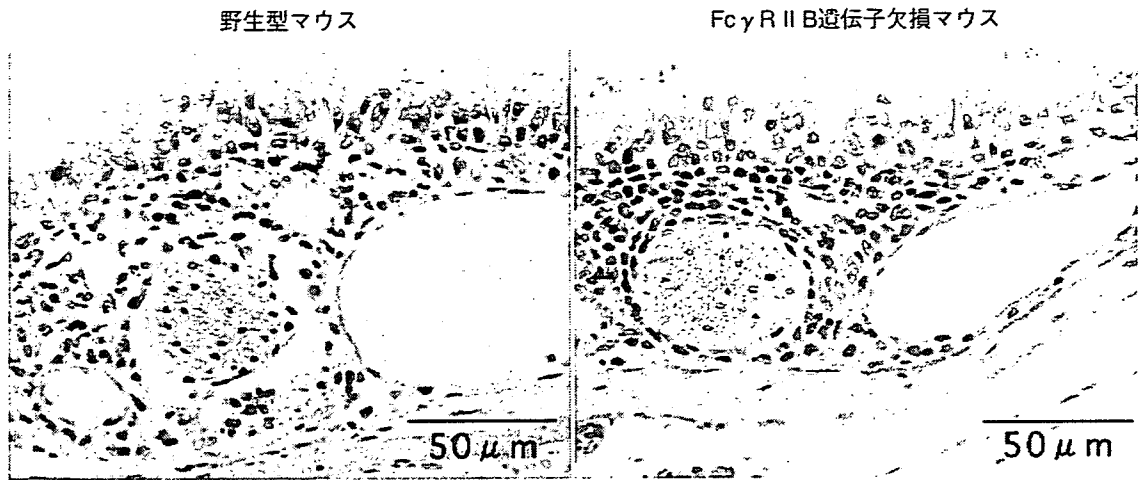


図3 マウスアレルギー性鼻炎モデルにおける FcγR II B の鼻粘膜内好酸球浸潤への関与
野生型マウス (左) に比較して FcγR II B 遺伝子欠損マウス (右) において有意に強い好酸球浸潤がみられることから、FcγR II B は好酸球浸潤に抑制的に働くことが示唆される。

の、好酸球浸潤には影響を与えなかった²⁴⁾。また抗原因子からは抗原を構成する糖鎖の一部は好酸球浸潤を誘導するアジュバント作用を有する^{25,26)}。

● おわりに

好酸球に関する新しい報告は次々となされている。抗好酸球抗体²⁷⁾、抗 IL-5 抗体²⁸⁾の投与による好酸球の消去のアレルギー反応への影響も否定の傾向が生まれつつある。好酸球悪玉説は少なくともアレルギー性鼻炎では実証が十分とはいえ、喘息と同一視すべきではない。鼻粘膜の非特異的過敏性の亢進は局所の抗原曝露により生じるが、それを規定する細胞の一つが好酸球である。さらにそれらの細胞の浸潤や活性化を規定するものとして、さまざまな局所的な因子の働きが重要である。今後もマウスモデルなども含めてさらなる解明が進み、好酸球に関する研究がますます発展することが期待される。

文献

- 1) Eyer mann CH. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1927 ; 3 : 808-15.
- 2) 成田慎一郎. *日耳鼻* 1994 ; 97 : 1062-9.
- 3) Saito H, Asakura K, Kataura A. *Acta Otolaryngol* 1994 ; 114 : 315-23.
- 4) Cameron L, Christodoulou poulous P, Lavigne F, Nakamura Y, Eidelman D, McEuen A, et al. *J Immunol* 2000 ; 164 : 1538-45.
- 5) Shichijo M, et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 ; 307 : 518-25.
- 6) 増山敬祐. *耳喉頭頸* 2004 ; 76 : 189-97.
- 7) Matsui T, Asakura K, Shirasaki H, Kataura A, Himi T. *Acta Otolaryngol* 2000 ; 120 : 973-80.
- 8) 奥田稔. *アレルギー科* 2000 ; 10 : 429-35.
- 9) Okano M, Fujiwara T, Sugata Y, Gotoh D, Yoshihisa M, Sogo M, et al. *Am J Rhinol* 2006 ; 20 : 342-8.
- 10) 朝倉光司. *アレルギーの臨床* 2001 ; 21 : 436-41.
- 11) Gleich GHJ. *Allergy Clin Immunol* 2000 ; 105 : 651-3.
- 12) Masuyama K, Samejima Y, Ishikawa T. *Acta Otolaryngol* 1988 ; 458 : 181-9.
- 13) Kobayashi H, Gleich GJ, Butterfield JH, Kita H. *Blood* 2002 ; 99 : 2214-20.
- 14) 足立哲也, 大田健. *Annual Review 呼吸器* 2004 ; 37-44.
- 15) Okano M, Nishizaki K, Abe M, Wang MM, Yoshino T, Satoskar AR, et al. *Allergy* 1999 ; 54 : 593-601.
- 16) Okano M, Azuma M, Yoshino T, Hattori H, Nakada M, Satoskar AR, et al. *Am J Respir Care Med* 2001 ; 164 : 1501-7.
- 17) Hattori H, Okano M, Kariya S, Nishizaki K, Satoskar AR. *Am J Rhinol* 2006 ; 20 : 165-9.
- 18) Hattori H, Okano M, Kariya S, Nishizaki K, Satoskar AR. *Am J Rhinol* 2006 ; 20 : 165-9.
- 19) Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta N, et al. *Am J Respir Care Med* 2004 ; 169 : 105-12.
- 20) Okano M, Yoshino T, Nishizaki K, Satoskar AR, Brombacher F, Satoskar AA, et al. *Allergy* 2000 ; 55 : 723-31.
- 21) Yamamoto T, Okano M, Ono T, Nakayama E, Yoshino T, Satoskar AR, et al. *Allergy* 2001 ; 56 : 525-31.
- 22) Hattori H, Okano M, Yamamoto T, Yoshino T, Yamashita Y, Watanabe T, et al. *Clin Exp Allergy* 2002 ; 32 : 951-8.

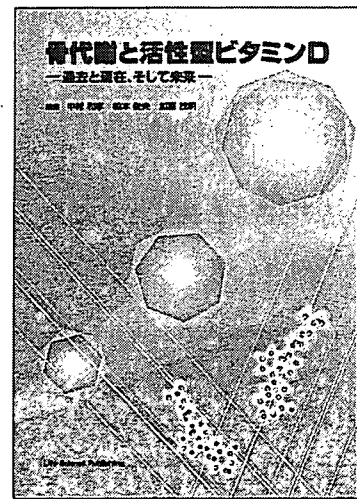
- 23) Okano M, Hattori H, Yoshino T, Sugata Y, Yamamoto M, Fujiwara T, et al. Clin Exp Allergy 2005 ; 35 : 506-14.
- 24) Nishioka K, Okano M, Ichihara Y, Ichihara N, Nishizaki K. International Archives of Allergy and Immunology 2005 ; 136 : 142-7.
- 25) Okano M, Statoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA. J Immunol 1999 ; 163 : 6712-7.
- 26) Yamashita Y, Okano M, Yoshino T, Hattori H, Yamamoto T, Watanabe T, et al. Clini Exp Allergy 2002 ; 32 : 776-82.
- 27) Gleich GJ, Olson GM, Loegering DA. Immunology 1979 ; 38 : 343-53.
- 28) Milgrom HM, Fick RB, Sn JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, et al. N Engl J Med 1999 ; 341 : 1966-73.

