

Fcγ Receptor I および Fcγ Receptor II を介した凝集 IgG による
関節リウマチ患者ならびに
変形性関節症患者由来ヒト滑膜マスト細胞の
活性化

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

山田 賢鎬

2014 年

指導教員 長岡 正宏

Fcγ Receptor I および Fcγ Receptor II を介した凝集 IgG による
関節リウマチ患者ならびに
変形性関節症患者由来ヒト滑膜マスト細胞の
活性化

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

山田 賢鎬

2014 年

指導教員 長岡 正宏

目次

概要	．．．．．	1
諸言		
1. 関節リウマチ	．．．．．	3
2. 関節炎マウスモデルとマスト細胞	．．．．．	4
3. 関節リウマチとヒトマスト細胞の関係	．．．．．	5
4. 関節リウマチと自己抗体	．．．．．	5
5. ヒトマスト細胞における IgG 受容体発現	．．．．．	6
対象と方法		
1. 使用抗体	．．．．．	8
2. ヒト滑膜マスト細胞の分離と培養	．．．．．	9
3. フローサイトメトリー	．．．．．	10
4. ヒト滑膜マスト細胞の活性化	．．．．．	10
5. メディエーターアッセー	．．．．．	13
6. 免疫組織化学染色法	．．．．．	14
7. 凝集 IgG の精製	．．．．．	14
8. 統計処理	．．．．．	14
結果		
1. 分離直後の滑膜マスト細胞には、FcγRI および FcγRII が 発現している	．．．．．	15
2. 分離直後の滑膜マスト細胞は、FcεRI および FcγRI の凝 集によって活性化されると脱顆粒が惹起される	．．．．．	19
3. 培養滑膜マスト細胞は分離直後の滑膜マスト細胞と同 様の形態、受容体およびプロテアーゼを有する	．．．．．	23
4. FcεRI の架橋、サブスタンス P および C5a 刺激による 培養滑膜マスト細胞の活性化	．．．．．	26

5. Fc γ 受容体の架橋による培養滑膜マスト細胞の活性化	・ ・ ・ ・ 28
6. 凝集 IgG による培養滑膜マスト細胞の活性化	・ ・ ・ ・ 32
考察	・ ・ ・ ・ 35
まとめ	・ ・ ・ ・ 41
謝辞	・ ・ ・ ・ 42
引用文献	・ ・ ・ ・ 43
研究業績	・ ・ ・ ・ 52

概要

背景：近年、ヒト滑膜マスト細胞が関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）の病態形成に関与していることが明らかになってきた。マスト細胞の活性化の経路として、RA患者に認められるIgGクラスの自己抗体および滑膜に沈着する免疫複合体が、IgG受容体を介して滑膜マスト細胞を活性化させる経路が考えられる。しかし、ヒト滑膜マスト細胞におけるIgG受容体の発現は不明である。

目的：RA患者および疾患コントロール群としての変形性関節症（Osteoarthritis; OA）患者の滑膜組織よりマスト細胞を分離し、受容体の発現および機能を比較する。また、ヒト培養滑膜マスト細胞を樹立し、分離直後の滑膜マスト細胞のフェノタイプと機能を比較する。さらに、免疫複合体により滑膜マスト細胞が活性化されるかどうか、活性化されるとしたら責任受容体は何かを検討する。

方法：分離したヒト滑膜マスト細胞におけるタンパク質発現はフローサイトメトリーで解析した。そして、Stem cell factor (SCF)および Interleukin (IL) -6 が含有された methylcellulose medium を用いて培養した。脱顆粒反応、プロスタグランジン D₂ (prostaglandin D₂; PGD₂)、IL-8 および tumor necrosis factor- α (TNF- α)産生は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で測定した。さらに、滑膜マスト細胞が免疫複合体で活性化されるかどうか

調べるために、凝集 IgG を用いて刺激した後の脱顆粒および TNF- α 産生を ELISA を用いて測定した。Fc γ RI と Fc γ RII の中和抗体を用いて、凝集 IgG によるマスト細胞の活性化の抑制を検討した。

結果：RA 患者および OA 患者において、関節滑膜から分離直後のマスト細胞表面に Fc ϵ RI、Kit、Fc γ RI および Fc γ RII の発現を認めた。どちらの患者においても Fc ϵ RI および Fc γ RI の架橋による脱顆粒反応を確認した。そして、分離したマスト細胞の培養に成功し、培養期間に応じて、純度および細胞数の上昇を認めた。培養 10 週後の培養マスト細胞においても Kit、Fc ϵ RI、Fc γ RI、Fc γ RII の発現を認めた。培養滑膜マスト細胞において、Fc ϵ RI および Fc γ RI の架橋により脱顆粒反応、PGD₂、IL-8 および TNF- α 産生を認めた。さらに、凝集 IgG の刺激によって脱顆粒反応および TNF- α 産生を認めた。抗 Fc γ RI 中和抗体および抗 Fc γ RII 中和抗体を添加すると有意にヒスタミンの遊離が抑制された。

結論：OA 患者由来の滑膜マスト細胞と RA 患者由来の滑膜マスト細胞との間に、Fc 受容体の発現および機能における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 γ RI および Fc γ RII を恒常的に発現していた。Fc γ RI および Fc γ RII は、凝集 IgG 刺激による滑膜マスト細胞での TNF- α 産生において、責任受容体であった。免疫複合体は Fc γ RI および Fc γ RII を介して滑膜マスト細胞を活性化させうるということが明らかになった。

諸言

1. 関節リウマチ

RA は、関節滑膜炎を中心とする全身性の炎症性疾患である。RA の有病率は約 1% であり(1)、女性に好発する。

RA 滑膜炎の病態は、炎症の形成と遷延化とそれに続く軟骨・骨破壊を中心とする。RA 患者における滑膜炎で産生される TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが、血管新生、T 細胞や単球などの細胞集積、滑膜細胞の増殖を介してこの病態が引き起こされる。炎症性サイトカインは滑膜細胞にマトリックスメタロプロテアーゼの産生を誘導し、軟骨の主成分である II 型コラーゲンなどを切断し、炎症性肉芽と接する軟骨を破壊する。また、これらのサイトカインにより、破骨細胞の分化が誘導され、骨破壊が生じる。

RA に対して、以前より非ステロイド系抗炎症薬 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)、抗リウマチ薬 (disease-modifying anti-rheumatic drugs; DMARDs)、ステロイド薬を組み合わせた治療が行われていた。1980 年代に RA に対するメトトレキサート (Methotrexate; MTX) の低容量経口パルス療法の有効性が確立され、本邦では 1999 年に治療薬として承認されて以来、アンカードラッグとして RA 治療の中心となってきた。しかし、MTX できさえも関節破壊の抑制に関しては十分な結果が得られなかった。これに対して、TNF- α に対する特異抗体、いわゆる生物学的製剤の登場により関節破壊の抑制が可能となり、RA の治療は新たな時代を迎えた。現在では早期から

の MTX、そして TNF- α 阻害薬を始めとする生物学的製剤の使用により、RA の治療目標が臨床症状の改善にとどまらず、寛解導入さらにはドラッグフリーへとシフトしてきている。これらのことから、RA の病態形成・維持に TNF- α を代表とするサイトカインが極めて重要な役割を担っていることは明白となった。

