

アレルギー炎症におけるヒスタミン遊離因子の役割

柏倉 淳一

1. はじめに

マスト細胞はアレルギー反応の責任細胞であるIgE受容体(FcεRI)はIgEと結合するα鎖, シグナル調節分子のβ鎖, シグナルを細胞内に伝達するγ鎖から構成されており, マスト細胞上に発現している. FcεRIに抗原特異的IgEが結合し, 多価抗原により受容体が架橋されると, ヒスタミン遊離, ロイコトリエンやプロスタグランジンの産生, サイトカインやケモカインの産生などが誘導される. さらに近年, 単量体IgE抗体単独でマスト細胞が活性化されることが報告されており, IgEを介したさまざまな活性化機構がアレルギー炎症に関与していることが示唆されている.

ヒスタミン遊離因子(histamine-releasing factor: HRF)は特定のIgE(IgE+)が結合した好塩基球を活性化し, ヒスタミン遊離やインターロイキン4/13(IL-4/IL-13)などのサイトカインを産生することから, アレルギー反応に関わる分子として報告されていた. しかし, HRFは細胞外のみならず細胞内機能も併せ持つことや, 細胞外で機能するための受容体が未同定であったことなどの理由からHRFのアレルギー炎症反応における作用機序を細胞および生体レベルで詳細に調べることが困難であったが, 我々はHRFの受容体の同定および機能解析に成功した. 本稿ではHRFの今までの報告と我々の研究結果を紹介し, アレルギー疾患におけるHRFの役割について総説する.

2. マスト細胞活性化反応におけるIgEの機能的多様性と作用機序

マスト細胞はアナフィラキシー反応の責任細胞として知られている. 通常, 抗原特異的IgEがマスト細胞上の

FcεRIに結合し, 多価抗原がFcεRIに結合した抗原特異的IgEを介して受容体を架橋すると, ヒスタミン遊離・プロスタグランジンやロイコトリエンなどの脂質メディエーター産生・サイトカイン/ケモカインの産生などが起こる. しかし, 2002年に二つのグループがそれまでの既成概念を崩す新たな発見を報告した. すなわち, IgE依存性ではあるが抗原を必要としないマスト細胞活性化反応(単量体IgE抗体によるマスト細胞活性化反応)である^{1,2)}. 通常, マスト細胞は増殖因子が欠如するとアポトーシスにより細胞死を起こすが, 二つのグループは単量体IgE抗体を添加することで増殖因子欠如によって引き起こされる細胞死が抑制され, マスト細胞の生存延長が観察されることを報告した. ただし, 二つのグループによる結果には異なる点も存在した. Kawakamiらの報告では単量体IgE抗体によるマスト細胞活性化反応は生存延長に限られていたが, Krystalらの報告では, 生存延長以外にも脱顆粒・サイトカイン産生・細胞内シグナル分子のリン酸化などのさまざまなマスト細胞活性化反応が観察された. その後, さまざまなモノクローナルIgE抗体を用いてマスト細胞活性化作用を検討したところ, 一部の単量体IgE抗体はマスト細胞の脱顆粒反応・ロイコトリエン産生・細胞生存延長/細胞死抑制・ヒスタミン含有量の増加・サイトカイン産生・細胞増殖反応・細胞遊走・細胞接着など, ほぼすべてのマスト細胞活性化反応を誘導するが, 別な単量体IgE抗体では弱い細胞生存延長/細胞死抑制のみ誘導することが報告された. すなわち, 単量体IgE抗体の機能的多様性が証明されたのである. そこで, さまざまなマスト細胞活性化反応を誘導する単量体IgE抗体をhighly cytokinergic IgE(HC IgE), 弱い生存延長効果のみを示す単量体IgE抗体をpoorly cytokinergic IgE(PC IgE)と分類した^{3,4)}.