骨代謝と活性型ビタミンD

— 過去と現在、そして未来 —

監修 中村利孝 産業医科大学整形外科
 松本俊夫 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体情報内科学
 加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研究所核内情報分野

ビタミンDの基礎・臨床研究において、わが国の研究者の貢献はきわめて大きいものがある。また、現在進められている活性型ビタミンD誘導体の開発においても、わが国の研究が世界をリードしている。本書は、わが国で活性型ビタミンD製剤の臨床応用が開始されて25年を迎えるにあたり、とりわけ骨代謝制御における活性型ビタミンDの役割に焦点を当て、その研究の歴史を振り返るとともに最新の成績をまとめ、さらに将来を展望するべく企画された。ビタミンD研究、骨代謝研究、骨粗鬆症をはじめとする代謝性骨疾患の診療に携わる研究者・臨床医に最適の一冊。



◆A4判、160ページ
 定価：本体2,800円＋税
 [ISBN4-89775-225-6 C3047]



ライフサイエンス出版 〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町11-7
 TEL 03 (3664) 7900 FAX 03 (3664) 7734 / 7735 URL <http://www.lifescience.co.jp/>

アレルギー性鼻炎の発症機序と遺伝

岡野光博*

Mitsuhiro OKANO

● Key Words ● アレルギー性鼻炎, アレルギー発症機序, 遺伝

はじめに

アレルギー性鼻炎の発症には、まず感作の成立、すなわち花粉やダニといった吸入性アレルゲンに対する Th2 型の免疫応答が誘導され、その結果産生されたアレルゲンに特異的な IgE が肥満細胞に固着することが必須である。感作された個体にアレルゲンが再侵入すると、I 型の過敏反応として発作性の 3 主徴、すなわちくしゃみ、水様性鼻漏、鼻閉をきたす。さらに反復した抗原曝露はアレルギー性炎症の増悪をきたし、鼻閉の増強および抗原特異的・非特異的な過敏性の亢進を引き起こす。

本稿では感作・発症のメカニズムと、この一連のプロセスに関連する遺伝的素因について概説する。

I. 感作のメカニズム

鼻粘膜で捕捉されたアレルゲンは粘液中で溶出し、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC) に貪食される。APC 内でアレルゲンはアミノ酸 10 数個からなる抗原ペプチド (T 細胞エピトープ) に分解され、ヒトでは HLA クラス II 分子と結合し細胞表面に提示される。この情報をヘルパー T 細胞は共刺激分子とともに T 細胞受容体を介して認識する。

T 細胞は主に IL-4 の存在下で Th2 細胞に分化し、IL-4, IL-5, IL-13 などのサイトカインを産生し、また CD 40 L などの共刺激分子を発現

する。これらのシグナルによって B 細胞は活性化し、最終的に IgE を産生する形質細胞に分化する。産生された IgE は肥満細胞上の FcεRI に固着し、感作が成立する。IL-5 は好酸球にも働き、活性化や生存率の延長を介して鼻粘膜内への好酸球浸潤を誘導する。IL-13 は粘液産生にも関与する。すなわち、アレルギー性鼻炎は Th2 型の免疫疾患と言える¹⁾ (図 1)。

II. 症状の発現—即時相と遅発相—

花粉症患者を対象に、花粉非飛散期に単回抗原誘発を行うと 2 相性の反応が誘導される²⁾。即時相は誘発後数分以内に出現し、くしゃみ、鼻漏を、次いで鼻閉を認める。即時相は肥満細胞を介した反応が中心となる。すなわち、細胞表面の特異的 IgE がアレルゲンと結合することにより架橋が起こり、FcεRI の凝集を介して肥満細胞が活性化される。肥満細胞は脱顆粒し、ヒスタミンやトリプターゼなどの化学伝達物質を放出する。さらに肥満細胞はアラキドン酸カスケードの活性化によりプロスタグランジン (PG, 主に PGD₂) やロイコトリエン (LT), トロンボキサン (TX), PAF などの脂質メディエーターやサイトカインを新たに産生する。

30~40% の患者では鼻閉はその後も続き、遅発相として誘発 6~12 時間後に第 2 のピークを迎える。遅発相の組織内には主に好酸球や CD 4 陽性 T 細胞の浸潤を認め、また鼻汁中には LT, キニン, あるいは ECP や EPO などの好酸球由来のメディエーターが増加することから、これらの炎症細胞やメディエーターが遅発相発現に関与していると考えられている。

* 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 (〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1)

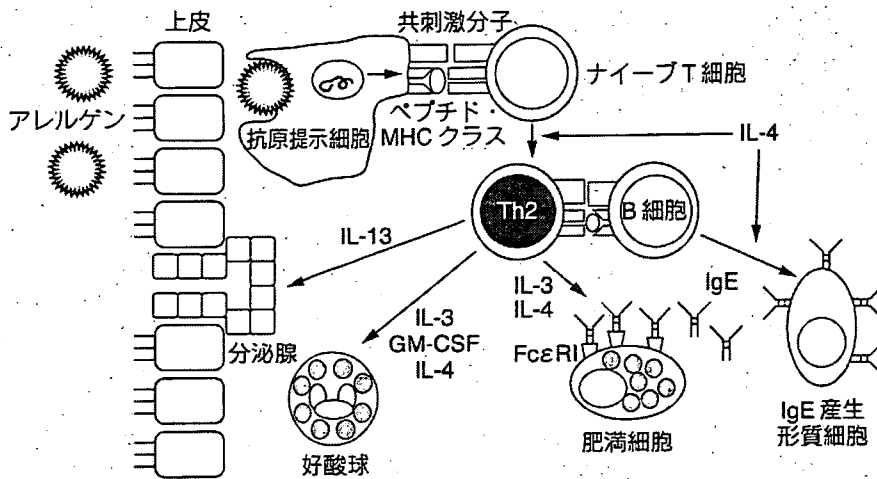


図1 Th2細胞を中心としたアレルギー性鼻炎の感作メカニズム

III. 症状の発現メカニズム

くしゃみはヒスタミンを介した呼吸反射である。すなわち肥満細胞の脱顆粒により放出されたヒスタミンは鼻粘膜の上皮細胞間や固有相に分布する知覚神経終末(三叉神経)のH₁受容体を刺激する。求心性のインパルスは三叉神経主知覚核よりくしゃみ中枢を刺激し、くしゃみを引き起こす。

