

## 関節リウマチおよび慢性蕁麻疹におけるマスト細胞を 標的とした新規治療法の確立

岡山吉道<sup>1)</sup>, 藤澤大輔<sup>1)</sup>, 山田賢鎬<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>, 橋本 修<sup>1)</sup>,  
浅野正岳<sup>2)</sup>, 斎藤 修<sup>1)</sup>, 徳橋泰明<sup>1)</sup>, 照井 正<sup>1)</sup>

### Establishment of new therapy which targets mast cells in rheumatoid arthritis and chronic urticaria

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Daisuke FUJISAWA<sup>1)</sup>, Kenko YAMADA<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>,  
Shu HASHIMOTO<sup>1)</sup>, Masatake ASANO<sup>2)</sup>, Shu SAITO<sup>2)</sup>, Yasuaki TOKUHASHI<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

#### 要旨

関節リウマチ (RA) と慢性蕁麻疹 (CU) の二疾患においてマスト細胞が重要な役割を果たしていることは示されているが、マスト細胞の活性化を惹起する機序および疾患の病態におけるマスト細胞の役割に関しては十分に解明されていない。我々はRAおよび変形性関節症 (OA) 病変滑膜組織よりマスト細胞を分離し、培養することに成功したので、RAとOAの病変部位のマスト細胞の活性化機序および疾患の病態におけるマスト細胞の役割を検討したところ、RAとOAの滑膜マスト細胞は、IgG受容体である、FcγRIとFcγRIIを恒常的に発現しており、RAでは免疫複合体の刺激により、多量のTNF-γを産生することが分かった。CU患者の膨疹病変部を生検し、健常人の皮膚のマスト細胞との比較を行ったところ、Gタンパク質共役型受容体の一つであるMas-related gene X2がCU患者の病変部マスト細胞において高く発現していた。この受容体を介して皮膚マスト細胞は神経ペプチドサブスタンスPによって活性化されるのみならず好酸球顆粒タンパクによっても活性化されることが分かった。以上より、マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在することが示唆された。

#### 1. はじめに

マスト細胞は即時型のアレルギー反応を惹起するのみならず、マスト細胞の産生、放出するケモカインやサイトカイン、ロイコトリエンなどのメディエーターにより、遅発型のアレルギー反応および慢性炎症を惹起する<sup>1)</sup>。また、マスト細胞の関節リウマチ (RA) における役割については近年注目されている。RAにおけるマスト細胞の関与に関しては、マウス関節炎モデルの実験に供するマスト細胞欠損マウスの種類によって結果が異なり未だ議論が多い<sup>2)-7)</sup>。しかしながら、ヒトのRA患者の滑膜組織病変部にはマスト細胞数が増加し、活動性と相関している<sup>8)-10)</sup>。また、トリプターゼやヒスタミンといったマスト細胞から遊離されるメディエーターの関節液中の濃度の増加が報告されている<sup>9)-12)</sup>。関節液中のサブスタンスP<sup>13)</sup>やinterleukin (IL) -33濃度の増

加<sup>14)</sup>も報告されており、これらは直接マスト細胞を活性化する。またマスト細胞はtumor necrosis factor (TNF)-αやIL-6の主要な産生細胞であり、RAの病態へのマスト細胞の関与が示唆されている。ヒトのマスト細胞には多様性があるが、単離した滑膜組織マスト細胞での研究は、未だなく、滑膜組織マスト細胞に発現している受容体の詳細は不明である。我々は、約2%のヒト末梢血由来培養マスト細胞が高親和性IgG受容体 (FcγRI) を発現しているが、ヒト末梢血由来培養マスト細胞および肺マスト細胞をIFN-γにて、24時間培養するとFcγRI mRNAと細胞表面の受容体の発現は有意に増強することを報告した<sup>15)-17)</sup>。FcγRIの架橋によって、FcεRIの架橋と比較して同程度の脱顆粒、PGD2、LTC4の産生を認め、TNF-α、IL-1β、IL-6といったproinflammatory cytokineが産生された<sup>15)-17)</sup>。そこで滑膜組織マスト細胞

1) 日本大学医学部

2) 日本大学歯学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

胞がIgG受容体を発現しており、免疫複合体で活性化され多量のTNF- $\alpha$ を産生するという仮説を立てて研究を行った。

慢性蕁麻疹 (CU) は、蕁麻疹が1ヶ月以上に亘り出現する疾患で原因が不明である<sup>18)</sup>。橋本病などの自己免疫疾患がと高頻度に合併すること、自己反応性IgGが検出されることから自己免疫疾患である可能性も示唆されている<sup>18), 19)</sup>。マスト細胞の活性化がその原因であるが、マスト細胞の活性化機構は不明のままである。皮膚マスト細胞はサブスタンスPやコンパウンド48/80に反応し脱顆粒が惹起されるが肺マスト細胞はこれらに反応しない<sup>20), 21)</sup>。最近、サブスタンスPやコンパウンド48/80の新規受容体としてMas-related gene X2 (MrgX2) が同定された<sup>22)</sup>。MrgX2は神経節後根<sup>22)</sup> およびヒト臍帯血由来培養マスト細胞<sup>23)</sup> に発現している。我々はヒト皮膚マスト細胞にMrgX2が発現していることを報告している<sup>24)</sup>。MrgX2のリガンドとしてはサブスタンスPやコンパウンド48/80のみならず、コルチスタチン、ソマトスタチン、オキシトシン、バソプレッシン、オピオイドペプチドのダイノルフェン、バソアクティブインテスチナルペプチド、抗菌ペプチドLL-37などの報告がある<sup>22), 23), 25), 26)</sup>。CU患者にサブスタンスPやバソアクティブインテスチナルペプチドを皮内注射すると健康人よりも有意に大きい膨疹が惹起され長く持続するという<sup>27), 28)</sup>。そこでCU患者の皮膚マスト細胞がMrgX2を健康人よりも高く発現しているという仮説を立てて検討した。

## 2. 対象及び方法

**倫理的考慮：**生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施した。

**細胞：**ヒト末梢血および臍帯血培養マスト細胞はすでに報告した方法を用いて樹立した<sup>29)</sup>。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞 (CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>, および CD19<sup>-</sup> 細胞) を分離したのち、臍帯血では CD34<sup>+</sup> 細胞を分離したのち、stem cell factor (SCF; 200 ng/

ml, PeproTech EC Ltd, London, UK) と IL-6 (50 ng/ml, PeproTech EC Ltd) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada と Iscove's modified Dulbecco's medium [IMDM]) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。ヒト滑膜マスト細胞<sup>30)</sup>、肺マスト細胞と皮膚マスト細胞は、それぞれ滑膜組織、肺組織と皮膚組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織、肺組織と皮膚組織は採取後ただちに2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1 % fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 SCF (200 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。

**RT-PCR：**マスト細胞の総RNAはRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し、精製した。500  $\mu$ g/mL oligo (dT<sub>12-18</sub>) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写を行った。MrgX2 および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, 東京) のものを使用した。

**遺伝子発現抑制：**レンチウイルスベクターを用いた shRNA 技術<sup>24)</sup> にてヒト皮膚組織由来培養マスト細胞の MrgX2 の発現抑制をおこなった。MrgX2 のコンストラクションに対する sense と antisense オリゴヌクレオタイド配列のレンチウイルス発現プラスミドは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。