2. 関節炎マウスモデルとマスト細胞

RA は、患者血清中にみられる抗シトルリン化蛋白質抗体 (Anti-citrullinated peptide antibodies; ACPAs) などの自己抗体と深い関連を示す全身性の自己免疫疾患である(1,2)。K/BxN マウス血清中には抗グルコース 6 フォスフェートイソメラーゼ抗体が含まれており、K/BxN マウス血清を正常マウスに移入すると、関節炎 (K/BxN-PA) が生じる(3)。K/BxN-PA は Fc 受容体の γ サブユニットや Fc γ RIII を欠いたマウスでは生じない(4, 5)。抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体を用いた cocktail-induced 関節炎モデルと抗原誘発性関節炎モデルの研究は、IgG 受容体の活性化が関節炎発症に中心的な役割を果たしていることを明らかにした(6-8)。マスト細胞欠損マウスである W/W^vマウスと S1/S1^dマウスに、IgG1 自己抗体を添加した実験において、K/BxN-PA にはマスト細胞の活性化が必要であり(9,10)、さらに Fc γ RIIIA がトリガーとなっていることが報告されている(11)。W/W^vマウスと同様に末梢血の顆粒球が少なく、また Kit に変異を持つマスト細胞欠損マウスである *Pretty2* マウスにおいて、K/BxN-PA は減弱した(12)。対照的に、マスト細胞欠損マウスの W^{sh} マウスとマスト細胞根絶マウスの

Cre-mediated マウスでは関節炎は減弱しない(13-15)。そのため、関節炎モデルにおけるマスト細胞の免疫学的な機能についてはいまだに異論がある。しかし、マウスマスト細胞プロテアーゼ 6 欠損マウスは K/BxN-PA の発症に抵抗性であるとも報告されている(16)。

3. 関節リウマチとヒトマスト細胞の関係

RA 患者では滑膜組織において、病勢に応じて脱顆粒したマスト細胞数が増加すると報告されている(17-19)。これらの患者において、関節液中のヒスタミンやトリプターゼの量も増加していることから、マスト細胞の活性化が RA の病態に関与している可能性がある(18-21)。トリプターゼは RA 患者において Fas 依存性の滑膜線維芽細胞のアポトーシスの抑制に寄与しているとも報告されている(22)。

4. 関節リウマチと自己抗体

RA において、リウマトイド因子 (RF) をはじめとする自己抗体は抗原と免疫複合体を形成し、様々な病態の発症に関与していることが知られている。RF は IgM クラスが主であるが、IgG クラスのものはより大きな免疫複合体を形成し、組織傷害に関与することや、RA の予後不良因子の一つとされる ACPAs において、IgG クラスは IgM クラスよりも多くのシトルリン化タンパクを認識し(2)、予後予測因子として IgG クラスが最も重要であることなどが報告されている(23)。これらから、ヒト滑膜マスト細胞の活性化経路として、RA 患者にみられる IgG 自己抗体や滑膜に沈着する免疫複合体が IgG 受容体に結合する経路が考えられた。しかし、凝集 IgG が臍帯血由来培養マスト細胞を活性

化し、IL-1、IL-5、IL-6、IL-17A を産生したと報告はされているが、IgG 受容体は特定されていない(24)。また、フローサイトメトリーでは、RA 滑膜マスト細胞に Fc γ RI や Fc γ RIII は認められなかったという報告もある(25)。

5. ヒトマスト細胞における IgG 受容体発現

Fc γ RIII はヒト培養末梢血マスト細胞では発現していないが(26, 27)、我々のグループは過去にヒト培養末梢血マスト細胞と肺マスト細胞が、IFN- γ 刺激後に細胞表面に Fc γ RI を発現することを示した(24, 26, 27)。そしてヒト培養末梢血マスト細胞と肺マスト細胞において、免疫複合体や抗 Fc γ RI 抗体を用いた Fc γ RI の架橋により、脱顆粒、PGD₂ 産生、サイトカイン産生が惹起された(26, 28, 29)。また、その Fc 受容体の γ 鎖は Fc γ RI 依存性のマスト細胞の活性化に必須であることも明らかにした(30)。Fc γ RI の発現はクローン病患者からの腸組織や、乾癬患者の皮膚の免疫組織染色によって観察されるが(31, 32)、病態生理学的な Fc γ RI の役割は明らかではない。

以上を要約すると、RA において、IgG 受容体を介してマスト細胞がその病態に関与していることが考えられるが、RA 患者の滑膜マスト細胞にどの IgG 受容体が発現しているかはこれまで解明されていない。しかし、臍帯血由来培養マスト細胞は、凝集 IgG により活性化されること、また Fc γ RI を発現しうることから、滑膜マスト細胞においても Fc γ RI を発現している可能性が考えられる。そこで、著者は、RA 患者および OA 患者から得られたヒト滑膜マスト細胞における Fc

受容体の発現様式とその機能を調べる目的で本研究を行った。また、分離した滑膜マスト細胞から培養滑膜マスト細胞の樹立を試みた。さらに、免疫複合体により滑膜マスト細胞が活性化されるか否か、そしてどのIgG受容体が責任受容体であるかについて、凝集IgGを用いて検討した。

対象と方法

1. 使用抗体

IgE は Calbiochem (San Diego, CA, USA) から購入した。

以下の抗体はそれぞれ下記の会社から購入した。

抗トリプターゼ抗体 clone G3 と clone AA1 はそれぞれ Chemicon (Billerica, MA, USA) と Dako (Glostrup, Denmark)、ビオチン標識抗キマーゼ抗体(clone B7) は Chemicon (Billerica, MA, USA)、phycoerythrin (PE)標識抗 CD117 抗体(clone YB5.B8)は BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)、ビオチン標識および PE 標識抗 FcεRIα抗体(clone CRA1)は eBioscience (San Diego, CA, USA)、抗 IgE 抗体は Dako、PE 標識抗 FcγRI 抗体(CD64; clone 10.1)、抗 FcγRII 抗体(CD32; clone KB61 [FcγRIIA および FcγRIIB を認識])は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)、抗 FcγRIIB 抗体(clone EP888Y) は Epitomics (Burlingame, CA, U.S.A.)、抗 FcγRIII 抗体(CD16; clone DJ130c)は Dako、抗 FcγRI F(ab')₂ フラグメント(F[ab']₂αFcγRI, clone 10.1)は ID Labs (London, ON, Canada)、抗 FcγRII F(ab')₂ フラグメント(F[ab']₂αFcγRII, clone 7.3; FcγRIIA および FcγRIIB を認識)は Ancell (Bayport, MN, USA)、マウス IgG1 F(ab')₂ フラグメント(F[ab']₂mIgG1)および抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメント(gF[ab']₂αmF[ab']₂)は Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)。

2. ヒト滑膜マスト細胞の分離と培養

関節滑膜組織の使用に際して、倫理委員会・臨床研究審査委員会の承認(平成 22 年 2 月 8 日付け)を受けた。その後改訂版に関して平成 23 年 4 月 12 日付け、平成 24 年 12 月 17 日付け、平成 25 年 6 月 25 日付けで追加承認を受けた。承認番号は RK-100115-4 である。患者に対して手術前にインフォームドコンセントを行い承諾書を頂いた。その後、日本大学医学部附属板橋病院で行われた人工膝関節置換術の際に切除された関節滑膜組織の一部を実験に供した。滑膜組織を酵素的に処理し、細胞を単離した(マスト細胞の純度は約 5%) (33)。マスト細胞の純度を上げるために、単離された細胞を、2%ウシ胎児血清(Gibco, CA, USA)と 100 units/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen, CA, USA)を添加した Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Invitrogen)に再浮遊させた後、22.5% HistoDenz solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)とリンパ球分離溶液(lymphocyte separation medium[LSM]; Organon Teknika, Durham, NC, USA)を用いて遠心した。滑膜マスト細胞の前駆細胞と成熟マスト細胞は、その遠心により得られた沈殿層と LSM の境界面の細胞層より回収された。キムラ染色陽性細胞、すなわちマスト細胞の平均純度は $43 \pm 4\%$ (9 検体の平均 \pm 標準誤差)であった。好中球、好塩基球、好酸球の混入の程度は、それぞれ 0.6%、0.2%、0.8%であった(3 検体の平均)。回収されたマスト細胞前駆細胞と成熟マスト細胞は、0.1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin[BSA]; Sigma-Aldrich)、100 ng/ml ヒトリコンビナント SCF

(PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)、および 50 ng/ml ヒトリコンビナント IL-6 (PeproTech)を含んだ IMDM で 24 から 48 時間インキュベートした。こうして得られた細胞を分離直後の滑膜マスト細胞とした。

滑膜マスト細胞は臍帯血マスト細胞の培養方法と同様に、比重遠心後に回収した滑膜マスト細胞を serum-free Iscove's methylcellulose medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)に 200 ng/ml ヒトリコンビナント SCF と 50 ng/ml ヒトリコンビナント IL-6 を添加した IMDM で培養した (34)。42 日目には methylcellulose medium をリン酸緩衝液で溶解し、0.1% BSA、100 ng/ml ヒトリコンビナント SCF、50 ng/ml ヒトリコンビナント IL-6 を含有した IMDM (以下、MC medium)に再浮遊させ培養を継続した。

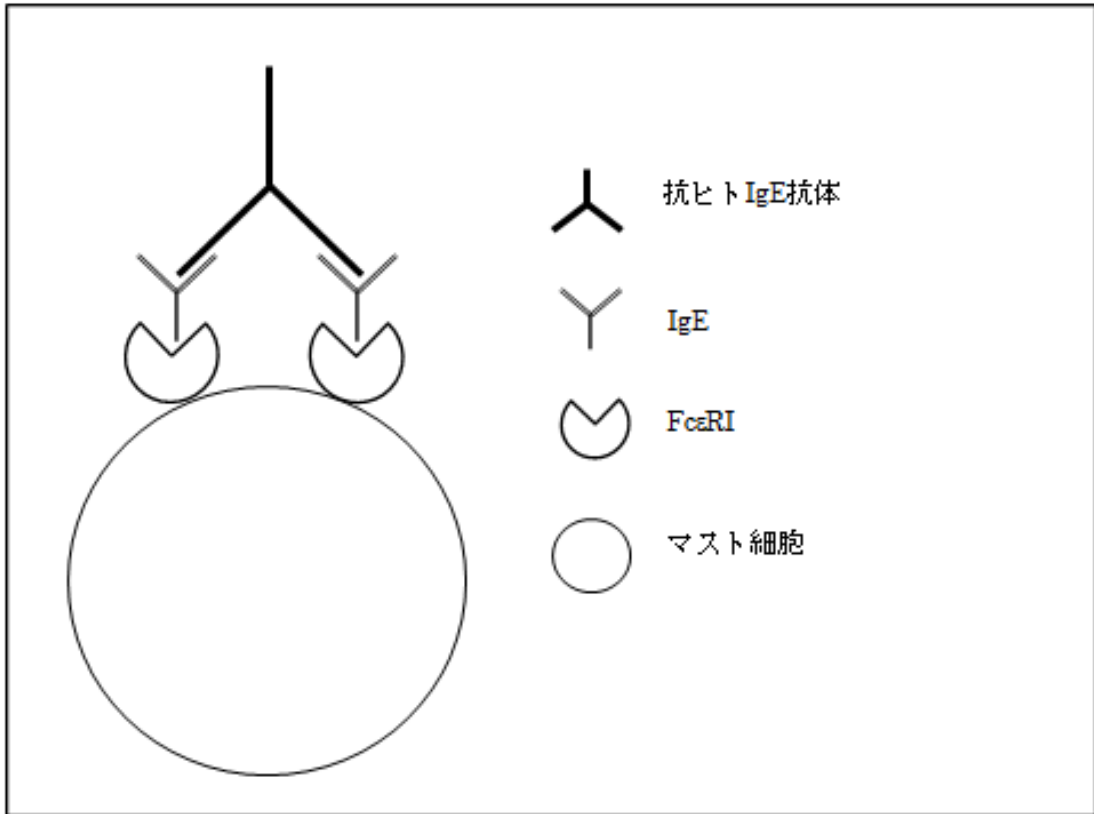
3. フローサイトメトリー

ヒト滑膜マスト細胞における、細胞表面および細胞内のタンパク質の発現を調べるために、各々の蛍光色素で標識した抗体と 4°C、30 分間反応させた後、染色細胞を FACSCalibur (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, USA)で解析した。

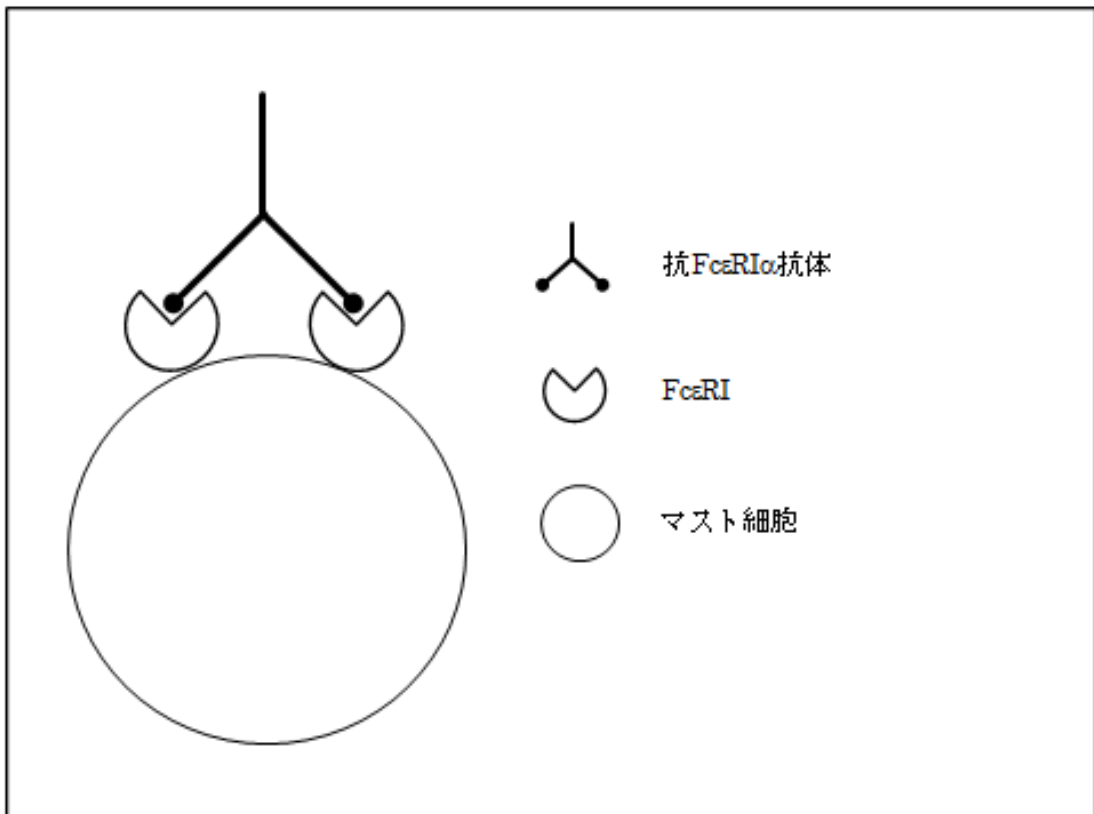
4. ヒト滑膜マスト細胞の活性化

FcεRI の架橋のために、マスト細胞に 0.5 μg/ml IgE を 37°C で 30 分間感作させ、一度洗浄した後に HEPES 緩衝液もしくは MC medium で再浮遊させた。IgE で感作されたマスト細胞を、ヒスタミンおよび PGD₂ アッセー(マスト細胞数：100 μl あたり 1×10³ 個)では抗 IgE 抗体で 30 分間刺激し、サイトカインア