一般的に鼻汁は、腺細胞(鼻腺, 杯細胞)からの分泌物, 細静脈から漏出した血漿成分, および涙液や呼気からの結露よりなる。アレルギー性鼻炎における鼻汁の過分泌は、くしゃみと同様に神経反射を介したものと、メディエーターの血管・分泌腺に対する直接作用の両者による。しかしながら鼻炎患者でVidian神経(翼突管神経)を切断すると切断側の抗原誘発による鼻汁分泌はほぼ完全に抑制されることから、その産生はくしゃみと同様にヒスタミンによる知覚神経終末のH₁受容体刺激に始まり、分泌中枢(上唾液核)からの副交感神経反射による鼻腺への作用が中心となっている³⁾。

鼻閉, すなわち鼻粘膜腫脹には血管系が大きく関与する。即時相では鼻粘膜容積血管の拡張と、血管透過性の亢進による血漿漏出・鼻粘膜浮腫をきたす。いずれの要因に対しても、ヒスタミン, LTなどの肥満細胞からのメディエーターの直接

作用と、神経反射を介した作用が関与する。抗原曝露早期の鼻粘膜腫脹には副交感神経終末から放出されるNOが関与し、また遷延化する鼻粘膜腫脹にはメディエーター, 特にLTなどの脂質メディエーターの直接作用が関与する。

さらに反復した抗原曝露はアレルギー性炎症の増悪をきたし、鼻閉の増強および抗原特異的・非特異的な過敏性の亢進をきたす。アレルギー性炎症は、組織学的には上皮細胞の多層化, 杯細胞・分泌腺の腫大, 浮腫, 好酸球, リンパ球, 特にTh2型ヘルパーT細胞, 肥満細胞などの鼻粘膜内への浸潤などで示される(図2)。

IV. アレルギー性鼻炎の感作・発症における遺伝学的解析(図3)

疾患関連遺伝子に対する代表的な遺伝学的解析手法として,

- 1) 患者一対照研究(case-control study)
- 2) 兄弟例を用いた罹患同胞対解析(affected sib-pair analysis)
- 3) 大家系を用いた連鎖解析(linkage analysis)

が挙げられる。さらに最近ではSNP(single nucleotide polymorphism)による疾患関連遺伝子の解析が進んでいる。

SNPは人口の1%以上の頻度で存在する一塩基多型と定義され、数百~千塩基対に一カ所程度

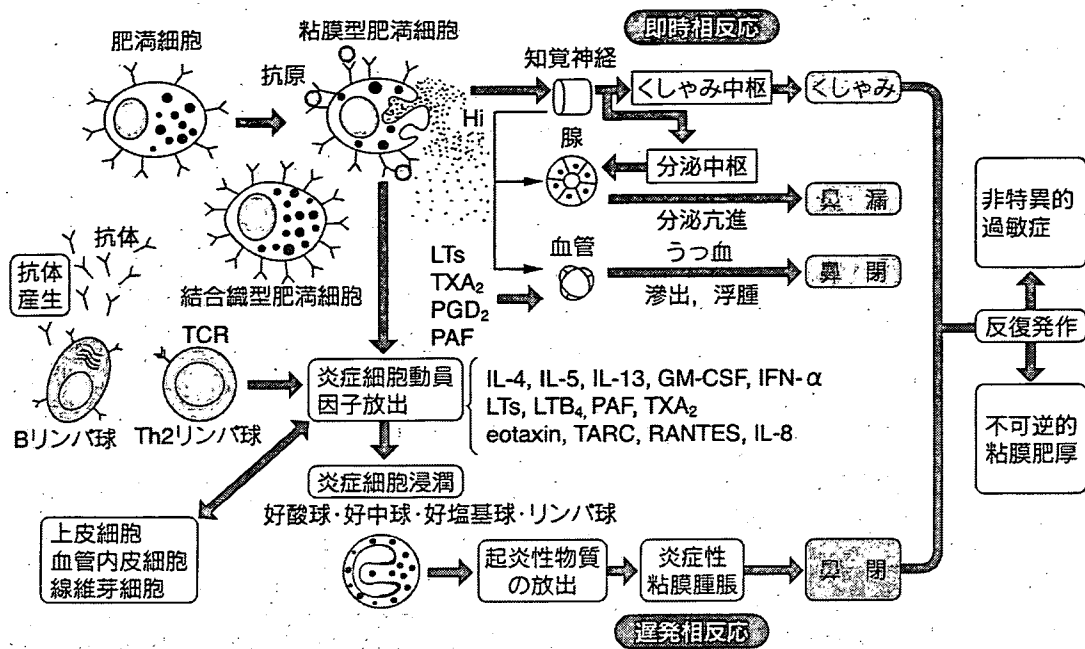


図2 アレルギー性鼻炎の発症メカニズム
 (鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会：鼻アレルギー診療ガイドライン—通年性鼻炎と花粉症—，
 ライフサイエンスメディカ，2005)

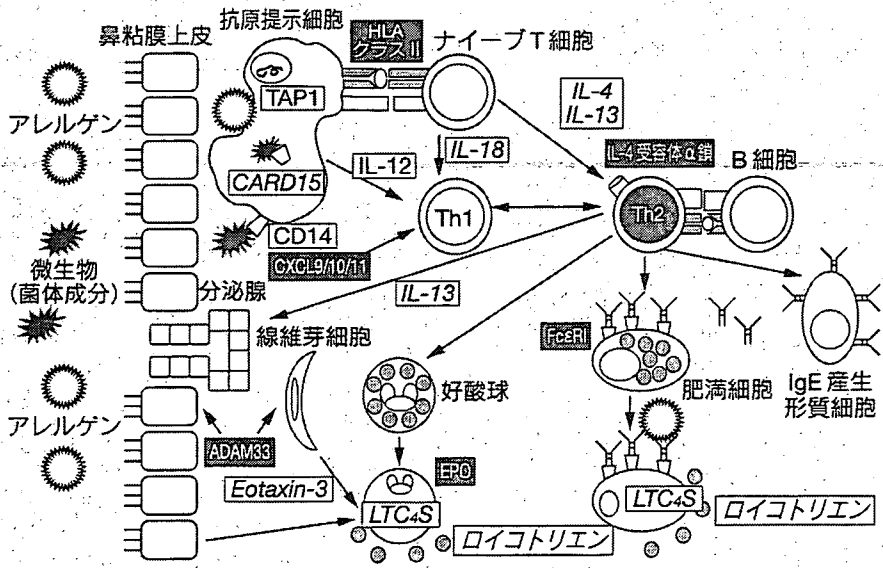


図3 本邦におけるアレルギー性鼻炎の感作・発症に関する遺伝子
 白抜き文字は遺伝学的に日本人アレルギー性鼻炎の感作・発症との関連が示されている分子，枠囲みは遺伝学的に関連が否定されている分子，斜文字は海外での検討はなされているが日本人での報告はみられない分子を示す。

存在するとされている。日本人においては全ゲノムのなかにSNPは約20万カ所存在することが明らかとなっている。すなわちSNPはマイクロ

サテライトマーカーなどと比較してゲノム上により高密度に分布している。したがって疾患の有無により有意差を認めたSNPと疾患関連遺伝子は

より近い位置に存在することとなる。現在、アレルギー性鼻炎の遺伝子解析に最も多く用いられている方法である。

1. HLA クラスII

アレルゲンに代表される外因性抗原に対するT細胞の認識は、ヒトでは通常HLAクラスII拘束性を示す。例えば日本人ダニ鼻アレルギー患者では、ヤケヒョウヒダニの主要アレルゲンDer p2を構成するT細胞エピトープのうちp33-47はDRB1*1502に、またp58-73はDRB1*0406に拘束される。そこで古くよりアレルギー性鼻炎に関連するHLAクラスIIハプロタイプの同定が行われてきた。