**フローサイトメトリー：**マスト細胞のフローサイトメーターによる解析はすでに報告した方法を用いて行った<sup>31)</sup>。以下の抗体を用いて細胞を染色した。

PEあるいはビオチン標識抗FcεRIαモノクローナル抗体(クローンCRA1, eBioscience, San Diego, CA), PE標識抗CD64(クローン10.1)と抗CD32(clone KB61, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), ビオチン標識抗chymaseモノクローナル抗体(クローンB7), 抗tryptaseモノクローナル抗体(クローンG3, Chemicon International, CA), 抗CD16(クローンDJ130c, DakoCytomation, Carpinteria, CA), PE標識抗CD117(クローンYB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA), 抗MrgX2モノクローナル抗体(クローン477533, R&D Systems, Minneapolis, MI)。PE/Cy5-streptavidinはBiolegend(San Diego, CA)から購入した。

**免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析:** 共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った<sup>31)</sup>。滑膜組織, 皮膚組織あるいは, 細胞を固定して, 膜の穴あけをした後, Alexa Flour 488標識抗tryptase抗体, ビオチン標識抗CD64(クローン10.1), Alexa Flour 555標識抗MrgX2抗体(Abca, Cambridge, UK), アイソタイプコントロールマウスIgG1およびウサギIgGとインキュベートした。ビオチン標識抗CD64陽性細胞は, streptavidin-Cy3(Biolegend)を用いて可視化した。FV1000型共焦点レーザー顕微鏡(Olympus, 東京)を用いた。

**マスト細胞の活性化:** IgE感作したマスト細胞を0.1, 1.0, 10μg/mlの抗FcεRIαモノクローナル抗体(クローンCRA1), サブスタンスP, major basic protein(MBP), eosinophil peroxidase(EPO), eosinophil derived neurotoxin(EDN)あるいはカルシウムイオノフォアA23187(10<sup>-6</sup>M)で30分間刺激した。FcγRIとFcγRIIの架橋は, マスト細胞を1, 10μg/mlの抗ヒトFcγRI抗体のF(ab')<sub>2</sub> fragments(F(ab')<sub>2</sub>αFcγRI, clone 10.1)と抗ヒトFcγRII(F(ab')<sub>2</sub>αFcγRII, clone 7.3)で30分間刺激した。コントロールとしてマウスIgG1のF(ab')<sub>2</sub> fragments(F(ab')<sub>2</sub>mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA)で30分間刺激した。細胞を1度洗浄後FcγRIとFcγRIIを架橋させるため抗マウスIgG F(ab')<sub>2</sub> fragmentsのヤギF(ab')<sub>2</sub> fragments(gF(ab')<sub>2</sub>αmF(ab')<sub>2</sub>, Jackson Immune Laboratory)を添加しさらに30分間刺激した。ヒスタミン遊離とPGD<sub>2</sub>産生を測定するためそ

の細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。サイトカイン測定では6時間刺激後, 細胞上清を回収した。

**脱顆粒, PGD<sub>2</sub>産生, サイトカイン産生測定:** ヒスタミン遊離とPGD<sub>2</sub>産生は酵素免疫法, サイトカイン産生はELISA法を用いた。

**統計解析:** 臨床データの2群間の統計学的解析および*in vitro*の実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いてP<0.05を有意とした。*in vitro*の実験の2群間の統計学的解析はunpaired Student t-testを用いてP<0.05を有意とした。

### 3. 結果

**初代滑膜マスト細胞(関節滑膜から分離直後のマスト細胞)におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKit発現とFcεRIおよびFcγRI架橋刺激による初代滑膜マスト細胞の脱顆粒反応**

滑膜組織から酵素で分散した滑膜細胞中のマスト細胞の純度は43±4%(n=9ドナー)であった。この細胞分画中のマスト細胞は, 構成的にFcγRIを発現しており, FcεRI, FcγRI, FcγRIIおよびKitの発現レベルはOAとRAで有意な差はなかった(図1A, B)。FcγRIIIはOAとRAのマスト細胞で発現していなかった。FcεRI, FcγRI架橋刺激による初代滑膜マスト細胞の脱顆粒反応に関してヒスタミン遊離率を指標に比較したがその遊離率に有意差はなかった(図1C, D)<sup>30)</sup>。

**培養滑膜マスト細胞におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKitの発現とフェノタイプ**

分離した滑膜マスト細胞の培養に成功した。培養期間に応じて, マスト細胞の純度および細胞数の上昇を認めた。培養10週後にはマスト細胞の純度は98%に達し, 培養10週後の培養マスト細胞においてもKit, FcεRI, FcγRIおよびFcγRIIの発現を認めた(図2A)<sup>30)</sup>。培養滑膜マスト細胞では, MC<sub>TC</sub>(トリプターゼ, キマーゼの両方を発現しているマスト細胞)が85%, MC<sub>T</sub>(トリプターゼのみを発現しているマスト細胞)が15%であった(図2B)<sup>30)</sup>。