単量体IgE抗体はどのようにマスト細胞を活性化するのであろう. 2,4-ジニトロフェノール(以下DNP)特異的単量体IgE抗体によるマスト細胞活性化反応は一価のDNPを添加すると抑制される³⁾ことから, 単量体IgE抗体によるマスト細胞活性化反応には抗体の可変部領域の関与が示唆された. 我々はこの点に着目しさまざまな受容体の架橋状況を想定した. すなわち①未知の可溶性成分が単量体IgE抗体の可変部領域と結合し, 受容体の架橋を引き起こすケース, ②FcεRIに結合した単量体IgE抗体が隣接するもう一つの単量体IgE抗体を認識し, 受容体が架橋される

国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
アレルギー研究チーム (〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末
広町1-7-22)

The role of histamine-releasing factor in allergic inflammation
Jun-ichi Kashiwakura (RIKEN Center for Integrative Medical Sciences,
Laboratory for Allergic Disease, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-
ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870766

© 2015 公益社団法人日本生化学会

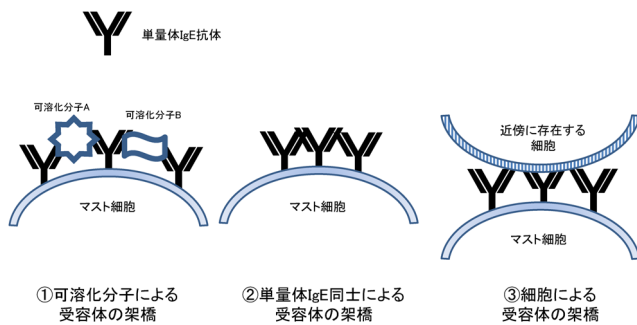


図1 単量体IgE抗体の受容体架橋モデル

ケース, ③受容体に結合している単量体IgE抗体が近傍に存在する細胞の表面分子を認識することで, 受容体が架橋されるケースである(図1)。これらのうち, 我々は一番目の仮説に着目し検証実験を開始した。

アトピー性皮膚炎や慢性じんま疹患者では, 病態形成に自己反応性IgE抗体が関与している可能性が報告されている^{5,6)}。また, HC IgEに分類されるSPE-7は特異的抗原であるDNP以外にチオレドキシニンに対しても反応性を示すことが報告されている⁷⁾。そこで, 我々は単量体IgE抗体, 特にHC IgEは特異的抗原以外にも自己成分に反応性を持ち, その結果IgE単独でさまざまなマスト細胞活性化反応を誘導するのではないかと考えた。ELISA法を用いて多抗原反応性試験を行った結果, HC IgEはさまざまな自己成分(DNA, β -ガラクトシダーゼ, サイログロブリンなど)に対して結合能を持つ(多抗原反応性)のに対し, PC IgEではこのような多抗原反応性を示さなかった。これらのことからHC IgEとPC IgEの機能的差異を決定する要因として多抗原反応性の違いがあることが示唆された。

3. HRFの同定および*in vitro*における機能解析

ヒスタミン遊離因子(HRF)はアレルギー鼻炎鼻汁・じんま疹患者皮膚浸出液中・喘息患者気管支肺胞洗浄液中に多量に存在することからアレルギー炎症, 特に遅発型アレルギー反応に関わる分子として報告されていた。1995年, MacDonaldらはこの分子の遺伝子配列を決定した⁸⁾。HRFは特定のアレルギー患者由来好塩基球を活性化し, ヒスタミン遊離やIL-4/IL-13といったサイトカイン産生を誘導する。またこの反応は好塩基球上のIgEをあらかじめ除去することで消失する。表面上IgEを除去した好塩基球にHRFに反応性を示す患者由来のIgEを結合させHRFで刺激すると, ヒスタミン遊離やサイトカイン産生が誘導されるのに対し, 反応性を示さない患者由来IgEではHRFによる好塩基球活性化反応はみられなかった。そこで, HRFによって好塩基球活性化反応を誘導できるIgEをIgE+, 誘導できないIgEをIgE-と分類した⁹⁾。