日本人のアレルギー性鼻炎集団においてはダニアレルギーおよびスギ花粉症とともにHLA-DQW3を有する頻度が高い⁴⁾。また白色人種での検討では、ブタクサアレルゲンAmb a5に対する感作はHLA-DR2/Dw2に関連し、カモガヤやヤケヒョウヒダニに対する感作はHLA-DR3に関連する。さらに最近では気道アレルギーとしてone airway one diseaseの概念が提唱されているが、イネ科花粉症患者のうちHLA-DRB1*02およびB5*ハプロタイプを有するものが鼻炎のみならず喘息をも有意に引き起こす。

またHLAは6番染色体(6q21.3)に存在するが、この部位にはHLAと同様に抗原提示に関与するTAP (transporters associated with antigen processing) 1遺伝子が存在する。チュニジア人においてはTAP1の遺伝子多型が鼻アレルギーと相関しているが、日本人においては本多型と鼻アレルギーの発症には関連を認めなかった⁵⁾。

2. 高親和性IgE受容体(FcεRI)β鎖

FcεRIはα鎖、β鎖、γ鎖で構成され、肥満細胞および好塩基球に選択的に発現する。1989年に最初の“アトピー遺伝子”として第11染色体長腕(11q13)がマッピングされたが、この部位にFcεRIβ鎖遺伝子が存在することから多型解析が進んでいる。日本人においてはエクソン7に存在するコーディングSNPであるGlu237Glyが知られている。Glu237のホモ接合体に比較し

てGly237アリルを有するものはダニ鼻アレルギーおよびスギ花粉症の頻度が有意に高くなる⁶⁾。

3. IL-4, IL-13, IL-4受容体

前述のようIL-4やIL-13は代表的なTh2型サイトカインである。ヒトIL-4およびIL-13は5番染色体(5q31)にあり、IL-12BなどとともにT細胞分化に関わるサイトカイン遺伝子クラスターを形成している。IL-4遺伝子は4つのエクソンから構成され、日本人においては10以上のSNPが存在する。白人小児を対象とした解析では、プロモーター領域のSNP-589C/TにおいてTTホモ接合体をもつ児にアレルギー性鼻炎の罹病率が有意に高い。日本人のアレルギー性鼻炎を対象とした報告はみられないが、喘息ではIL-4の遺伝子多型はIgE産生に影響しない⁷⁾。

一方、IL-13に関しては、プロモーター領域には-1112C/Tの、また翻訳領域内にはArg130GlnのSNPがアレルギーと関与することが知られている。中国人アレルギー性鼻炎成人を対象とした調査では、これらのSNPはいずれも発症に関与していないが、Gln130アリルを有する群はArg130アリルホモ接合群と比較して血清総IgE量が有意に高い。

受容体に関する検討も進んでいる。IL-4受容体はヘテロダイマーであるが、α鎖遺伝子(IL-4RA)には少なくとも13のSNPがある。本邦のスギ花粉症を対象とした検討では、Ile50ValとGlu375Alaの2つのSNPはスギ花粉症の感作に関連する。すなわちスギ花粉症患者ではIle50とGlu375の頻度が高く、さらに未発症者の中でも感作群は未感作群と比較してIle50とGlu375の頻度が有意に高い⁸⁾。

4. IL-18, IL-12

IL-18はIL-12との共存下では強力にIFN-γ産生などのTh1型免疫応答を誘導する一方、単独ではIL-4やIL-13産生さらにはIgE産生を誘導するユニークなサイトカインである。遺伝子は11番染色体(11q22)に存在し、現在までにプロモーター領域も含め少なくとも8カ所のSNPが

確認されている。ドイツ人を対象とした調査で、エクソン1にある SNP 127 C/T において 127 T はイネ科やカバノキ科花粉などのアレルゲン感作に関わるのみならず、季節性アレルギー性鼻炎の罹患に有意に関与した⁹⁾。日本人での報告はいまだないが、韓国人ではプロモーター領域-607の SNP (ジェノタイプ AC) の頻度がアレルギー性鼻炎患者で有意に高い。

一方、IL-12 は IgE の産生を抑制し、IFN- γ 産生を介して Th1 分化を誘導するサイトカインである。IL-12 のサブユニット p40 を規定する遺伝子 IL-12 B は IL-4 や IL-13 と同じく 5q31 にあり、少なくとも4カ所の SNP が存在する。日本人を対象とした解析では、IL-12 B の多型性とアレルギー性鼻炎の間には関連を認めなかった¹⁰⁾。

5. ロイコトリエン C₄合成酵素

ロイコトリエンは肥満細胞や好酸球などから産生され、鼻閉 (即時相および遅発相) や過敏性の亢進、さらに粘液産生にも深く関与する。ロイコトリエン C₄合成酵素 (LTC₄S) のプロモーター領域-444 には A/C の SNP があり、本邦においてもアスピリン喘息患者では C アリルを有する頻度が高いことが知られている。アレルギー性鼻炎における本邦での報告はいまだみられないが、トルコ人を対象とした解析ではアレルギー性鼻炎患者で C アリルを有する頻度が有意に高い¹¹⁾。

6. EPO, eotaxin

好酸球の機能に関する分子についても検討が進んでいる。好酸球が放出する組織障害性顆粒としては、eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO), major basic protein (MBP) などが知られており、これらは鼻粘膜誘発に伴い鼻汁中濃度が上昇する。このうち EPO には SNP が存在し、なかでも Pro 358 Leu はスギ花粉症の発症に連鎖する。すなわちスギ花粉症患者では 358 Leu の頻度が高く、さらにこの頻度は感作未発症群と比較しても有意に高い¹²⁾。また、好酸球の遊走に選択的に関与するケモカインとして Eotaxin がある。韓国人集団を対象と

した検討では、Eotaxin-3 の SNP (+2497 T>G) において G アリルの頻度がアレルギー性鼻炎で有意に高い。

7. ADAM 33

ADAM 33 はメタロプロテアーゼスーパーファミリーのひとつである。メタロプロテアーゼは細胞外マトリックスの分解などを介して鼻粘膜の上皮障害やリモデリングに関与する可能性が示唆されている。喘息では ADAM 33 の SNP が特に気道過敏性に連鎖することが示されている。日本人では ADAM 33 には 22 の SNP が存在し、その中の6カ所 (うち3つはエクソンに存在) の SNP がスギ花粉症の発症と連鎖する。さらにスギ花粉症患者のなかでは、5カ所の non-coding SNP が花粉症の重症度、鼻汁中好酸球陽性あるいは血清スギ特異的 IgE 抗体価と関連する¹³⁾。