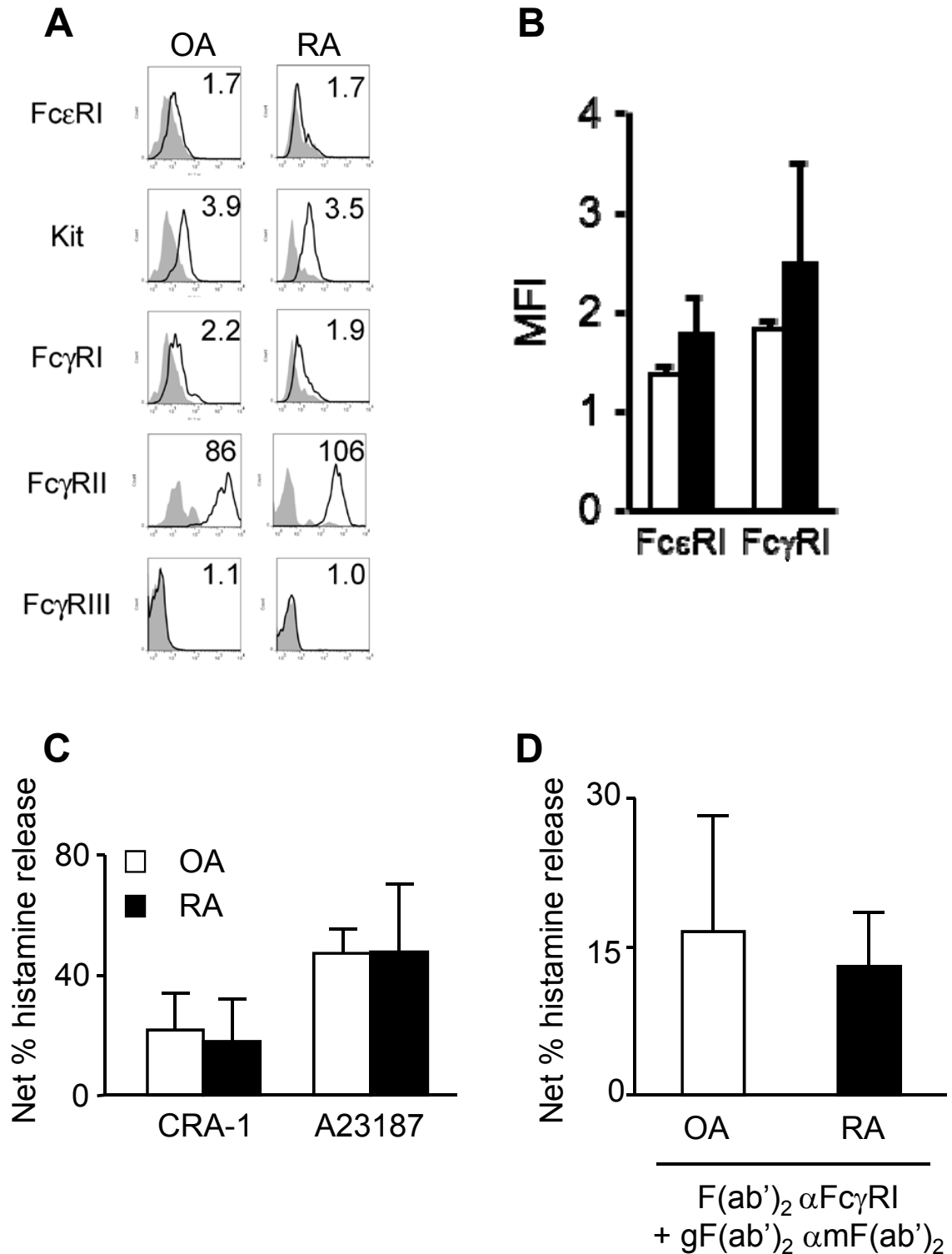


図1 初代滑膜マスト細胞におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKit発現とFcεRIおよびFcγRI架橋刺激による初代滑膜マスト細胞の脱顆粒反応

A) OAとRA患者の関節滑膜から分離直後のマスト細胞表面のFc受容体とKitの発現（フローサイトメトリー）。数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比（MFI）である。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール，黒線がFc受容体とKitの発現。B) AのFcεRIとFcγRIの発現の統計学的解析（n = 3ドナー）。MFIで表示した。B～D) 白バーがOAマスト細胞，黒バーがRAマスト細胞。C) FcεRIおよびD) FcγRI架橋刺激によるOAとRA患者の関節滑膜から分離直後のマスト細胞からのヒスタミン遊離率（文献30より改変引用）。

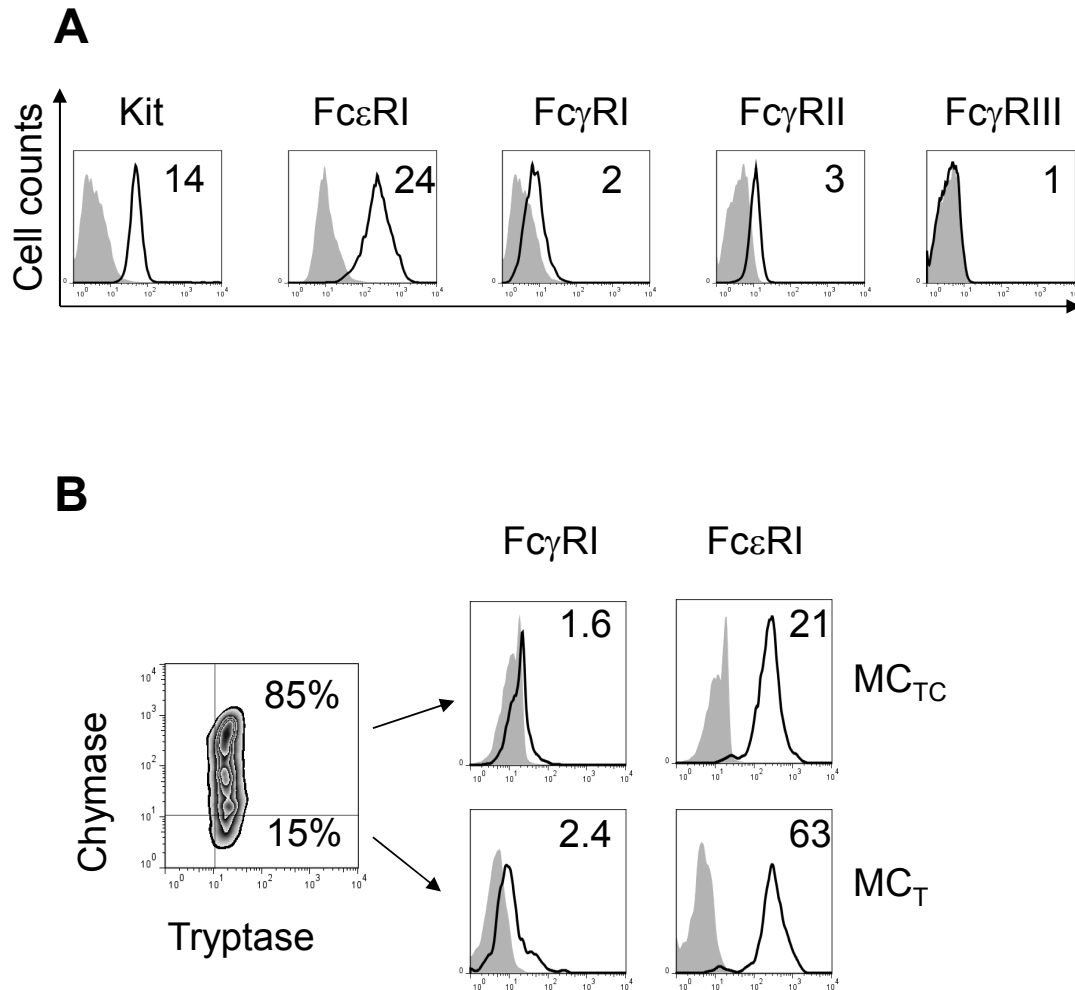


図2 培養滑膜マスト細胞におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKitの発現とフェノタイプ  
 A) 培養滑膜マスト細胞表面のFc受容体とKitの発現(フローサイトメトリー)。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール, 黒線がFc受容体とKitの発現。数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比である。B) MC<sub>T</sub>とMC<sub>Tc</sub>の2つのサブタイプの解析のため, 抗tryptase抗体と抗chymase抗体で染色し, フローサイトメーターによる解析を行った。MC<sub>T</sub>とMC<sub>Tc</sub>におけるFcεRIとFcγRIの発現レベル解析。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール, 黒線がFc受容体の発現。ヒストグラムの数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比である(文献30より改変引用)。

FcεRIおよびFcγRIの架橋刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応, PGD<sub>2</sub>, IL-8およびTNF-α産生  
 培養滑膜マスト細胞において, FcεRI(図3)およびFcγRIの架橋刺激(図4)により脱顆粒反応, PGD<sub>2</sub>, IL-8およびTNF-α産生を認めた<sup>30)</sup>。

**凝集IgG刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応およびTNF-α産生**

凝集IgGの刺激によって培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応およびTNF-α産生を認めた(図5A, 5B)。一方, 単量体IgGは培養滑膜マスト細胞を活性化しなかった。抗FcγRI中和抗体および抗FcγRII

中和抗体を添加すると凝集IgGの刺激によるヒスタミンの遊離が有意に抑制された(図5C)<sup>30)</sup>。

**皮膚マスト細胞のMrgX2の発現**

皮膚マスト細胞表面のMrgX2の発現をフローサイトメーターにて解析した。ヒト臍帯血由来培養マスト細胞, LAD2細胞および皮膚マスト細胞表面にはMrgX2が発現していたが, 肺マスト細胞には発現していなかった(図6A)<sup>32)</sup>。次に健常人の皮膚マスト細胞にMrgX2が発現しているかどうかを皮膚生検組織の免疫組織化学染色によって検討したところ, 皮膚マスト細胞はMrgX2を発現していた(デー