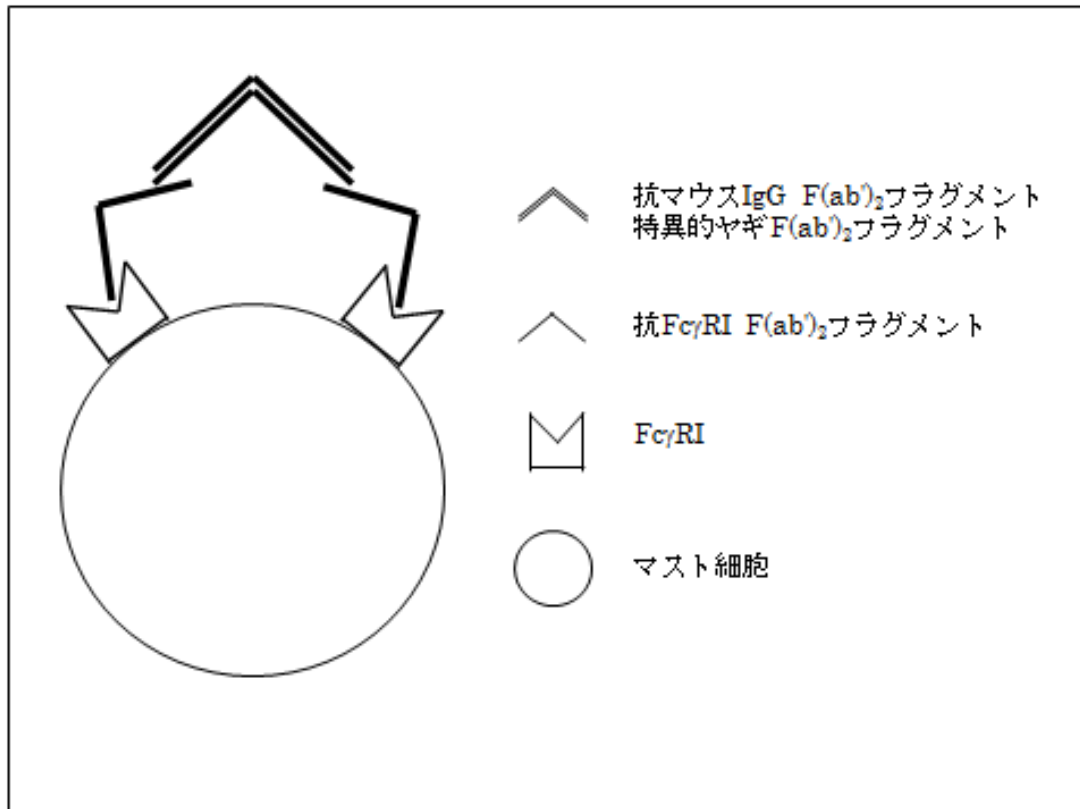
ッセー(マスト細胞数：100 μ l あたり 1×10^5 個)では抗 IgE 抗体で 6 時間刺激した(模式図①)。この方法の他に、IgE で感作せずに抗 Fc ϵ RI α 抗体(clone CRA1)で刺激した実験も行った(模式図②)。Fc γ RI および Fc γ RII の架橋には、まずマスト細胞を抗 Fc γ RI F(ab')₂フラグメント(clone 10.1)、抗 Fc γ RII F(ab')₂フラグメント(clone 7.3)、またはマウス IgG1 F(ab')₂フラグメントとともに、それぞれ 1 μ g/ml または 10 μ g/ml の濃度で 37 °C で 30 分間インキュベートした。そして洗浄後に、HEPES 緩衝液または MC medium で再浮遊させ、得られたマスト細胞を 0.3 から 10 μ g/ml の抗マウス IgG F(ab')₂フラグメント特異的 ヤギ F(ab')₂フラグメントとともにヒスタミンおよび PGD₂アッセー(マスト細胞数：100 μ l あたり 1×10^3 個)では 30 分間、サイトカインアッセー(マスト細胞数：100 μ l あたり 1×10^5 個)では 6 時間インキュベートした(模式図③)。その他、Fc γ RI (clone 10.1)および Fc γ RII (clone 7.3)の中和抗体を添加した場合としない場合で凝集 IgG とともにインキュベートした。ポジティブコントロールとして、マスト細胞をカルシウムイオノファア A23187 (10^{-6} M)とともに 30 分間インキュベートした。



模式図①



模式図②



模式図③

5. メディエーターアッセー

ヒスタミンの測定には enzyme immunoassay (EIA) kit (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France)を用いた。PGD₂の測定には Prostaglandin D2-MOX EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を用いた。IL-8 および TNF- α の測定には ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いた。percent histamine release は、(放出されたヒスタミン量/未刺激のマスト細胞に含まれる総ヒスタミン量) \times 100%として算出した。net percent histamine release は[(刺激により放出されたヒスタミン量 \square 自然放出されたヒスタミン量)/(未刺激のマスト細胞に含まれる総ヒスタミン量)] \times 100%として算出した。

6. 免疫組織化学染色法

日本大学医学部附属板橋病院で行われた人工膝関節置換術の際に採取された滑膜組織は、すぐに Optimal Cutting Temperature medium (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) に浸漬され、液体窒素で瞬間凍結された後、クリオスタットで凍結切片が作製されるまでは -80°C で保存された。マスト細胞は Alexa Fluor 488 標識した抗トリプターゼ抗体(clone AA1)およびビオチン標識した抗 Fc γ RI 抗体(CD64; clone 10.1)で染色された。そして、streptavidin-Cy3 (BioLegend, San Diego, CA, USA)とともにインキュベートすることで、Fc γ RI 陽性細胞を可視的に検出した。

7. 凝集 IgG の精製

凝集 IgG はヒト IgG (Jackson Immuno-Research) を 63°C で 1 時間加熱することで得られた(35)。大きな凝集物を $10,000\text{g}$ で 30 分遠心することで除去し、上清中の凝集 IgG を実験に使用した。

8. 統計処理

実験データが非正規性データであったため、マン・ホイットニーの U 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差がある傾向にあるものとした。

結果

1. 分離直後の滑膜マスト細胞には、FcγRI および FcγRII が発現している。

最初に、OA 患者および RA 患者の滑膜マスト細胞の形態を光学顕微鏡および電子顕微鏡で比較した。OA および RA 患者の滑膜マスト細胞は単核であり、細胞質に豊富な顆粒と脂肪体を認めた。細胞内の顆粒は渦巻状および格子状のパターンが混合しており(図 1A) (36, 37)、OA 患者と RA 患者の間で形態学的な違いは認めなかった。