8. CARD 15, CD 14

前述のように一卵性双生児を対象とした検討からも、アレルギーの成立に遺伝的素因が関与することは明らかである。しかしながらその一致率は低く、一卵性双生児においてもわずかに25%であった。このことはアレルギー疾患の成立においては遺伝的素因よりも環境因子や抗原活性の方が重要であることを示している。さらに近年、“hygiene hypothesis (衛生仮説)” という概念が提唱され、感染や菌体成分への曝露がアレルギーの感作および発症を抑制することが示されている。

エンドトキシン (LPS) はアレルギーの感作・発症を制御する菌体成分として注目されている。エンドトキシンに対する応答性を規定する遺伝的素因がアレルギー性鼻炎の発症を制御する可能性を示唆する報告がみられている。LPS の細胞内受容体である caspase recruitment domain containing protein 15 (CARD 15) には13カ所の SNP があるが、ドイツ人では C 2104 T および G 2722 C の2カ所で、T 2104 および C 2722 のジェノタイプを示す頻度がアレルギー性鼻炎患者で有意に高い。これらの変異をきたした場合、CARD 15 活性化に伴う NF- κ B の活性化が抑制されることが知られており、LPS に対する自然

免疫の低下がアレルギー発症の要因とする衛生仮説の概念とも一致する。

一方、単球やマクロファージ、好中球などの膜表面に発現され、LPSなどの菌体成分に対するレセプター分子にCD14がある。CD14遺伝子はIL-4などと同様に5番染色体(5q31-33)に存在する。本遺伝子のプロモーター領域-159にはC/TのSNPがあり、オランダ人集団ではジェノタイプCCで血清総IgE量が高値を示し、鼻アレルギーや花粉症を訴える頻度が有意に高いことが知られている。しかしながら、ドイツ人集団を対象とした最近の検討では、本多型と鼻アレルギーとの関連を見いだせなかった。フランスでの調査では、ジェノタイプTTを有するとアレルギー性鼻炎に罹患しやすく、さらに生後早期(一年以内)に農場での生育を受けたものではアレルギー性鼻炎のリスクが半減することが示された。この結果は、アレルギー性鼻炎の発症要因としての環境と遺伝的素因を結びつける報告として興味深い。

本邦では、アレルギー性鼻炎患者と健常人との間にジェノタイプの差を認めないが、アレルギー性鼻炎患者ではジェノタイプTTを有するものはスギやカモガヤとの重複感作が少なく、またダニに対するCAPスコアが有意に低い¹⁴⁾。韓国での通年性アレルギー性鼻炎患者を対象とした検討でも、ほぼ同様の結果がみられている。

9. 全ゲノム解析

上述した花粉症・鼻アレルギーに関連した遺伝子の同定は、すべて候補遺伝子解析によるものである。一方、疾患関連遺伝子を包括的に検討するには染色体全域にわたる解析、すなわち全ゲノム解析を行うことが理想的である。花粉症・鼻アレルギーに対する全ゲノム解析として、33のオランダ人鼻アレルギー家系を対象とし、446のマイクロサテライトマーカーを用いた罹患同胞対解析(affected sib-pair analysis)が行われた。その結果、アレルギー性鼻炎の発症には4番染色体(4q24-27)がLODスコア2.83で最も関連することが報告されている。

本邦でも全ゲノム解析が行われ、カモガヤ花粉

症の発症に4番染色体短腕(4q)がLODスコア2.01で強い連鎖を示した。さらに詳細な解析を行うと、4q21に存在しSDAD1遺伝子やCXCケモカイン(CXCL9, CXCL10, CXCL11)遺伝子を含むハプロタイプブロックがカモガヤ花粉症と強い連鎖を認めた¹⁵⁾。これらのケモカインは主にIFN- γ で誘導されTh1細胞に作用するケモカインであるが、カモガヤ花粉症では飛散後に花粉症患者でのみ血清CXCL9値が低下することが知られており花粉症との関連が示唆されている。

おわりに

以上、アレルギー性鼻炎の感作・発症のメカニズムと、これに関連する遺伝子について概説した。本疾患は遺伝的素因と環境が複雑に関与し、その病態を形成しているが、環境因子の働きにも素因が関与することが明らかとなり、従来考えられていた以上に遺伝子は複雑に花粉症に関与するのかもしれない。21世紀は予防医学の時代と言われている。将来アレルギー性鼻炎に関しても感作や発症の予防が重要になることであろうし、そのためには疾患関連遺伝子のさらなる同定と遺伝子機能解析による詳細な感作・発症メカニズムの解析が望まれる。

文献

- 1) Durham SR, Ying S, Varney VA, et al : Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation ; Relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol* 148 : 2390-2394, 1992.
- 2) 朝倉光司 : アレルギー性鼻炎の炎症と制御. *炎症と免疫* 6 : 353-359, 1998.
- 3) Konno A, Terada N, Okamoto Y, et al : The role of chemical mediators and mucosal hyperreactivity in nasal hypersecretion in nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 79 : 620-627, 1987.
- 4) Sadanaga Y, Uno M, Kitao Y, et al : Investigation of the genetic regulation in allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 17 : 23-32, 1990.
- 5) Takeuchi K, Abe S, Masuda S, et al : Lack of association between gene polymorphism of transporters associated with antigen processing and allergic rhinitis in a Japanese population. *Ann Otol*

- Rhinol Laryngol 111 : 460-463, 2002.
- 6) Nagata H, Mutoh H, Kumahara K, et al : Association between nasal allergy and a coding variant of the FcεRIβ gene Glu 237 Gly in a Japanese population. Hum Gent 109 : 262-266, 2001.
 - 7) Noguchi E, Shibasaki T, Arinami K, et al : Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. Clin Exp Allergy 28 : 449-453, 1998.
 - 8) Nakamura H, Miyagawa K, Ogino K, et al : High contribution contrast between the genes of eosinophil peroxidase and IL-4 receptor α-chain in Japanese cedar pollinosis. J Allergy Clin Immunol 112 : 1127-1131, 2003.
 - 9) Kruse S, Kuehr J, Moseler M, et al : Polymorphisms in the IL-18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 111 : 117-122, 2003.
 - 10) Noguchi E, Yokouchi Y, Shibasaki M, et al : Identification of missense mutation in the IL 12 B gene ; Lack of association between IL 12 B polymorphism and asthma and allergic rhinitis. Genes Immun 2 : 401-403, 2001.
 - 11) Eskandari HG, Unal M, Ozturk OG, et al : Leukotriene C 4 synthase A-444 C gene polymorphism in patients with allergic rhinitis. Otolaryngol Head Neck Surg 134 : 997-1000, 2006.
 - 12) Nakamura H, Miyagawa K, Ogino K, et al : High contribution contrast between the genes of eosinophil peroxidase and IL-4 receptor α-chain in Japanese cedar pollinosis. J Allergy Clin Immunol 112 : 1127-1131, 2003.
 - 13) Cheng L, Enomoto T, Hirota T, et al : Polymorphism in ADAM 33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. Clin Exp Allergy 34 : 1191-1201, 2004.
 - 14) Takeuchi K, Suzuki S, Yamawa M, et al : A CD 14 gene polymorphism is associated with the IgE level for Dermatophagoides pteronyssinus. Acta Otolaryngol 125 : 966-971, 2005.
 - 15) Zhang J, Noguchi E, Migita O, et al : Association of a haplotype block spanning SDAD 1 gene and CXC chemokine genes with allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 115 : 548-554, 2005.