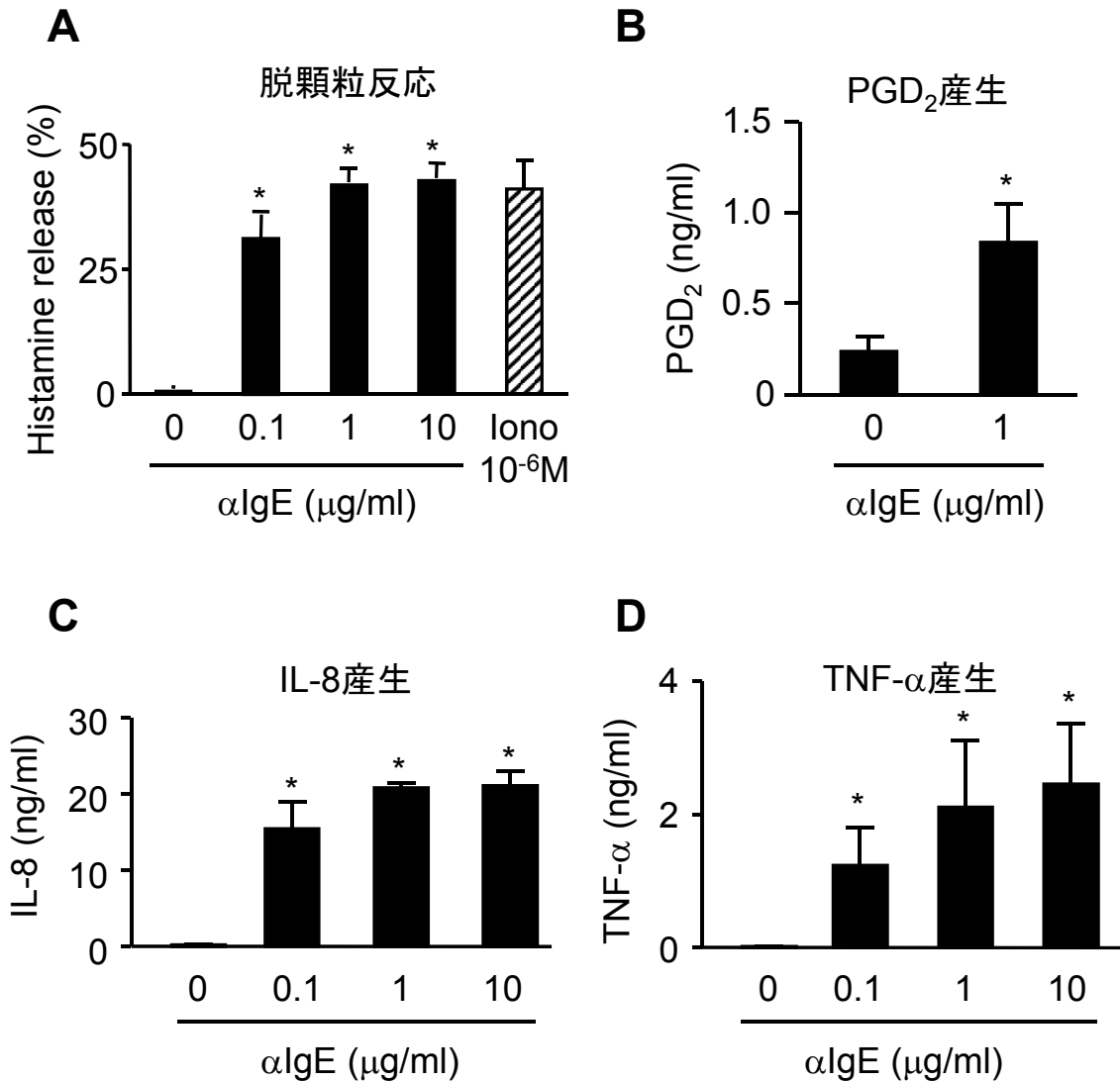


図3 FcεRIの架橋刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応, PGD<sub>2</sub>, IL-8およびTNF-α産生  
IgE感作したマスト細胞を抗FcεRI αモノクローナル抗体あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (Iono, 10<sup>-6</sup>M)で刺激後のA) ヒスタミン遊離率 (n=3ドナー), B) PGD<sub>2</sub>産生量 (1 x 10<sup>3</sup>個マスト細胞/100 μl, n=6ドナー), C) IL-8およびD) TNF-α産生量 (1 x 10<sup>5</sup>個マスト細胞/100 μl, n=4ドナー)を示す。\* P<0.05 (文献30より改変引用)。

タは示さず)。また, CU患者の皮膚マスト細胞にMrgX2が発現していることを確認した(図6B)<sup>32)</sup>。

#### CU患者と健常人 (NC) の皮膚マスト細胞におけるMrgX2発現頻度の比較

10人の健常人と蕁麻疹活動性スコア7 (UAS7) が30以上のCU患者9人の皮膚生検組織を免疫組織化学染色し, マスト細胞数, MrgX2陽性マスト細胞数およびマスト細胞のMrgX2陽性頻度を比較した。マスト細胞数には有意差はなかったが(図7A), MrgX2陽性マスト細胞数(図7B) およびマスト細胞のMrgX2陽性頻度(図7C) はCU患者において健常人と比較して統計学的有意な増加を認めた<sup>32)</sup>。

#### サブスタンスP刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離とPGD<sub>2</sub>産生はMrgX2を介する

MrgX2の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術にてヒト皮膚培養マスト細胞のMrgX2の発現抑制をおこなった。MrgX2の発現が抑制されたマスト細胞ではサブスタンスP刺激による脱顆粒とPGD<sub>2</sub>産生は統計学的有意に抑制された(図8A, B)<sup>32)</sup>。NK1-R拮抗薬CP-96345の添加ではサブスタンスP刺激による脱顆粒は抑制されなかった(データは示さず)。

