

【要約】

The functional differences of basophils and IgE in
peripheral blood between asymptomatic subjects and
symptomatic patients with allergic rhinitis

(アレルギー性鼻炎の感作、発症における
好塩基球と IgE の機能的差異についての検討)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：岡本 美孝教授)

新井智之

背景

スギやダニなどのアレルゲンに感作陽性者の中で、アレルゲンの曝露により症状が出現しない感作未発症の存在が知られている。アレルギー性鼻炎において、感作未発症者の一部はアレルギー性鼻炎発症の前段階と考えられている。我が国の季節性アレルギー性鼻炎における最も主要なアレルゲンの1つはスギ花粉だが、これまでの我々のスギ花粉症の検討において、年齢や地域による差はあるものの、花粉飛散期を1シーズン経る毎に感作未発症者の内の約20%がスギ花粉症を発症することが明らかとなっている。感作未発症において、スギ特異的IgEの上昇が必ずしも発症を引き起こさない一方で、特異的IgE以外の要素が発症に影響していることが示唆されるが、その詳細はいまだ明らかになっていない。一方、近年免疫応答における好塩基球の様々な機能が注目されている。好塩基球はリンパ節中でNaive CD4⁺T 細胞にIL-4を供給し、樹状細胞と共にNaive T 細胞からTh2 細胞への分化を促進するのみならず、好塩基球自身の細胞表面にMHC class IIおよびCD80/86を発現し抗原提示細胞としての機能も持つことが示され、アレルギーの発症初期における積極的な関与の可能性も報告されている。感作が成立しながら発症しない機序の一つとして、アレルゲンに対するマスト細胞や好塩基球の低応答性が重要な役割を果たすと考えられる。そこで、今回アレルギー性鼻炎の感作から発症の段階における好塩基球の機能的変化と、高親和性IgE受容体であるFcεRIを介した反応性の違いを検討した。

方法

スギ花粉症のボランティアおよびスギ花粉症未発症の健常者を対象とし、問診、診察、血清スギ特異的 IgE 抗体価の測定、スギ抗原ディスクによる鼻誘発テストを行い、スギ花粉症の未感作・感作未発症・発症の3群に分類し、それぞれに対し好塩基球活性化試験 (BAT)、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) 法、次世代シーケンサーとリアルタイム PCR による好塩基球の遺伝子発現解析、遺伝子解析により拾い上げられた遺伝子候補の発現する分子の細胞表面発現についてフローサイトメトリーによる解析をおこなった。

結果

BAT による 3 群の比較

未感作 9 名、感作未発症 23 名、発症 13 名、計 45 名で検討をおこなった。対象者 3 群のスギ特異的 IgE 値は、それぞれに有意差がみられたが、感作未発症群でも発症群と同程度に高い症例も認められた。未感作群は CD203c 発現の上昇は認めなかったが、発症群、感作未発症群共にスギ抗原濃度 0.1ng/ml から抗原濃度依存的に CD203c の発現の上昇を認めた。感作未発症群では反応は認められるものの、発症群より低い傾向にあり、スギ抗原濃度が上昇するにつれ発症群と感作未発症群で有意差がみられた。同程度のスギ特異的 IgE を有する症例で解析すると、発症群、感作未発症群とも各抗原濃度においてスギ特異的 IgE 値と

CD203c 陽性率には相関がみられず、抗原濃度によらず感作未発症群で発症群と比べ好塩基球の反応性が低い傾向がみられた。

EXiLE 法による 3 群の比較

未感作 8 名、感作未発症 56 名、発症 25 名、計 89 名で検討をおこなった。スギ特異的 IgE 値、EXiLE の反応性とも感作未発症群は発症群と未感作群の中間の値を示し、半数は未感作群と同様にルシフェラーゼの産生が誘導されなかった。3 群それぞれの各スギ抗原濃度のルシフェラーゼ発現変動において、感作未発症群はスギ抗原濃度によっては発症群と有意差がみられるものの、全体として発症群と未感作群の中間の反応を示した。同程度のスギ特異的 IgE を有する症例で検討すると、感作未発症群、発症群ともスギ特異的 IgE 値と EXiLE の反応性の間には強い正の相関がみられた。スギ特異的 IgE 当たりの EXiLE の反応性には、感作未発症群と発症群で有意差はみられなかった。