HRFは他の免疫細胞に対しても作用することが報告されている。好酸球に対してはIL-8産生および細胞内カルシウム流入を誘導する。HRFはB細胞に対しても細胞増殖および抗体産生などを引き起こす。一方, T細胞に対しては活性化を抑制する働きがあることが報告されている。非免疫細胞である気道上皮細胞はHRFによりIL-8やGM-CSFを産生する¹⁰⁾。このようにHRFはさまざまな種類の細胞に対して作用することが知られているにも関わらず, ①受容体が同定されていなかった, ②HRFはアレルギーに関わる細胞外機能のみならず細胞死や増殖に関わる細胞内機能も併せ持つ¹¹⁾が, これらの機能を区別する手法が存在しなかった, ③HRF欠損マウスは胎生致死, 細胞特異的欠損マウスではその細胞が欠落するため生体内の解析が困難であるなどの理由から, アレルギー炎症におけるHRFの機能解析は難航した。

4. HRF受容体の発見とHRF分子内の結合部位の同定

我々はHC IgE/PC IgEの関係性とIgE+/IgE-の分類が類似していることから, HRFの受容体がある種類のIgEではないかと考え, さまざまなモノクローナルIgE抗体を用いてHRFとの結合能を検証した。その結果, 約20~30%のモノクローナルIgE抗体にHRFとの結合能が存在することを明らかにした¹²⁾。さらに, HRFに対する結合能はモノクローナルIgE抗体のみならずモノクローナルIgG抗体でも観察されること, パパイン処理したIgGのFab断片は結合するがFc断片は結合しないこと, さらにFab断片ではHRFとモノクローナルIgG抗体との結合を抑制できるがFc断片ではその効果がみられないことから, HRFはある種類の抗体の可変部領域と結合することを証明した。そこでHRFに結合するIgE/IgGをHRF反応性IgE/IgG, 結合しないものをHRF非反応性IgE/IgGと分類した。

次に, HRF分子内のどの部分が抗体の可変部領域との結合に必要な検討するため, さまざまな部位欠損HRFを作製し, 抗体との結合実験を行った。この実験により, 我々はN末端側19アミノ酸(N19)と中央に存在し α ヘリックス構造を形成しているH3部位(H3)の2か所が抗体の可変部領域との結合に必須であることを証明した。HRFはC末端側にあるシステインを介して二量体を形成するので, 二量体HRFには合計4か所, 抗体との結合部位が存在する。したがってマスト細胞上のFc ϵ RI受容体に結合しているHRF反応性IgEに対し, 二量体HRFは多価抗原と同様に機能することが予測される。すなわち, 二量体HRF一つに対し, 最大四つのHRF反応性IgE結合Fc ϵ RIが架橋され, マスト細胞内に活性化シグナルを伝達する(図2)。

上述したが, HRFの細胞外機能と細胞内機能を区別す

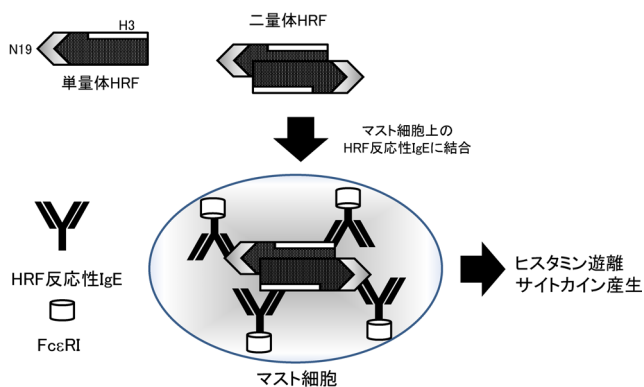


図2 HRF/HRF 反応性 IgE によるマスト細胞活性化反応モデル

る手法が以前は確立されておらず、アレルギー炎症（細胞外機能）における HRF の機能解析は困難を極めた。我々は HRF 分子内の HRF 反応性抗体結合部位同定結果から阻害剤（HRF 阻害剤）を開発し、HRF と HRF 反応性 IgE との結合を HRF 阻害剤が抑制できるかどうかを検討した。HRF 反応性 IgE を事前に HRF 阻害剤（GST-N19 もしくは GST-H3）と反応させ、その後 HRF との結合反応を調べてみたところ、結合反応が抑制された。さらに HRF 阻害剤が細胞内に侵入して細胞内機能に影響を及ぼすかどうかも確認したところ、細胞内には取り込まれず、増殖反応や細胞死に対しても HRF 阻害剤はまったく影響しなかった。これらの結果から、HRF 阻害剤は HRF と HRF 反応性抗体との結合のみを抑制することが証明され、細胞外機能、すなわちアレルギー反応に対する HRF の機能を解析する上での有用なツールとなりうることを示された。