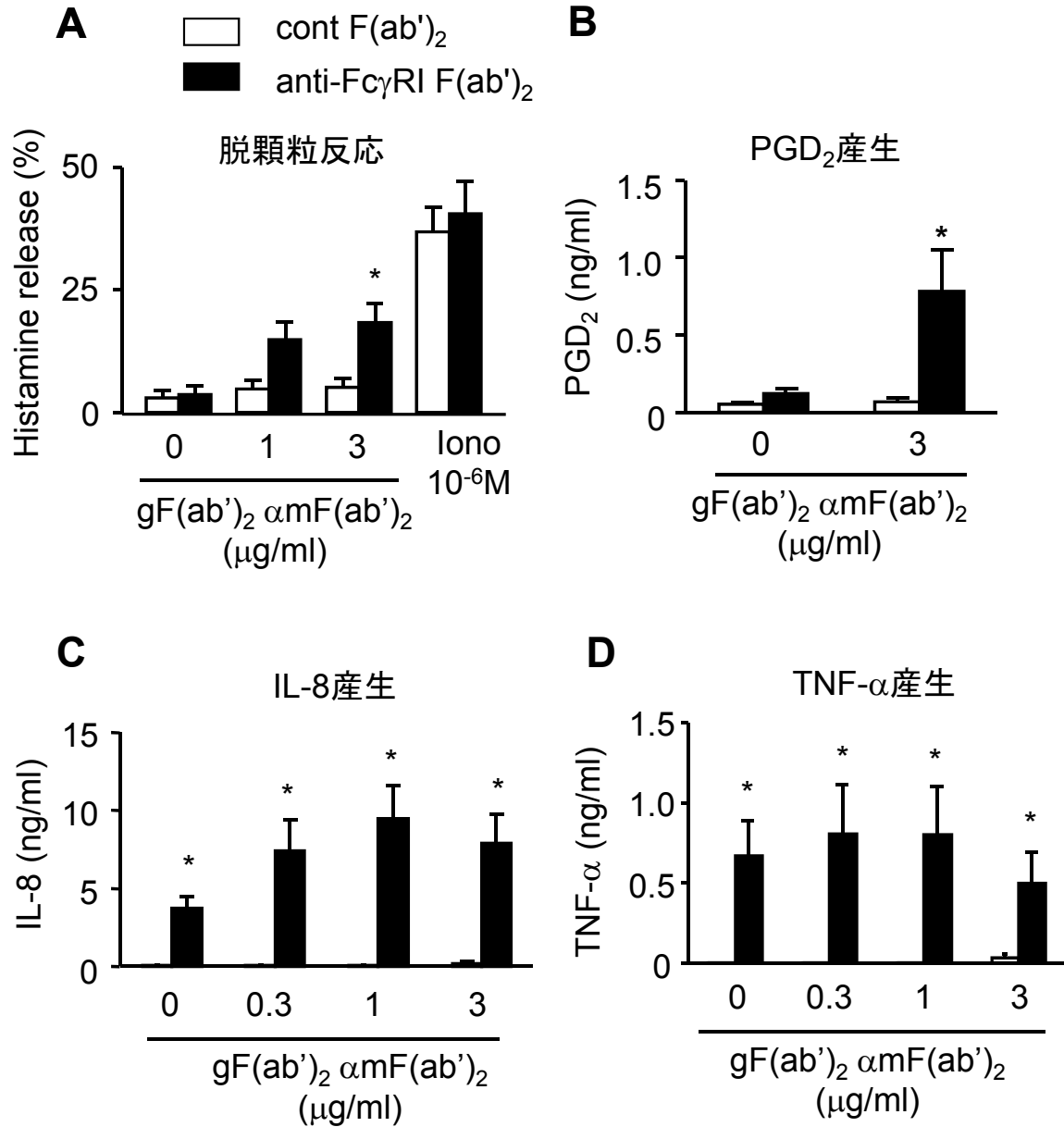


図4 Fc<sub>γ</sub>RIの架橋刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応, PGD<sub>2</sub>, IL-8およびTNF-α産生。マスト細胞を抗Fc<sub>γ</sub>RI αモノクローナル抗体と抗マウスF(ab')<sub>2</sub>IgG抗体(gF(ab')<sub>2</sub> αmF(ab')<sub>2</sub>)あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (Iono, 10<sup>-6</sup>M)で刺激後のA) ヒスタミン遊離率 (n = 4ドナー), B) PGD<sub>2</sub>産生量 (1 × 10<sup>5</sup>個マスト細胞/100 μl, n = 4ドナー), C) IL-8およびD) TNF-α産生量 (1 × 10<sup>5</sup>個マスト細胞/100 μl, n = 4ドナー)を示す。\* P < 0.05 (文献30より改変引用)。

#### MBPとEPO刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離はMrgX2を介する

我々の検討ではUAS7が30以上のCU患者9人のうち7人の膨疹部位には好酸球の浸潤があった。好酸球顆粒タンパクがCUの膨疹部位に存在することから好酸球の関与が示唆されていた<sup>33)-35)</sup>。MrgX2のリガンドは強塩基性のペプチドであることから、我々はMBPとEPOがMrgX2のリガンドであるという仮説を立てた。CHO細胞にMrgX2全長を遺伝

子導入するとサブスタンスP刺激によって細胞内カルシウム濃度が増加した(図9A)<sup>32)</sup>。この所見はMBPとEPOによっても観察されたがEDNでは見られなかった(図9B)。MrgX2の発現が抑制されたマスト細胞ではMBPとEPO刺激による脱顆粒は統計学的有意に抑制された(図9C)<sup>32)</sup>。

#### 4. 考察

RA患者およびOA患者の分離直後のマスト細胞

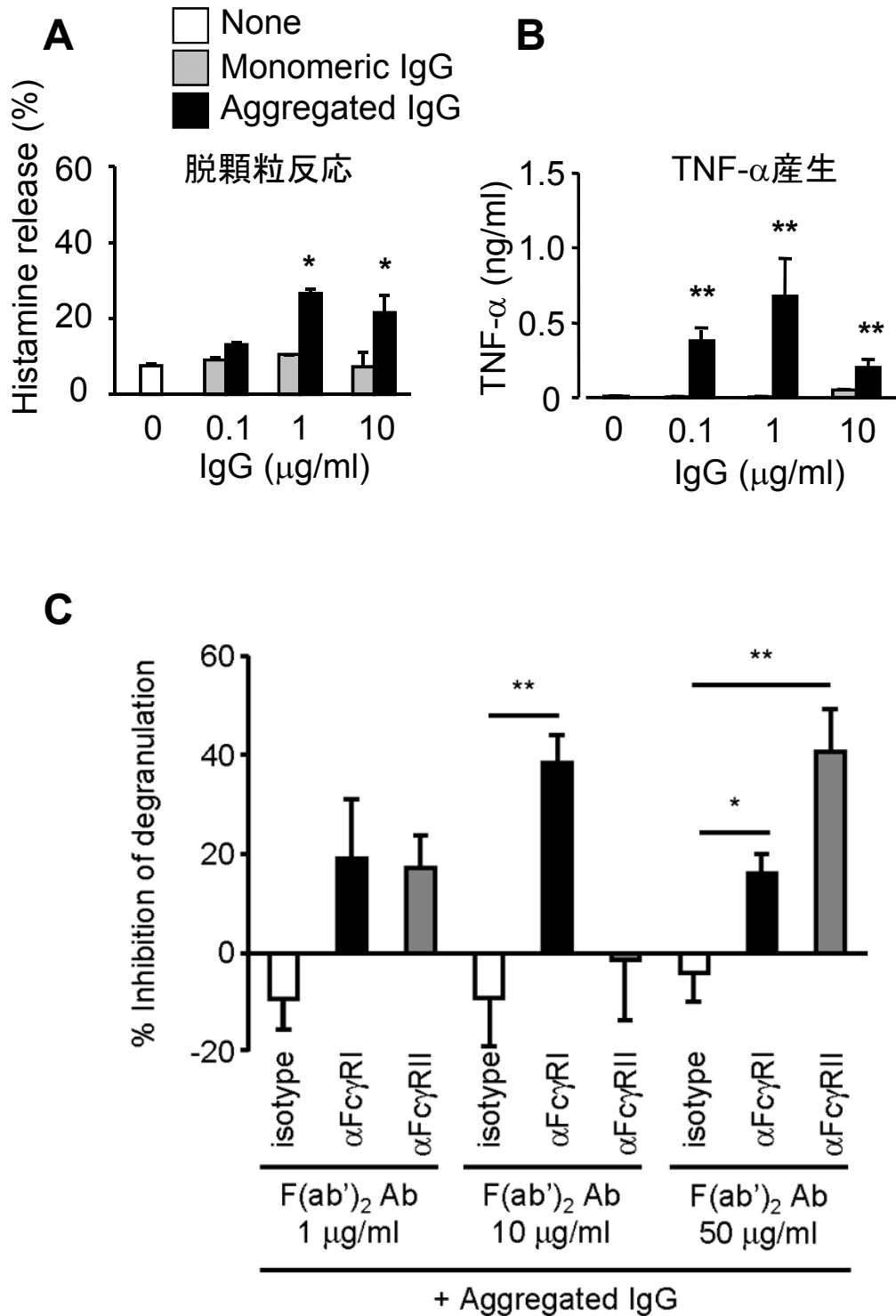


図5 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応および TNF- $\alpha$  産生

A) B) 凝集 IgG の刺激による培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応および TNF- $\alpha$  産生。n = 4 ドナー, 単量体 IgG 刺激に対し \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , データは mean  $\pm$  SEM で示した。C) 凝集 IgG の刺激によるヒスタミン遊離に対する抗 Fc $\gamma$ RI 中和抗体および抗 Fc $\gamma$ RII 中和抗体による抑制率 (%)。凝集 IgG の刺激によるヒスタミン遊離は  $35 \pm 6\%$ 。n = 3-11 ドナー, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , データは mean  $\pm$  SEM で示した (文献 30 より改変引用)。