フローサイトメトリーで、分離直後のトリプターゼ陽性細胞すなわちマスト細胞表面の、受容体発現を調べた。その結果、OA および RA 由来の細胞に Kit、FcεRI、FcγRI, および FcγRII が発現していたが、FcγRIII は発現していなかった(図 1B)。OA 患者由来滑膜マスト細胞と RA 患者由来滑膜マスト細胞との間で、FcεRI と FcγRI の発現量に有意な差は認められなかった(図 1B)。フローサイトメトリーでは、FcγRI の発現量が低値であったため、免疫組織化学染色法を用いて RA 患者由来の滑膜マスト細胞に FcγRI が発現しているかどうかを調べた(図 1C)。トリプターゼ陽性細胞に FcγRI の発現を確認した(図 1C)。

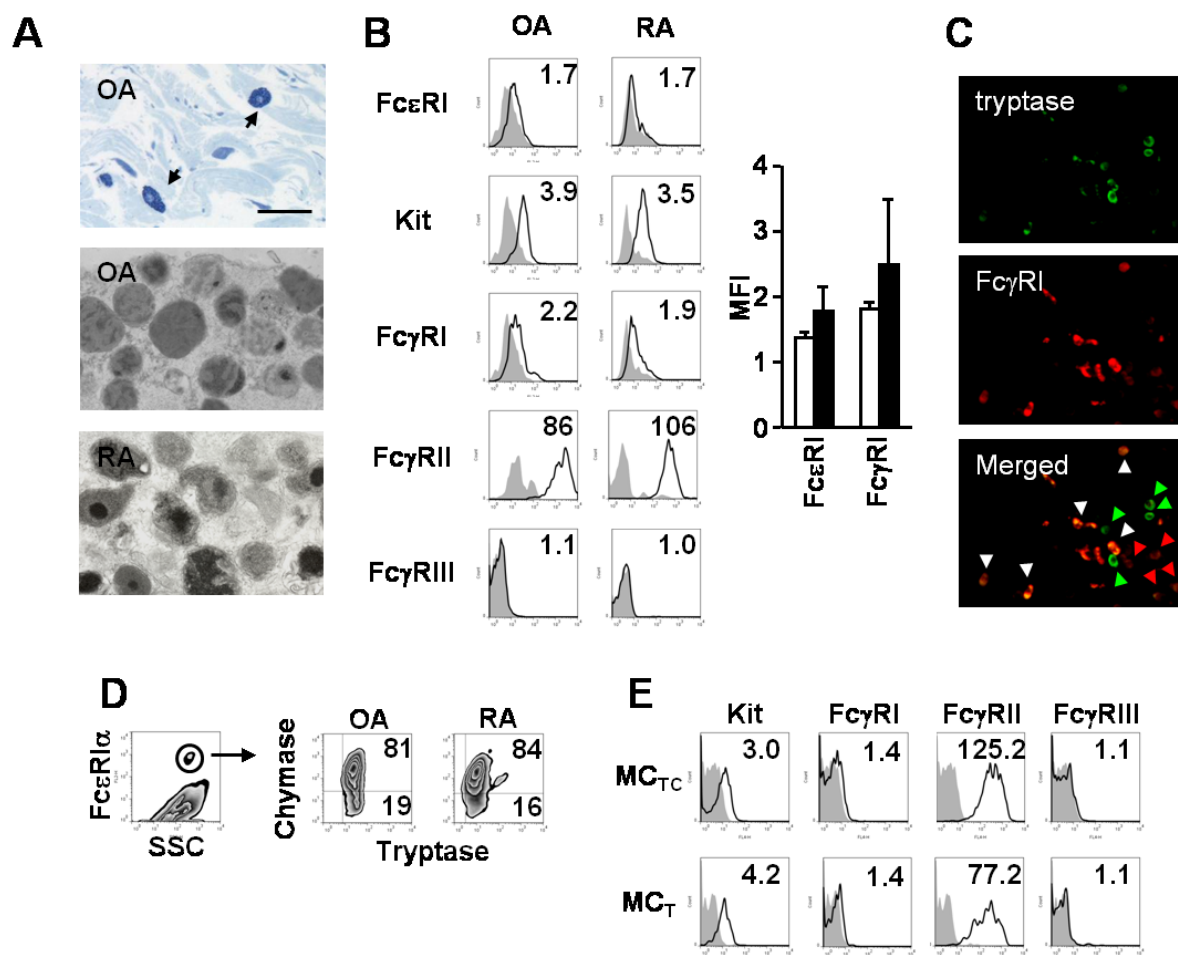
マスト細胞のサブタイプとして、粘膜においては顆粒内のプロテアーゼとしてトリプターゼのみを有するマスト細胞 (MC_T) が多くみられ、結合織や粘膜深層においてはトリプターゼ、キマーゼ、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン G 様プロテアーゼを有す

るマスト細胞 (MC_{TC}) が多く認められる。そのため、OA および RA 患者由来滑膜マスト細胞との間に、トリプターゼとキマーゼの発現パターンに差があるかを調べた。まず、 $Fc\epsilon RI$ の発現を増強するために、マスト細胞を IgE で 24 時間感作した後に、 $Fc\epsilon RI$ 陽性細胞を抗トリプターゼ抗体および抗キマーゼ抗体で染色した。どちらの滑膜マスト細胞においても、 $Fc\epsilon RI$ 陽性細胞の 80%以上が、 MC_{TC} であった(図 1D)。

ヒト滑膜組織由来の MC_{TC} と、 MC_T との間に IgG 受容体の発現に差があるかを調べるために、フローサイトメトリーを用いて OA 患者および RA 患者由来の $Fc\epsilon RI$ 陽性マスト細胞上の $Fc\gamma RI$ 、 $Fc\gamma RII$ 、 $Fc\gamma RIII$ の発現を検討した(図 1E)。Kit と $Fc\gamma RII$ は MC_{TC} および MC_T において、共に高く発現していた。さらに、 MC_{TC} および MC_T のどちらの分画にも $Fc\gamma RI$ は発現していた。しかし、 $Fc\gamma RIII$ は MC_{TC} および MC_T どちらにも発現していなかった(図 1E)。

小括：OA および RA 患者由来の IgE 感作滑膜マスト細胞のどちらも、同様の Fc 受容体の発現様式を示し、恒常的に $Fc\gamma RI$ を細胞表面に発現している。

図 1. 分離直後のマスト細胞における Fc 受容体の発現



SSC : side scatter(側方散乱)

図 1 : (A)滑膜組織中のマスト細胞をトルイジンブルー染色を用いて検出した(上)。OA 患者由来のマスト細胞(中)と RA 患者由来のマスト細胞(下)の顆粒の形状を電子顕微鏡で観察した。バーは 25 μ m を示す。
(B)OA 患者および RA 患者由来のトリプターゼ陽性細胞すなわちマスト細胞をゲートし、Kit、Fc 受容体の発現を調べた(左)。OA 由来マスト細胞(白バー)および

RA 由来マスト細胞(黒バー)表面の FcεRI と FcγRI 発現を平均蛍光強度(Mean fluorescence Intensity ; MFI)で比較した(右)。バーは、平均値±標準誤差を示す。(n=3 検体) (C)滑膜組織中のトリプターゼ陽性細胞(上図、緑)、FcγRI(中図、赤)を免疫組織化学染色法で観察した。この 2 つの画像を重ね合わせると、トリプターゼ陽性細胞に FcγRI が発現していることがわかる(下図、白矢頭)。緑矢頭はトリプターゼのみ陽性細胞で赤矢頭は FcγRI のみ陽性細胞を示す。(D)フローサイトメトリーで、OA および RA 患者由来マスト細胞における、MC_{TC} と MC_T の比率を調べた。(E)MC_{TC} および MC_T 上の Kit および Fcγ受容体の発現を調べた。数字は MFI を示す。