好塩基球の遺伝子発現解析による 3 群の比較

未感作群・感作未発症群・発症群において、遺伝子レベルにおける好塩基球の差異の有無について未感作 6 名、感作未発症 7 名、発症 11 名で検討をおこなった。次世代シーケンサーの解析からは約 4 万の遺伝子が拾い上げられた。3 群それぞれにおける、スギ抗原刺激の有無による 2 群比較では、有意に変動した遺伝子数は、最も発症群で多く、次いで感作未発症群で多く確認された。感作、発症へと段階的に上昇、もしくは低下する挙動を示す遺伝子を抽出したところ、12 の遺伝子が拾い上げられ、それらについてリアルタイム PCR にて検証実験を施行したところ、CRLF2 遺伝子で、刺激前後の比較において、未感作群では変化がなく、感作未発症群と発症群で上昇する同様の挙動を示した。

好塩基球細胞表面における TSLPR の発現解析

CRLF2 遺伝子がコードする CRLF2 タンパク質は TSLP 受容体 (TSLPR) を構成しており、TSLPR についてフローサイトメトリーで検討をおこなった。スギ抗原刺激後 24 時間において好塩基球の細胞表面で TSLPR の発現を確認したところ、感作未発症群でもスギ抗原濃度が高濃度では有意な TSLPR の上昇がみられたが、発症群では低濃度より有意に上昇がみられ、発症群と感作未発症群での TSLPR の変動には有意差がみられた。それぞれのスギ抗原濃度におけるスギ特異 IgE 値と TSLPR の変動倍率との間には、発症群と感作未発症群とも有意な相関はなく、特異的 IgE 値によらず感作未発症群は発症群より TSLPR の上昇が低い傾向がみられた。また、通年性アレルギー性鼻炎の有無によるグループ分けを追加した検討において、感作未発症群、発症群共に、スギ抗原刺激に伴う TSLPR の上昇率は通年性アレルギー性鼻炎の有無による有意差はみられなかった。

考察

地域や年齢、アレルゲンによってその割合は異なるが、アレルギー性鼻炎において感作未発症者は多数存在する。しかしながら、感作未発症において、特異的 IgE の存在にも拘らず症状が誘発されない機序はいまだ明らかではない。本研究では感作未発症と発症との間の