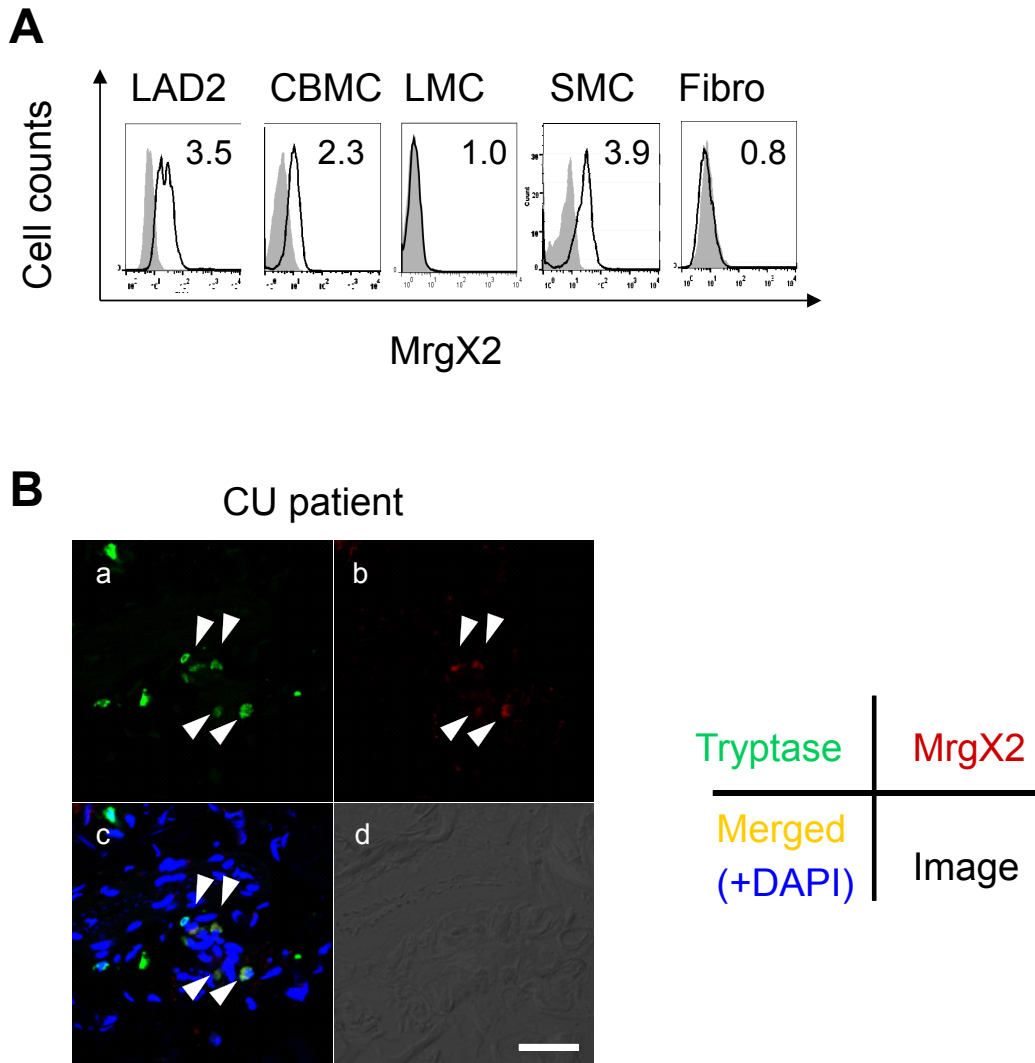


図6 皮膚マスト細胞のMrgX2の発現

A) 皮膚マスト細胞表面のMrgX2の発現。LAD2細胞，ヒト臍帯血由来培養マスト細胞（CBMC），肺マスト細胞（LMC），皮膚マスト細胞（SMC）および線維芽細胞（Fibro）表面のMrgX2発現をフローサイトメーターにて解析した。数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比である。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール，黒線のヒストグラムがMrgX2の発現。B) CU患者および健常人より皮膚生検を試行し，その組織の免疫染色を行った。CU患者皮膚組織を抗MrgX2抗体（赤），抗tryptase抗体（緑）および核染色（青）したものであり，矢印はMrgX2陽性マスト細胞を示す。Bar = 50  $\mu$ m（文献32より改変引用）。

表面に発現しているFc $\epsilon$ RI，KitおよびFc $\gamma$ RIには差が認められなかった。Fc $\epsilon$ RIおよびFc $\gamma$ RIの架橋刺激による脱顆粒反応においても差は認められなかった。滑膜組織から培養滑膜マスト細胞の樹立に成功した。培養滑膜マスト細胞は，分離直後の滑膜マスト細胞と同様にFc $\gamma$ RIを恒常的に発現し機能を持っていた。凝集IgGはFc $\gamma$ RIおよびFc $\gamma$ RIIを介してヒト滑膜マスト細胞を活性化させ多量のTNF- $\alpha$ を産生させたことから，免疫複合体はヒト滑膜マスト細胞を活性化させることが示唆された<sup>30)</sup>。

皮膚マスト細胞は機能を持ったMrgX2を細胞表面に発現していた。重症のCU患者の膨疹部位のマスト細胞のMrgX2発現が健常人に比較して統計学的有意に増加していた。また，重症のCU患者の膨疹部位には好酸球が浸潤している症例があった。サブスタンスPのみならずMBPとEPO刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離はMrgX2を介していた。以上より，CU患者では神経ペプチド刺激や好酸球の活性化がマスト細胞を活性化させることが示唆され，MrgX2がCU治療の新規分子標