* * *

■ JOHNS バックナンバー② ■

第22巻 第2号 (2006年2月号) 特集/頭位性めまいをめぐって	(2,670円)
第3号 (2006年3月号) 特集/耳鼻咽喉科救急医療マニュアル [増大号]	(4,800円)
第4号 (2006年4月号) 特集/嗄声と失声	(2,670円)
第5号 (2006年5月号) 特集/拡大視処置・手術	(2,670円)
第6号 (2006年6月号) 特集/睡眠時無呼吸症候群	(2,670円)
第7号 (2006年7月号) 特集/薬物・音響による聴覚障害のメカニズムと臨床	(2,670円)
第8号 (2006年8月号) 特集/頭頸部領域の腺癌をどう扱うか	(2,670円)
第9号 (2006年9月号) 特集/3次元画像の実際 [増大号]	(4,800円)
第10号 (2006年10月号) 特集/鼻科診療における論点	(2,670円)
第11号 (2006年11月号) 特集/脈管原性腫瘍をどう扱うか	(2,670円)
第12号 (2006年12月号) 特集/ここまでわかった遺伝子異常	(2,670円)
第23巻 第1号 (2007年1月号) 特集/耳鳴診療のすべて	(2,670円)

* 価格は消費税を含めた定価表示です。

* 上記バックナンバーのご注文ならびに在画照会は下記までご連絡下さい

東京医学社 (販売部) 〒101-0051 東京都千代田区神田神保町2-20-13 Y'sコーラルビル
TEL 03-3265-3551 (代) FAX 03-3265-2750 URL <http://www.tokyo-igakusha.co.jp>

Histamine H4 receptor agonists have more activities than H4 agonism in antigen-specific human T-cell responses

Yuji Sugata,¹ Mitsuhiro Okano,¹
Tazuko Fujiwara,¹ Rie Matsumoto,¹
Hisashi Hattori,¹ Miki Yamamoto,¹
Masahiro Nishibori² and Kazunori
Nishizaki¹

Departments of ¹Otolaryngology-Head & Neck Surgery and ²Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02574.x

Received 10 March 2006; revised 3 January 2007; accepted 3 January 2007.

Correspondence: M. Okano, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikatacho, Okayama 700-8558, Japan.

Email: mokano@cc.okayama-u.ac.jp

Senior author: Mitsuhiro Okano,
email: mokano@cc.okayama-u.ac.jp

Summary

Histamine not only mediates immediate allergic reactions, it also regulates cellular immune responses. H4R is the most recently identified histamine receptor (HR). In the present study, we examined the *in vitro* effect of histamine and H4R agonists on the responses of human T cells to purified protein derivative from *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) and to Cry j1, the major allergen of *Cryptomeria japonica* pollen. Dimaprit, clobenpropit and clozapine, which are H4R agonists, dose-dependently blocked both PPD-induced interferon- γ and Cry j1-induced interleukin-5 production by both peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and antigen-specific T-cell lines. However, the addition of thioperamide, an H3R/H4R antagonist, as well as a mixture of *d*-chlorpheniramine, famotidine and thioperamide, did not reverse the inhibition. Pretreatment of PBMCs with SQ22536 and 8-bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer, had varying abilities to reverse the inhibitory effects of H4R agonists, except for clobenpropit. Moreover, the addition of H4R agonists induced annexin-V expression on PBMCs, especially in CD19⁺ and CD4⁺ cells. cDNA microarray analysis revealed that, among 16 600 genes tested, increased expression following treatment with clozapine was seen in 0.8% of the genes, whereas decreased expression was seen in 3.0% of the genes. These results suggest that H4R agonists inhibit antigen-specific human T-cell responses, although H4R does not appear to be important for this effect. In addition, the present study indicated that there may be orphan receptors or HR subtypes which can bind dimaprit, clobenpropit and clozapine, and that can exert an inhibitory effect on antigen-specific cellular responses via a cAMP/cAMP-dependent protein kinase-dependent, apoptotic pathway.

Keywords: cytokine; histamine; H4R; human studies; T cell

Introduction

Histamine has numerous physiological effects, including the induction of allergic responses and gastric acid secretion. These effects are mediated by several histamine receptors (HRs). To date, four subtypes (H1R, H2R, H3R and H4R) of HRs have been identified and cloned. All belong

to the seven-transmembrane domain G-protein-coupled receptor family, and coupled G proteins and subsequent activated intracellular signals have been characterized.¹ Of these, H4R was most recently identified, and this receptor is expressed at high levels in mast cells and leucocytes.^{2,3}

Histamine not only mediates immediate airway hyper-responsiveness, but also regulates cellular immunity by

Abbreviations: Ag, antigen; APC, antigen-presenting cell; DC, dendritic cell; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HR, histamine receptor; IFN- γ , interferon- γ ; IL, interleukin; 4-MH, 4-methylhistamine; α -MH, alpha-methylhistamine; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; 2-PEA, 2-pyridylethylamine; PKA, protein kinase A; PPD, purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SD, standard deviation; TCC, T-cell clone; TCL, T-cell line; Th1, T helper 1; Th2, T helper 2.

controlling the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, the expression of adhesion molecules, and the migration of inflammatory cells, such as eosinophils.^{1,4,5} The maturation and activity of dendritic cells (DCs) is also affected by histamine.⁶ In addition, histamine regulates T-cell function.^{7,8} For example, histamine can enhance T helper 1 (Th1)-type responses by stimulating H1R, whereas both Th1- and T helper 2 (Th2)-type responses are negatively regulated by H2R.⁷ At present, there is one report that CD8⁺ T cells produce interleukin (IL)-16 in response to histamine activation of H4R.⁹ However, despite the high expression of H4R on both antigen-presenting cells and T cells, it is not known whether signals through H4R affect antigen-specific human T-cell responses.³ Therefore, in the present study, we investigated the roles of H4R agonists in antigen-specific human T-cell responses. The findings presented here may help to identify new therapeutic approaches for using HR agonists to treat allergic diseases.

Materials and methods

Antigen and reagents

The purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) was purchased from Nihon BCG Seizo Co. (Tokyo, Japan). Cry j1 was purified from the crude extracts of *Cryptomeria japonica* pollen using a well-established procedure.¹⁰ The protein concentration was determined using a bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions. Endotoxin contamination was considered to be negligible because of a negative EndospecTM ES test result (Seikagaku Kogyo Corporation, Tokyo, Japan). Histamine was purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). 2-Pyridylethylamine (2-PEA; H1R agonist) and 4-methylhistamine (4-MH; H2R agonist) were provided by GSK (Welwyn, Garden City, UK). Dimaprit (H2R/H4R agonist), clobenpropit (H4R agonist/H3R antagonist) and thioperamide (H3R/H4R antagonist) were purchased from Tocris (Ellisville, MO). Clozapine (H4R agonist) was purchased from MP Biomedicals (Irvine, CA). α -Methylhistamine (α -MH; H3R agonist) was a gift from Professor J. C. Schwartz (INSERM, Paris, France). *d*-Chlorpheniramine (H1R antagonist) and famotidine (H2R antagonist) were provided by Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan). SQ22536 was purchased from Sigma (St Louis, MO). RP-8-Br-cAMP was purchased from BIOLOG Life Science Institute (Bremen, Germany).