2. 分離直後の滑膜マスト細胞は、**FcεRI** および **FcγRI** の凝集によって活性化されると脱顆粒が惹起される。

OA 患者由来と RA 患者由来の分離直後の滑膜マスト細胞との間で、**FcεRI**、**FcγRI**、**FcγRII** を介した反応性を比較するために各々に対する抗体で刺激した（下表）。

受容体	刺激抗体
FcεRI	抗 FcεRIα 抗体
FcγRI	抗 FcγRI F(ab')₂ フラグメントプラス 抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメント
FcγRII	抗 FcγRII F(ab')₂ フラグメントプラス 抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメント

FcεRI および **FcγRI** の凝集により、OA 患者由来マスト細胞と RA 患者由来マスト細胞で同等量のヒスタミンが遊離された(図 2A、B)。**FcγRI** の凝集によるヒスタミン遊離は、コントロールであるマウス **IgG1** **F(ab')₂** フラグメントを添加した場合と比較して $p < 0.05$ であり、統計学的に有意な差を認めた。9 頁で述べた通り、好塩基球の混入は 0.2% であり、好塩基球の関与は極めて少ない。また、ヒスタミン値は刺激後 30 分の計測値であるため、測定されたヒスタミンは滑膜マスト細胞から直接的に放出されたものと考えられた。

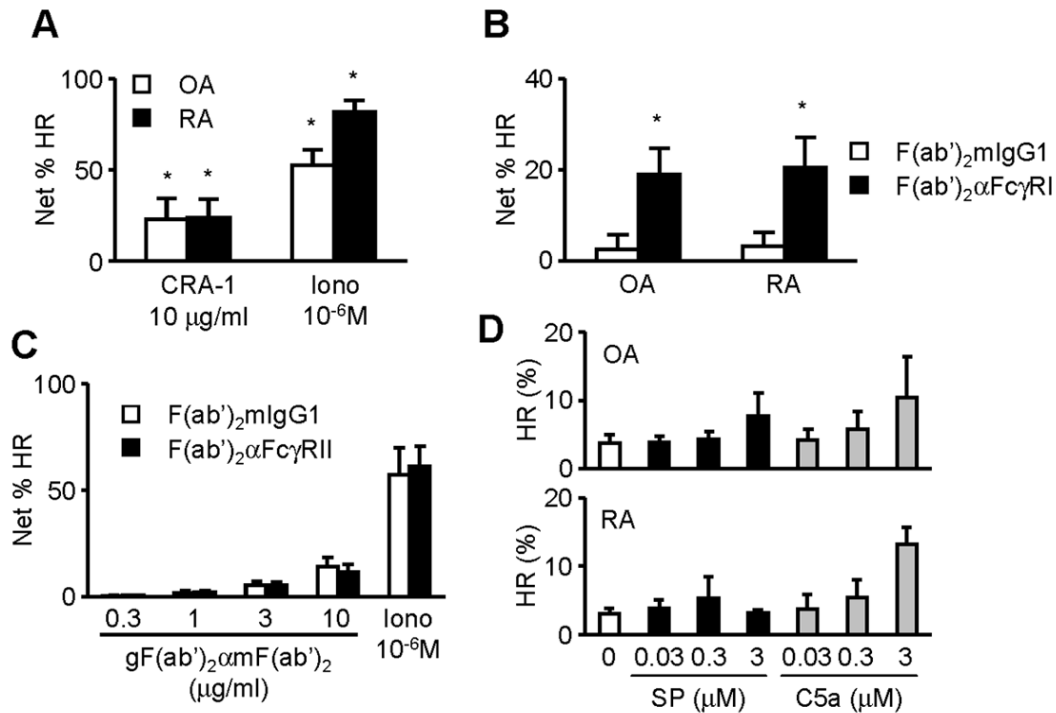
FcγRII の凝集では、どちらのマスト細胞においても有意なヒスタミンの遊離は認めなかった(図 2C)。

さらに、どちらのマスト細胞においても、サブスタ

ンス P および C5a の刺激により同等のヒスタミンの遊離が認められた(図 2D)。なお、分離直後の滑膜マスト細胞の純度は約 40%であり、単球/マクロファージが混在していたため、FcγRI の凝集による滑膜マスト細胞からの TNF-α 産生量は正確に測定することができないため施行しなかった。

小括：FcεRI および FcγRI の凝集により分離直後の滑膜マスト細胞からヒスタミンが遊離される。

図 2. FcεRI、FcγRI、FcγRII の架橋による分離直後の滑膜マスト細胞からのヒスタミン遊離



HR : histamine release(ヒスタミン遊離)

図 2 : (A)抗 FcεRIα抗体(CRA1)またはカルシウムイオノファア A23187 (Iono)で刺激後にヒスタミン遊離量を測定した。無刺激時のヒスタミン遊離の平均値±標準誤差は、OA 由来のマスト細胞では 24±9%、RA 由来のマスト細胞では 6±9%であった。(n=4 検体) (B)分離直後のマスト細胞は、抗 FcγRI F(ab')₂フラグメントまたはマウス IgG1 F(ab')₂フラグメント 1μg/ml を添加して 30 分間インキュベートされた後、抗マウス IgG F(ab')₂フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂フラグメント 10μg/ml で 30 分間刺激された。無刺激時のヒスタミン遊離の平均値±標準誤差は、OA 由来のマスト細胞では 27±9%、RA 由来のマスト細胞では 21±6%

であった。(n=4 検体) (C)マスト細胞は、抗 FcγRII F(ab')₂フラグメントまたはマウス IgG1 F(ab')₂フラグメント 10μg/ml を添加して 30 分間インキュベートされた後、抗マウス IgG F(ab')₂フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂フラグメント 0.3-10μg/ml で 30 分間刺激された。無刺激時のヒスタミン遊離の平均値±標準誤差は、マウス IgG1 F(ab')₂フラグメントを添加したマスト細胞では 30±8%、抗 FcγRII F(ab')₂フラグメントを添加したマスト細胞では 24±17%であった。(n=4 検体) (D)サブスタンス P および C5a の刺激によるマスト細胞からのヒスタミン遊離を測定した。バーは、平均値±標準誤差を示す。なお、RA 由来マスト細胞の実測値と平均値は下表の通りである。(OA 由来マスト細胞 n=4 検体、RA 由来マスト細胞 n=2 検体)

*p<0.05。

検体	①	②	平均値
0	2.19	3.77	2.98
SP0.03	2.46	5.13	3.79
SP0.3	2.19	8.36	5.28
SP3	2.73	3.49	3.11
C5a0.03	1.61	5.86	3.73
C5a0.3	2.58	8.02	5.30
C5a3	15.69	10.48	13.09

3. 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の形態、受容体およびプロテアーゼを有する

分離直後の滑膜マスト細胞の純度は、他の研究者が報告している酵素処理法に準じてても 40%程度が限界であったため(38)、**methylcellulose medium** を用いた培養を行い、高純度の滑膜マスト細胞の獲得を試みた。

キムラ染色を行い、培養週数におけるマスト細胞数と全細胞におけるマスト細胞の割合を調べた(39)。比重遠心分離後のマスト細胞の純度は $39 \pm 2\%$ であったが、培養 10 週後のキムラ染色陽性細胞の割合は 98%、細胞数は 19×10^5 個にまでに上昇した(図 3A)。