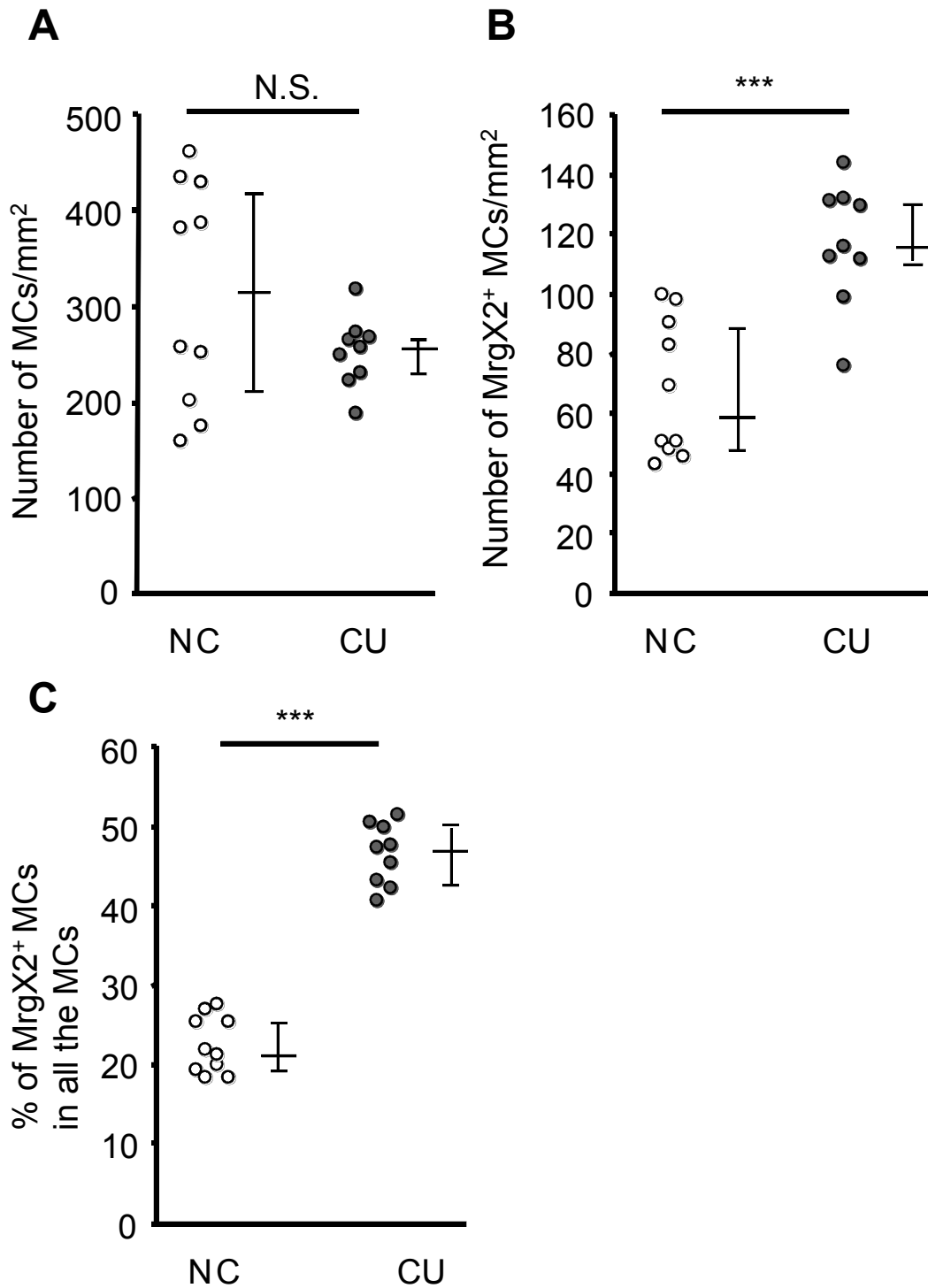


図7 CU患者と健常人 (NC) の皮膚マスト細胞における MrgX2 発現頻度の比較  
 CU患者および健常人より皮膚生検を試行し、その組織の免疫染色を行った。A) マスト細胞数, B) MrgX2 陽性マスト細胞数およびC) マスト細胞の MrgX2 陽性頻度を比較した。N.S. 有意差なし。\*\*\*  $P < 0.001$  データは中央値と四分範囲で示した (文献32より改変引用)。

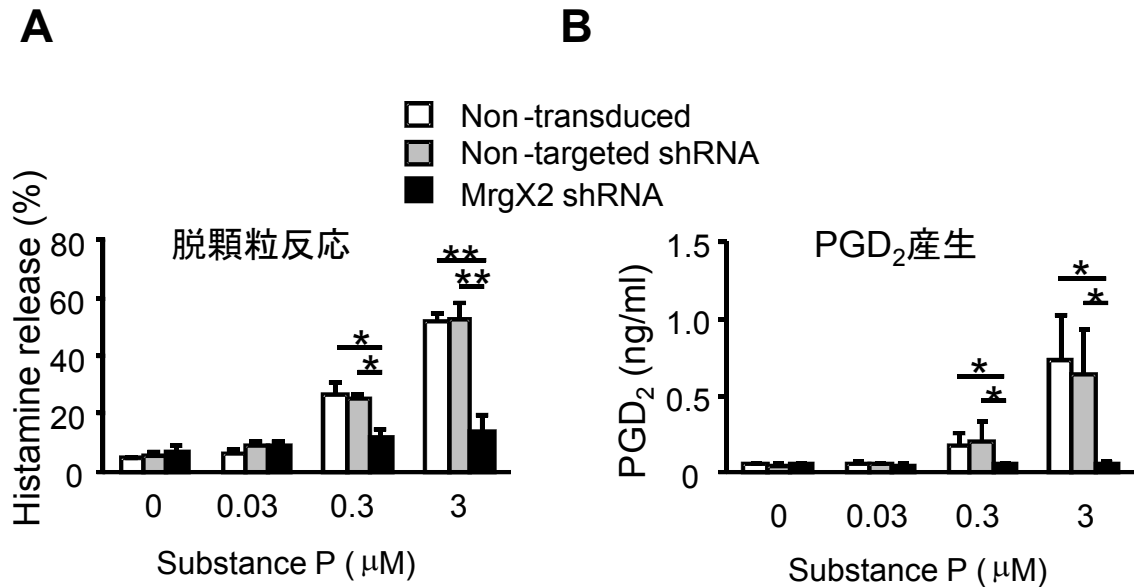


図8 サブスタンスP刺激による皮膚マスト細胞からのA) ヒスタミン遊離とB) PGD<sub>2</sub>産生はMrgX2を介する。白バーが非処理マスト細胞, 灰色のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがMrgX2 shRNAを導入したマスト細胞である。n=3ドナー \*P<0.05, \*\*P<0.01 データはmean ± SEMで示した(文献32より改変引用)。

的となる可能性がある<sup>32)</sup>。

## 5. 結 語

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在することが示唆された。

## 謝辞

ここに記された研究は、平成25年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕による成果の一部であり、ここに深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- Okayama Y, Kawakami T: Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* 2006; **34**: 97-115.
- Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB: Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002; **297**: 1689-1692.
- Corr M, Crain B: The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 2002; **169**: 6604-6609.
- Guma M, Kashiwakura J, Crain B, Kawakami Y, Beutler B, Firestein GS, et al.: JNK1 controls mast cell degranulation and IL-1β production in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 22122-22127.
- Zhou JS, Xing W, Friend DS, Austen KF, Katz HR: Mast cell deficiency in Kit(W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J Exp Med* 2007; **204**: 2797-2802.
- Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, et al.: Cutting Edge: The murine high-affinity IgG receptor FcγR4 is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011; **186**: 1899-1903.
- Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, et al.: Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* 2011; **35**: 832-844.
- Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM: Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984; **27**: 845-851.
- Malone DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE, Metcalfe DD: Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheum* 1986; **29**: 956-963.
- Tetlow LC, Woolley DE: Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis* 1995; **54**: 896-903.
- Eklund KK: Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev* 2007; **217**: 38-52.
- Nigrovic PA, Lee DM: Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007; **217**: 19-37.
- Appelgren A, Appelgren B, Eriksson S, Kopp S, Lundberg T, Nylander M, et al.: Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study. *Scand J Dent Res* 1991; **99**: 519-521.
- Tang S, Huang H, Hu F, Zhou W, Guo J, Jiang H, et al.: Increased IL-33 in synovial fluid and paired serum is associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2013;