Isolation and culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

All experiments were approved by the Institutional Review Board in the affiliated hospital of Okayama University Graduate School of Medicine. Informed consent was

obtained from each volunteer. Twelve Japanese subjects (five men and seven women; age 20–52 years; mean age 39.5 years) with positive tuberculin skin tests, and 12 Japanese patients (seven men and five women; age 19–59 years; mean age 37.4 years) with Japanese cedar pollinosis showing a positive skin scratch test to Japanese cedar pollen, were examined. PBMCs were isolated and cultured as described previously.¹¹ The culture medium used throughout the study was RPMI-1640 (Sigma) supplemented with 10% human AB serum (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 100 U/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin (Sigma) and 20 mM L-glutamine (Gibco BRL, Grand Island, NY). In brief, PBMCs (1×10^6 /ml) were incubated in the presence or absence of 2 μ g/ml of PPD or 10 μ g/ml of Cry j1, together with histamine and/or HR-selective agonists or antagonists, for 72 hr in 24-well plates (Corning Inc., Corning, NY) at 37° in a 5% CO₂/air mixture. To determine the involvement of adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase A (PKA) in the action of HR agonists, PBMCs were pretreated for 1 hr at 37° with 5 mM SQ22536 and 5 mM RP-8-Br-cAMP, respectively.¹² After this incubation, the cells were washed twice with culture medium and then cultured as described above.

Generation and culture of antigen-specific T-cell lines

The CD4⁺ PPD⁻ and Cry j1-specific T-cell lines (TCLs) used were generated using a procedure described previously.¹⁰ In flat-bottomed 96-well microtiter plates (Corning Inc.), 2×10^4 TCL were mixed with 1×10^5 irradiated autologous PBMCs (PBMCx) as antigen-presenting cells (APCs). Following this, the cells were cultured in the presence or absence of antigen (Ag), in 0.2 ml of culture medium, together with HR-selective agonists, for 65 hr.

To determine adenylate cyclase activity, TCLs and/or APCs were incubated with SQ22536 at 37° in 24-well plates for 1 hr. Following this, the cells were washed with culture medium three times, after which they were mixed and cultured in the same manner described above.

Measurement of cytokine production

The levels of interferon- γ (IFN- γ), IL-5 and IL-10 in culture supernatants were measured using Opt EIATM sets (BD Biosciences, San Jose, CA), according to the manufacturer's instructions. The detection limits for IFN- γ , IL-5 and IL-10 in these assays were 20, 20 and 1.9 pg/ml, respectively.

Analysis of apoptosis by annexin V staining

PBMCs (1×10^6 /ml) were incubated with 100 μ M histamine or HR-selective agonists for 24 or 72 hr. The cells were then harvested, and apoptotic cells were detected

using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit1 (BD Biosciences), according to the manufacturer's protocol. Stained cells were analysed using a fluorescence-activated cell sorter (FACScan) with CELLQUEST software (BD Biosciences).

cDNA microarray analysis

cDNA microarray analysis was performed using IntelliGene HS Human expression chips, containing about 16 600 probe sets (Takara, Tokyo, Japan). PBMC (1×10^6 /ml) were incubated with 2 μ g/ml of PPD, in the presence or absence of 100 μ M clozapine, for 12 hr. Total cellular RNA was extracted by the RNeasyTM mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan), according to the manufacturer's instructions. Four micrograms of total RNA from PBMCs treated with and without clozapine were labeled using the RNA Transcript SureLABEL Core Kit (Takara) with Cy-5 UTP and Cy-3 UTP (Amersham Bioscience Corp., Piscataway, NJ), respectively, in each paired case. Labeled samples were hybridized to IntelliGene HS Human expression chips, according to the manufacturer's instructions. After hybridization for 16 hr at 65°, the slides were washed and then scanned for Cy-5 and Cy-3 fluorescence using the Affymetrix 428 scanner (Affymetrix Japan, Tokyo, Japan). The signal intensity of hybridization was evaluated photometrically by the IMAGE software program (BioDiscovery K. K., Tokyo, Japan). A gene expression ratio (Cy-5/Cy-3) of > 2.0 and < 0.5 was considered significant.

Real-time quantitative polymerase chain reaction

PPD- and Cry j1-specific TCLs were immediately soaked in RNAlaterTM RNA stabilization reagent (Qiagen) and stored at -30° until use. Total cellular RNA extraction, reverse transcription to generate cDNA, and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) assays were performed as described previously.¹⁰ In brief, the assays were performed using a GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) with QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen). The PCR primer sequences and product sizes were as follows: H1R, forward 5'-AAGT CACCATCCCAAACCCCAAG-3' and reverse 5'-TCAGG CCCTGCTCATCTGTCTTGA-3' (195 bp); H2R, forward 5'-AGGAACGAGACCAGCAAGGGCAAT-3' and reverse 5'-GGTGGCTGCCITCCAGGAGCTAAT-3' (197 bp); H3R, forward 5'-TGCAAGCTGTGGCTGGTAGTGGAC-3' and reverse 5'-AGCTCAGGATGGCTGGTCCGTACA-3' (202 bp); H4R, forward 5'-CCGTTTGGGTGCTGGCCTTCTTAG-3' and reverse 5'-GATCACGCTTCCACAGGCTCCAAT-3' (204 bp); and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and reverse 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3' (452 bp).⁹ The expression level of H1R, H2R, H3R and H4R was estimated by dividing each signal into the signal for

GAPDH. As a positive control for H3R, the testicular cell line, NEC14, was used.¹³

Statistical analysis

Statistical comparisons were performed by the non-parametric Mann-Whitney *U*-test and Wilcoxon's signed-rank test. Differences were considered significantly different at a *P*-value of < 0.05 . Values are given as means \pm standard deviation (SD).

Results

Effect of histamine on PPD-induced IFN- γ production

PBMCs from subjects with positive tuberculin skin tests produced IFN- γ in response to PPD, whereas there was negligible IFN- γ production by PBMCs in the absence of PPD. Histamine inhibited the PPD-induced production of IFN- γ in a dose-dependent manner. Typical results are shown in Fig. 1(a). Using 12 subjects, the mean concentration of IFN- γ induced by PPD was $10\,479 \pm 10\,783$ pg/ml. IFN- γ production was significantly inhibited to a mean of 4697 ± 4657 pg/ml ($54.3 \pm 35.8\%$ inhibition; $P = 0.010$ by Wilcoxon's signed-rank test) upon exposure of the cells to 100 μ M histamine (Fig. 1b). PBMCs did not produce IL-10 in response to PPD, and the addition of histamine did not alter IL-10 production (data not shown).