5. アレルギー反応における HRF の役割

HRF 反応性抗体が HRF の受容体であることが証明されたが、果たして HRF は HRF 反応性抗体を介してマスト細胞や好塩基球を活性化するのだろうか。まず培養マスト細胞に HRF と HRF 反応性 IgE もしくは HRF 非反応性 IgE を添加し、脱顆粒反応およびサイトカイン産生を調べたところ、HRF 反応性 IgE と HRF を添加した培養マスト細胞では脱顆粒反応およびサイトカイン産生が観察されたが、HRF 非反応性 IgE と HRF を添加した培養マスト細胞ではそれらの反応が起らなかった。さらに、HRF 反応性 IgE/HRF によるマスト細胞活性化は HRF 阻害剤で抑制されることから、この反応が HRF 依存性であることが証明されたとともに、我々が開発した HRF 阻害剤がマスト細胞活性化反応を抑制できることが示された。次に我々は生体内での HRF の機能解析を行った。はじめに、HRF 反応性 IgE もしくは HRF 非反応性 IgE をマウス耳介に事前に投与（マスト細胞の感作）し、HRF 投与後の即時型および遅発型アナ

フィラキシー反応を検討した。HRF 反応性 IgE を感作した耳介では即時型および遅発型アナフィラキシー反応が誘発されたのに対し、HRF 非反応性 IgE を感作した耳介では両反応は観察されなかった。また、FcεRIα 欠損マウスやマスト細胞欠損マウスを用いて同様の実験を行い、この HRF/HRF 反応性 IgE によって誘導されるアナフィラキシー反応は FcεRI 依存性およびマスト細胞依存性であることを証明した。さらに、HRF/HRF 反応性 IgE 依存性アナフィラキシー反応は HRF 阻害剤の前投与により抑制されることから、HRF 分子そのものによって惹起される反応であることも立証した。

6. HRF を標的分子としたアレルギー治療の検討

我々は HRF が *in vitro* および *in vivo* で HRF 反応性 IgE を介してマスト細胞を活性化することを証明した。では実際の病態形成において HRF はどのように関わっているのだろうか。我々はさまざまな喘息マウスモデルに HRF 阻害剤を投与し、気管支喘息発症における HRF の役割の解明に取り掛かった。はじめにマスト細胞依存性喘息マウスモデルを用いて、喘息誘発後の肺組織中および血中 HRF および HRF 反応性 IgG 抗体価の測定を行った。気管支喘息誘発マウスでは肺組織中および血中 HRF が非誘発群と比べて増加していた。また、血中 HRF 反応性 IgG 抗体価も上昇しており、臨床症状との相関が示唆された。次に気管支喘息発症に HRF が関わっているか解析するため、事前に HRF 阻害剤をマウスに投与し、喘息症状の改善傾向の有無を観察した。その結果、HRF 阻害剤の GST-N19 を前処置したマウスでは非処置群および擬似薬群と比較して、有意な喘息症状の改善傾向（気管支肺胞洗浄液中の細胞数減少、炎症および粘膜産生の抑制、Th2 サイトカイン産生低下、気道過敏症の改善）が観察され、気管支炎症反応に HRF が関与していることが証明された。同様な喘息症状改善傾向は FcεRI 依存性喘息マウスモデルでも観察された。一方、T 細胞依存性喘息マウスモデルに HRF 阻害剤を前処置し、喘息反応を誘発したところ、このマウスモデルでは HRF 阻害剤による症状軽減効果は観察されなかった。これらの研究結果により、HRF はマスト細胞・HRF 反応性 IgE・FcεRI 依存性気管支喘息に関わっていることが明らかとなった。

我々はさらにアレルギー患者の臨床症状と血中 HRF および HRF 反応性抗体価との関連を検討した。健常者およびアトピー性皮膚炎患者血中 HRF を測定したところ、血中 HRF 量は健常者と比較してアトピー性皮膚炎患者で有意に増加していた。さらに、血中 HRF 反応性 IgE 抗体価も測定したところ、健常者ではまったく検出されなかったのに対し、一部のアトピー性皮膚炎患者では HRF 反応性 IgE