光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて、培養 10 週後のマスト細胞の形態を調べた。培養滑膜マスト細胞はトルイジンブルー染色陽性であった(図 3B)。培養滑膜マスト細胞の顆粒は、細胞内の顆粒は渦巻状および格子状のパターンが混合しており (図 3C)、分離直後の滑膜マスト細胞と同様に、結合組織型のマスト細胞と考えられた。

培養滑膜マスト細胞が分離直後の滑膜マスト細胞と同様に細胞表面に **FcεRI**、**FcγRI**、**FcγRII** および **Kit** を発現しているかどうかをフローサイトメトリーで評価した。培養滑膜マスト細胞は細胞表面に **Kit**、**FcεRI**、**FcγRI**、および **FcγRII** を発現していたが、**FcγRIII** は発現していなかった(図 3D)。培養滑膜マスト細胞上の **Kit** および **FcεRI** の発現レベルは分離直後の滑膜マスト細胞よりも高かったが、**FcγRII** の発現は低かった。

フローサイトメトリーで分離直後の滑膜マスト細胞

と 10 週後の培養滑膜マスト細胞における、トリプターゼおよびキマーゼの発現について比較した。培養滑膜マスト細胞 4 検体の平均±標準誤差は、MC_{TC}が 81 ±3%で MC_Tが 12±4%であった (図 3E)。そして、MC_{TC}および MC_Tのどちらにおいても FcγRI が発現していた。

小括：培養滑膜マスト細胞は、顆粒の形態、Fc 受容体の発現パターン、MC_{TC}と MC_Tの割合において、分離直後の滑膜マスト細胞と同様の特徴を有していた。

図 3. 培養滑膜マスト細胞の樹立.

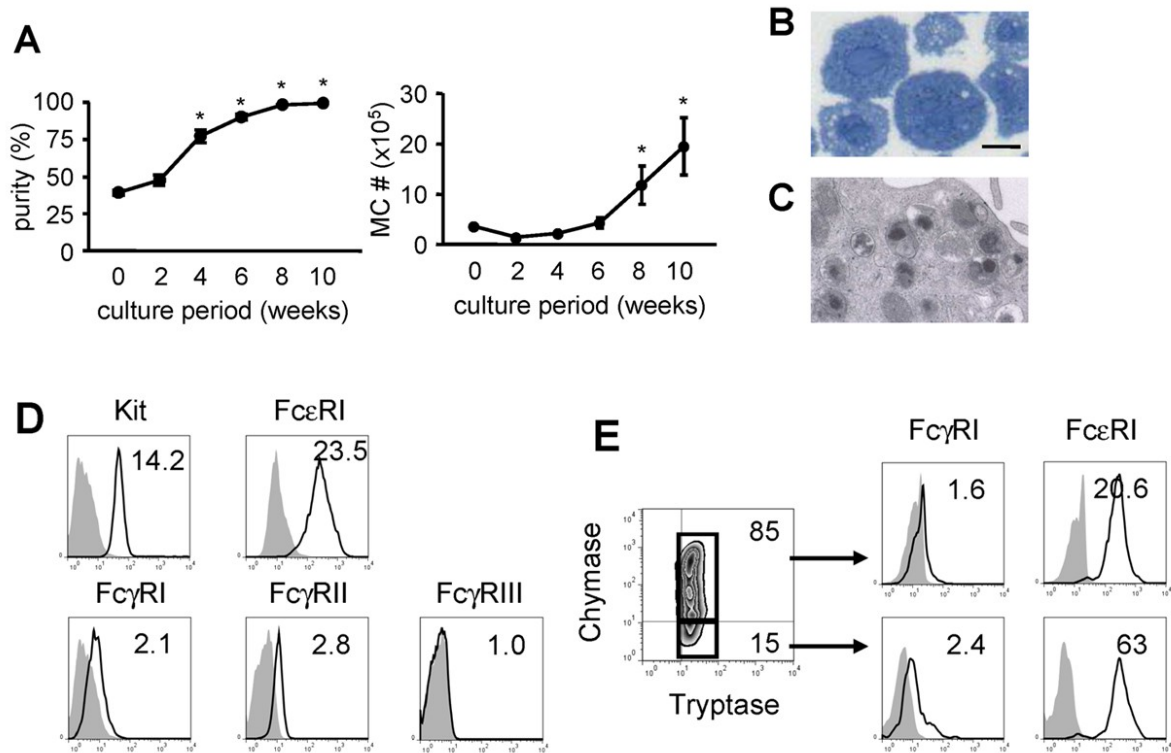


図 3 : (A)各週数における培養滑膜マスト細胞の純度と細胞数。バーは平均値±標準誤差を示す。0 週の値と比較すると有意な増加を示した。(n=4 検体) * <0.05 。(B)トルイジンブルー染色した培養滑膜マスト細胞。バーは $10\mu\text{m}$ を示す。(C)培養滑膜マスト細胞内顆粒の電子顕微鏡像。(D) 培養滑膜マスト細胞における Kit、FcεRI、FcγRI、FcγRII、FcγRIII の発現。(E) MC_{TC} および MC_T 表面の FcγRI および FcεRI の発現を、phycoerythrin 標識抗 FcγRI F(ab')₂ フラグメント (clone 10.1) および Alexa Fluor 647 標識抗 FcεRI 抗体(CRA1)を用いて調べた。数字は MFI を示す。

4. FcεRI の架橋、サブスタンス P および C5a 刺激による培養滑膜マスト細胞の活性化

培養滑膜マスト細胞上の FcεRI が機能するかどうかを調べるために、IgE で 30 分間感作し洗浄後に、抗 IgE 抗体で刺激した。IgE を介した刺激は濃度依存的なヒスタミン遊離が認められた (図 4A)。

培養滑膜マスト細胞の約 80% を占める MC_{TC} の特徴として、神経ペプチドおよび補体刺激によって脱顆粒反応が生じることが知られている(40,41)。そこで、培養滑膜マスト細胞をサブスタンス P および C5a で刺激したところ、ともに同程度のヒスタミン遊離が認められた (図 4B)。