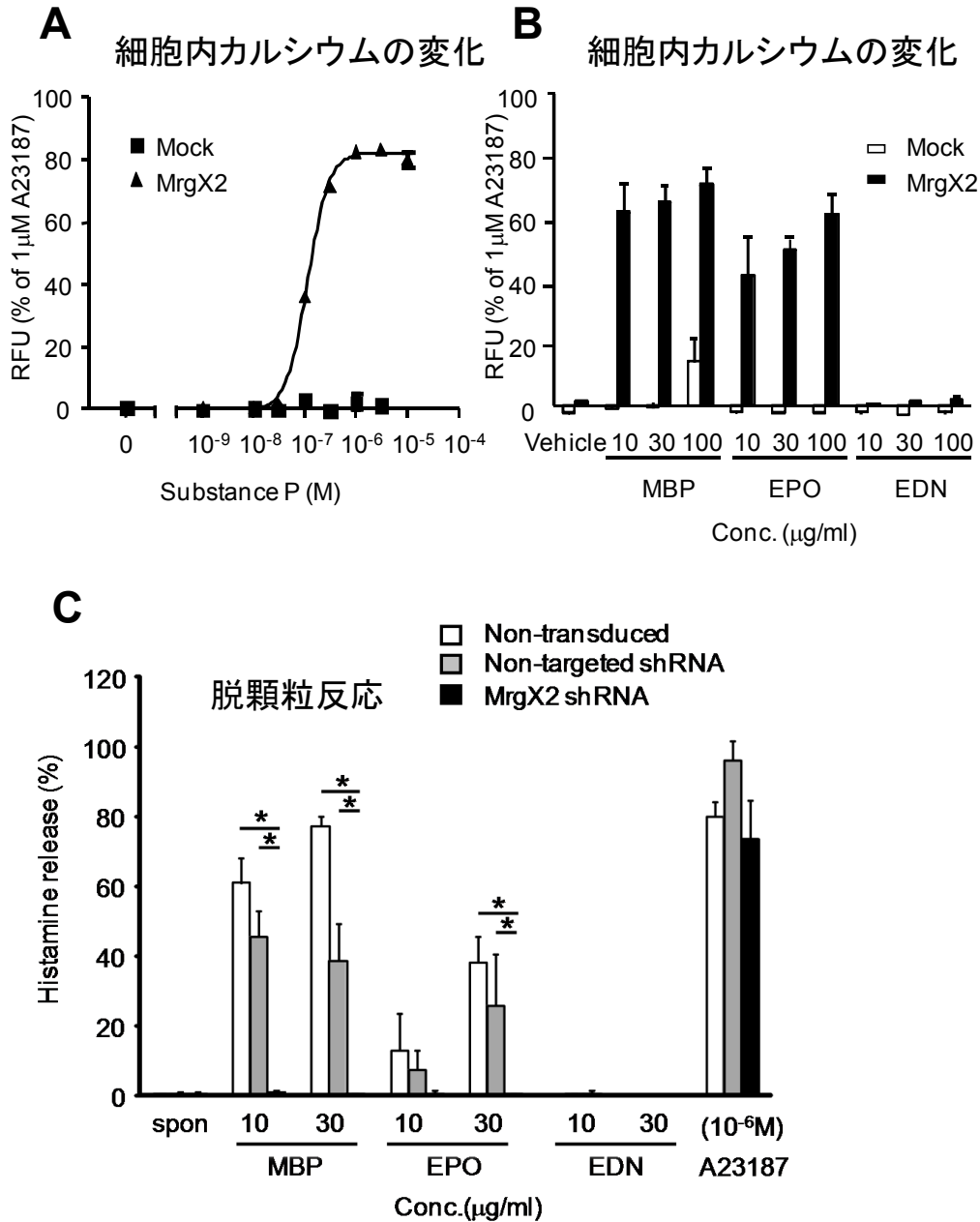


図9 MBPとEPO刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離はMrgX2を介する

A) B) MrgX2全長あるいはベクターのみ (Mock) を遺伝子導入したCHO細胞におけるサブスタンスP, MBP, EPOおよびEDN刺激による細胞内カルシウム濃度の変化。データは1 μM カルシウムイオノフォアA23187で刺激した際の細胞内カルシウム濃度を100とした時の%で示した。C) 白バーが非処理マスト細胞, 灰色のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがMrgX2 shRNAを導入したマスト細胞である。n = 3ドナー \* P < 0.05 データはmean ± SEMで示した (文献32より改変引用)。

2013; 985301.

- 15) Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD: Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol* 2000; **164**: 4332-4339.
- 16) Okayama Y, Hagaman DD, Metcalfe DD: A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol* 2001; **166**: 4705-4712.
- 17) Woolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, Metcalfe DD: IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of Fc gamma RI by IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 3298-3307.
- 18) Kaplan AP, Greaves M: Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**: 777-787.
- 19) Vonakis BM, Saini SS: New concepts in chronic urticaria. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 709-716.

- 20) Lowman MA, Benyon RC, Church MK: Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. *Br J Pharmacol* 1988; **95**: 121-130.
- 21) Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK: Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol* 1988; **81**: 590-597.
- 22) Robas N, Mead E, Fidock M: MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 2003; **278**: 44400-44404.
- 23) Tatemoto K, Nozaki Y, Tsuda R, Konno S, Tomura K, Furuno M, et al.: Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1322-1328.
- 24) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, et al.: Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: 1137-1145.
- 25) Subramanian H, Kashem SW, Collington SJ, Qu H, Lambris JD, Ali H: PMX-53 as a dual CD88 antagonist and an agonist for Mas-related gene 2 (MrgX2) in human mast cells. *Mol Pharmacol* 2011; **79**: 1005-1013.
- 26) Kashem SW, Subramanian H, Collington SJ, Magotti P, Lambris JD, Ali H: G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *Eur J Pharmacol* 2011; **668**: 299-304.
- 27) Borici-Mazi R, Kouridakis S, Kontou-Fili K: Cutaneous responses to substance P and calcitonin gene-related peptide in chronic urticaria: the effect of cetirizine and dimethindene. *Allergy* 1999; **54**: 46-56.
- 28) Smith CH, Atkinson B, Morris RW, Hayes N, Foreman JC, Lee TH: Cutaneous responses to vasoactive intestinal polypeptide in chronic idiopathic urticaria. *Lancet* 1992; **339**: 91-93.
- 29) Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y: Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 2006; **1**: 2178-2183.
- 30) Lee H KJ, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y.: Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fc gamma RI and Fc gamma RII. *Arthritis Rheum* 2013; **65** (1): 109-119.
- 31) Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, et al.: Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and Fc epsilon RI. *Blood* 2003; **102**: 2547-2554.
- 32) Fujisawa D, Kashiwakura JI, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, et al.: Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2014; in press:
- 33) Peters MS, Schroeter AL, Kephart GM, Gleich GJ: Localization of eosinophil granule major basic protein in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 1983; **81**: 39-43.
- 34) Spry CJ, Tai PC, Barkans J: Tissue localization of human eosinophil cationic proteins in allergic diseases. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; **77**: 252-254.
- 35) Juhlin L, Venge P: Eosinophilic cationic protein (ECP) in skin disorders. *Acta Derm Venereol* 1991; **71**: 495-501.