Effect of HR-selective agonists on PPD-induced IFN- γ production

Next, we examined the effect of HR-selective agonists on PPD-induced IFN- γ production. H4R agonists, including

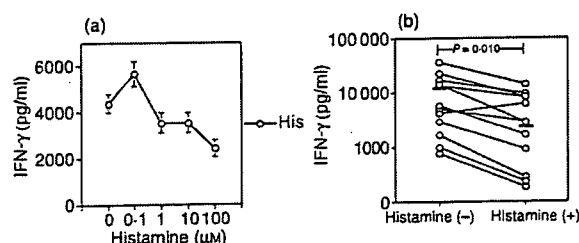


Figure 1. Inhibition of purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* (PPD)-induced interferon- γ (IFN- γ) production by histamine. (a) Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured with 2 μ g/ml of PPD in the presence or absence of serial dilutions of histamine. Results are expressed as the mean concentrations \pm standard deviation (SD) from triplicate cultures. Data are representative of four separate experiments. (b) PBMCs from 12 subjects with positive tuberculin skin tests were stimulated with 2 μ g/ml of PPD in the presence or absence of 100 μ M histamine. The *P*-value was obtained using Wilcoxon's signed-rank test. Vertical bars represent the mean concentrations for each group.

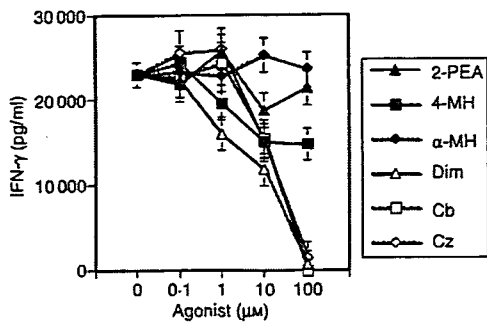


Figure 2. Inhibition of purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* (PPD)-induced interferon- γ (IFN- γ) production from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by histamine receptor (HR)-selective agonists. PBMCs were cultured with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PPD in the presence or absence of serial dilutions of HR-selective agonists. Cb, clobenpropit; Cz, clozapine; Dim, dimaprit; 4-MH, 4-methylhistamine; α -MH, alpha-methylhistamine; 2-PEA, 2-pyridylethylamine. Results are expressed as the mean concentrations \pm standard deviation (SD) from triplicate cultures. Data are representative of four separate experiments.

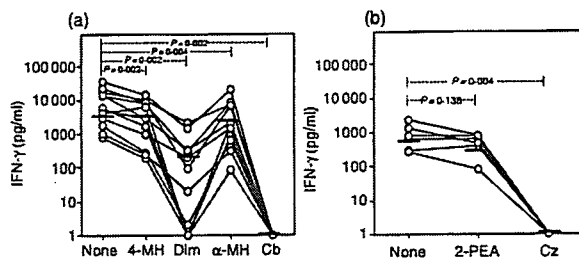


Figure 3. Inhibition of purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* (PPD)-induced interferon- γ (IFN- γ) production by histamine receptor (HR)-selective agonists. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated with PPD in the presence or absence of 100 μM HR-selective agonists. (a) Effect of 4-methylhistamine (4-MH), alpha-methylhistamine (α -MH), dimaprit (Dim) and clobenpropit (Cb) on PPD-induced IFN- γ production ($n = 12$). (b) Effect of 2-pyridylethylamine (2-PEA) and clozapine (Cz) on PPD-induced IFN- γ production ($n = 6$). The P -values were obtained using Wilcoxon's signed-rank test. Vertical bars represent the mean concentrations for each group.

dimaprit, clobenpropit and clozapine, inhibited PPD-induced IFN- γ production in a dose-dependent manner (Fig. 2). Complete inhibition of PPD-induced IFN- γ production was observed in the presence of 100 μM dimaprit ($97.4 \pm 3.8\%$ inhibition; $P = 0.002$), clobenpropit (100% inhibition; $P = 0.002$), or clozapine (100% inhibition; $P = 0.004$). In contrast, 100 μM 2-PEA did not cause significant inhibition ($33.4 \pm 47.2\%$ inhibition; $P = 0.138$) of PPD-induced IFN- γ production, and partial inhibition was observed using 100 μM 4-MH ($63.6 \pm 16.5\%$ inhibition; $P = 0.002$) and α -MH ($50.3 \pm 35.0\%$ inhibition; $P = 0.004$) (Fig. 3). None of the HR-related agonists

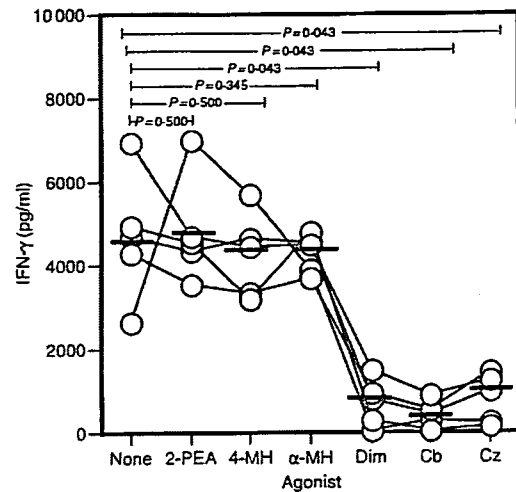


Figure 4. Histamine receptor (HR)-selective agonists-mediated inhibition of purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* (PPD)-induced interferon- γ (IFN- γ) production by T-cell lines (TCLs). Five PPD-specific TCLs were mixed with antigen-presenting cells (APCs) and cultured with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PPD for 65 hr in the presence of 100 μM 2-pyridylethylamine (2-PEA), 4-methylhistamine (4-MH), alpha-methylhistamine (α -MH), dimaprit (Dim), clobenpropit (Cb) and clozapine (Cz). Following incubation, supernatant was collected and the IFN- γ concentration of each sample was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). P -values were determined using Wilcoxon's signed-rank test. Data on each TCL are representative of two separate experiments.

induced IL-10 production in PPD-stimulated PBMCs (data not shown).

Similar results were seen when we used PPD-specific TCLs, the more purified cell populations. We generated five PPD-specific TCLs from five donors. Treatment with 2-PEA, 4-MH and α -MH did not affect the PPD-specific IFN- γ production. However, treatment with dimaprit, clozapine and clobenpropit strongly and dose-dependently inhibited these responses (Fig. 4).

Effect of HR-selective antagonists on the inhibition of IFN- γ production by H4R-selective agonists

To verify that the H4R-selective agonists inhibit PPD-specific IFN- γ production via H4R, we examined the influence of a panel of HR-specific antagonists. Addition of thioperamide, an antagonist of both H4R and H3R, did not reverse the inhibition of PPD-induced IFN- γ production by either histamine or H4R agonists (Fig. 5a). Furthermore, a mixture of *d*-chlorpheniramine, famotidine and thioperamide did not reverse the inhibition (Fig. 5b). These results were seen in both high responders (IFN- γ production $> 10\,000$ pg/ml) and low responders (IFN- γ production $< 10\,000$ pg/ml) for PPD-induced IFN- γ production (data not shown).