抗体価が高い値を示し、アレルギー症状の有無とHRFおよびHRF反応性抗体価との間には関連性がある可能性が示唆された¹³⁾。

7. おわりに

我々はいままで不明であったHRFの受容体がある種類のIgEもしくはIgGであることを証明し、また細胞外機能のみを抑制するHRF阻害剤を用いることで、HRFがマスト細胞依存性アレルギー反応を誘発する上で非常に重要な分子であることを解明した。さらに、喘息マウスモデルによるHRFの機能解析を行い、HRFが新たなアレルギー治療の標的分子となりうるとともに、我々の開発したHRF阻害剤が新規アレルギー治療薬となりうる可能性を示した。アトピー性皮膚炎患者では血中HRFやHRF反応性IgEが上昇していることから、この値はアレルギー疾患の発症を客観的に判断できるバイオマーカーになる可能性が考えられる。今後は、他の免疫・アレルギー疾患（花粉症など）などでHRFの役割を調べることで、さまざまな免疫反応における新たなHRFの役割を発見できるのではないかと筆者は考えている。

文 献

- 1) Asai, K., Kitaura, J., Kawakami, Y., Yamagata, N., Tsai, M., Car-

- bone, D.P., Liu, F.T., Galli, S.J., & Kawakami, T. (2001) *Immunity*, **14**, 791–800.
- 2) Kalesnikoff, J., Huber, M., Lam, V., Damen, J.E., Zhang, J., Siraganian, R.P., & Krystal, G. (2001) *Immunity*, **14**, 801–811.
- 3) Kitaura, J., Song, J., Tsai, M., Asai, K., Maeda-Yamamoto, M., Mocsai, A., Kawakami, Y., Liu, F.T., Lowell, C.A., Barisas, B.G., Galli, S.J., & Kawakami, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12911–12916.
- 4) Kawakami, T. & Kitaura, J. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 4167–4173.
- 5) Valenta, R., Mittermann, I., Werfel, T., Garn, H., & Renz, H. (2009) *Trends Immunol.*, **30**, 109–116.
- 6) Altrichter, S., Peter, H.J., Pisarevskaja, D., Metz, M., Martus, P., & Maurer, M. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e14794.
- 7) James, L.C., Roversi, P., & Tawfik, D.S. (2003) *Science*, **299**, 1362–1367.
- 8) MacDonald, S.M., Rafnar, T., Langdon, J., & Lichtenstein, L.M. (1995) *Science*, **269**, 688–690.
- 9) MacDonald, S.M. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **113**, 187–189.
- 10) Macdonald, S.M. (2012) *J. Asthma Allergy*, **5**, 51–59.
- 11) Telerman, A. & Amson, R. (2009) *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 206–216.
- 12) Kashiwakura, J.C., Ando, T., Matsumoto, K., Kimura, M., Kitaura, J., Matho, M.H., Zajonc, D.M., Ozeki, T., Ra, C., MacDonald, S.M., Siraganian, R.P., Broide, D.H., Kawakami, Y., & Kawakami, T. (2012) *J. Clin. Invest.*, **122**, 218–228.
- 13) Kashiwakura, J., Okayama, Y., Furue, M., Kabashima, K., Shimada, S., Ra, C., Siraganian, R.P., Kawakami, Y., & Kawakami, T. (2012) *Allergy, Asthma Immunol. Res.*, **4**, 332–340.

著者寸描

●柏倉 淳一 (かしわくら じゅんいち)

国立研究開発法人理化学研究所統合生命医科学研究センターアレルギー研究チーム上級研究員。薬学博士。

■略歴 2002年星薬科大学大学院博士過程修了。独立行政法人理化学研究所研究員、米国ラホヤ免疫アレルギー研究所博士研究員、日本大学医学部研究員、独立行政法人理化学研究所研究員を経て15年より現職。

■研究テーマと抱負 HRFおよびマスト細胞を中心としたアレルギー炎症反応の解析。