好塩基球と IgE の反応性の違いを検討した。BAT は、抗原刺激時の好塩基球の細胞表面上で CD203c や CD63 の発現の上昇を測定する方法である。EXiLE 法は、ヒト Fc ϵ RI を発現しルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んだラットマスト細胞株 RS-ATL8 を用い、ヒト血清などの特異的 IgE 抗体により感作させた後、抗原刺激により活性化され産生されたルシフェラーゼを検出することで、特異的 IgE の反応性をみる検査法である。ex vivo のアレルギー診断のためのツールとして、BAT の有効性は様々なアレルギー性疾患で研究され、特に食物アレルギーの診断において高い感度と特異度が確認されている。今回のスギ花粉症に対する BAT での検討において、CD203c の陽性率と抗原特異的 IgE 値との間には相関は乏しく、好塩基球の反応性は、スギ特異的 IgE 値に関わらず感作未発症群では発症群より低い傾向がみられた。一方、EXiLE 法による検討からは、感作未発症群、発症群の比較において、共にスギ特異的 IgE 値と EXiLE 法の反応性には強い正の相関がみられた。RS-ATL8 細胞は患者血清で感作した後に十分洗浄しており、被験者血清中の IgG4 抗体などの遮断抗体が抗原との結合を阻害する可能性は低いと考えられる。受身感作をおこなう細胞を統一した状態での、被験者血清中の特異的 IgE 抗体を介した反応性は、特異的 IgE の量に依存する結果となり、感作未発症群と発症群との間で特異的 IgE の質的な違いは見出されなかった。これらの結果から、発症により好塩基球の反応性が亢進することが示唆された。そこで、3 群における好塩基球の遺伝子発現の違いの有無を調べるために次世代シーケンサーによる候補遺伝子の選択をおこなった。その結果、抗原非刺激の状態においても未感作群、感作未発症群、発症群で好塩基球の遺伝子発現に異なる一定の傾向がみられた。また、各群における抗原刺激前後での比較において、有意に変動した遺伝子数が、発症群で最も多く、次いで感作未発症群で多く確認されたことから、遺伝子変化が感作、発症と段階を経てアレルギー症状の出現を変化させていく可能性が示唆された。次世代シーケンサーで拾い上げられた遺伝子候補をリアルタイム PCR で検証したところ、CRLF2 遺伝子の発現は挙動が一致し再現性が確認された。CRLF2 は I 型サイトカイン受容体ファミリーのメンバーである。IL-7R と共に TSLPR を構成しており、TSLP の刺激を受けると、下流の STAT3、STAT5、JAK2 pathway を活性化する。TSLPR は近年ヒト末梢好塩基球での発現が報告され、アレルギー疾患のない健常者に比べ、アレルギー喘息患者の好塩基球において、アレルギー刺激で発現が増加することも報告されている。TSLP のアレルギー反応への関与については様々な報告がなされており、アレルギー疾患患者の病変組織で高発現していることも知られている。今回の研究から、スギ抗原感作未発症者よりスギ花粉症発症者において、スギ抗原刺激時に好塩基球の TSLPR の細胞表面への発現がより亢進することが示された。このことから、局所粘膜上皮の障害によって放出された TSLP が、発症者の好塩基球上で発現亢進した TSLPR と結合し、そこにスギシーズン中のさらなる持続的な抗原刺激を受けることで、脱顆粒によるヒスタミンの放出、Th2 サイトカインの産生増強、TSLP、IL-3、CCR3 受容体のさらなる上昇が起り、即時相、遅発相に影響し、症状の出現・悪化や慢性アレルギー性炎症の重症化につながりうることを示唆される。スギ花粉症において、感作はスギ特異的 IgE の測定により診断されるが、感作

未発症と発症をクリアに見分ける診断法は存在しない。今回、未感作・感作未発症・発症の3群の末梢血好塩基球を解析することで感作と発症を見分けるバイオマーカーの解明も期待された。末梢血中に存在する好塩基球は白血球の約0.5%であり、分離・回収するためには多くの採血量が必要となる。今回同定されたCRLF2が構成するTSLPRは、少量の採血からでも好塩基球上の発現を同定することが可能であり、抗原刺激により発現が亢進し、感作未発症群と発症群で亢進の程度の違いが確認された。またBATにおけるCD203cの陽性率と同様に、抗原刺激時における好塩基球上のTSLPRの変動率と抗原特異的IgE値との間には相関がみられず、感作未発症群は発症群に比べ抗原刺激時の好塩基球上のTSLPRの発現上昇率が有意に低かった。また通年性アレルギー性鼻炎の有無によって、スギ抗原刺激時のTSLPRの上昇率に有意な差はなく、抗原特異的にTSLPRの上昇がおこっていることも確認された。今後、アレルギー性鼻炎の発症を診断するマーカーとしての有用性について症例数を増やし、また他アレルゲンでの検証も行うとともに、感作未発症における好塩基球の低応答性の機序を明らかにするために、さらなる検討を進める必要がある。

まとめ

スギ花粉症において、感作未発症群では、発症群と比較してスギ特異的IgEの反応性には差がみられなかった。一方、スギ特異的IgE値によらず、感作未発症群ではスギ抗原刺激によるCD203cとTSLPR発現の上昇は低く、好塩基球の低応答性が示唆された。スギ抗原刺激による好塩基球のFcεRIの架橋の後に引き続くシグナル伝達における低応答性は、感作未発症で症状が出現しない機序に関与する可能性があり、その解明はスギ花粉症の発症予防法の開発にも発展できる可能性がある。