また、FcεRI の凝集により、PGD₂、IL-8、TNF-α の産生が誘導された (図 4C-E)。

小括：培養滑膜マスト細胞は FcεRI の架橋、サブスタンス P および C5a 刺激により活性化された。

図 4. FcεRI の架橋、サブスタンス P および C5a 刺激による培養滑膜マスト細胞の活性化

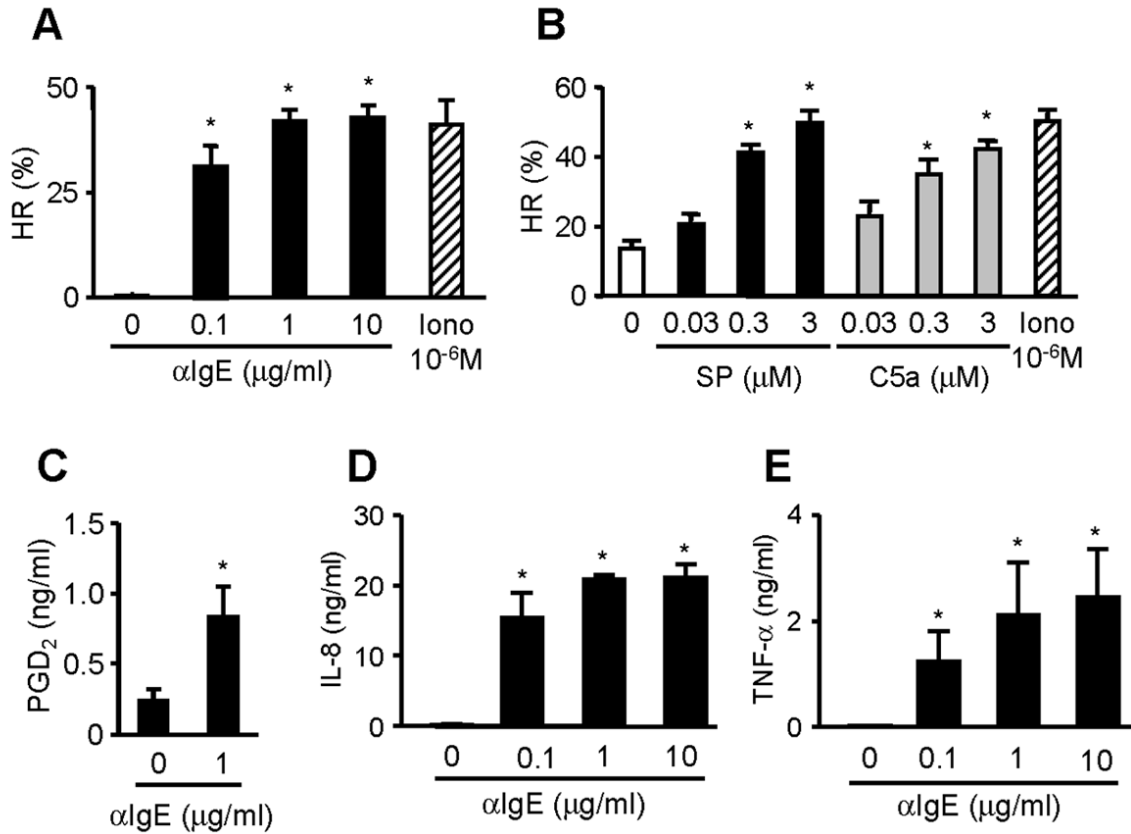


図 4 : (A)抗 IgE 抗体刺激によるヒスタミン遊離。(n=3 検体) (B) サブスタンス P および C5a 刺激によるヒスタミン遊離。(n=3 検体) (C)培養滑膜マスト細胞における抗 IgE 抗体刺激による PGD₂ 産生。(n=6 検体) (D)培養滑膜マスト細胞における抗 IgE 抗体刺激による IL-8 の産生。(n=4 検体) (E)培養滑膜マスト細胞における抗 IgE 抗体刺激による TNF-αの産生。(n=4 検体)

バーは、平均値±標準誤差を示す。*p<0.05。Iono はカルシウムイオノファア A23187 を示す。

5. Fc γ 受容体の架橋による培養滑膜マスト細胞の活性化

マスト細胞表面の Fc γ RI が機能をもっているかどうかを確かめるために、Fc γ RI の架橋によって培養滑膜マスト細胞からヒスタミン遊離が生じるかを調べた。Fc γ RI の架橋によって培養滑膜マスト細胞からのヒスタミン遊離と PGD₂ の産生を認めた(図 5A、B)。

興味深いことに、IL-8 と TNF- α に関しては、抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメントを加えずに抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメントのみの刺激でも、産生が誘導された(図 5C、図 5D)。以上より、培養滑膜マスト細胞は Fc γ RI を介して活性化されることが示された。また、F(ab')₂ フラグメントがとどく距離に Fc γ RI が発現していることを示している。

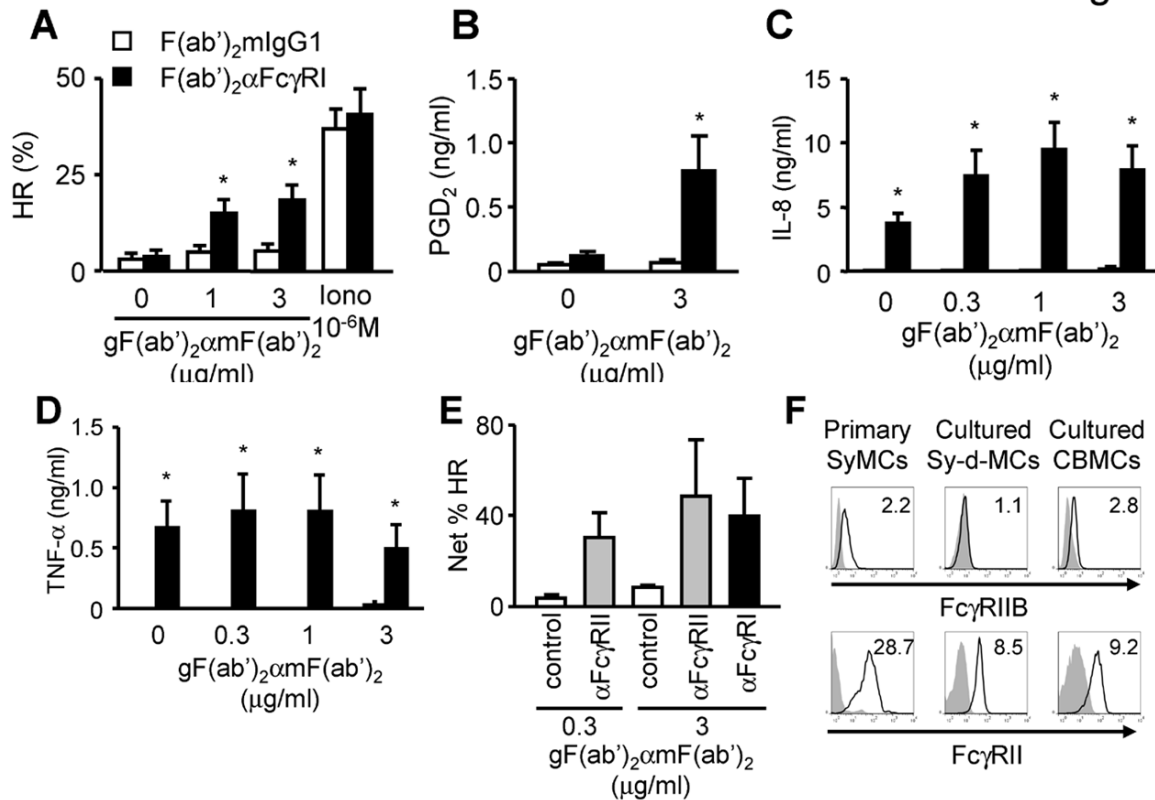
Fc γ RII の凝集によっても培養滑膜マスト細胞からのヒスタミン遊離が起こるかどうかを調べるために、抗 Fc γ RII F(ab')₂ フラグメントを添加後に、抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメントで刺激した。培養滑膜マスト細胞は Fc γ RII の凝集により、Fc γ RI 刺激の際と同等のヒスタミン遊離を認めた(図 5E)。さらに、我々は DNA チップを用いて、培養滑膜マスト細胞における Fc γ RIIA と Fc γ RIIB の messenger RNA (mRNA) の発現パターンを調べたところ、Fc γ RIIA が優位に発現しており、Fc γ RIIB の発現はほとんど認められなかった。

次に我々はフローサイトメトリーを用いて、分離直後の滑膜マスト細胞と培養滑膜マスト細胞とで

FcγRIIB の発現を比較した。**FcγRIIB** の発現は、分離直後の滑膜マスト細胞において認められたが、培養滑膜マスト細胞では認められなかった(図 5F)。**FcγRIIB** 陽性マスト細胞である培養臍帯血マスト細胞をポジティブコントロールとして用いた(42)。

小括：培養滑膜マスト細胞は **FcγRI** および **FcγRII** により活性化された。また、培養滑膜マスト細胞では **FcγRIIA** が優位に発現していた。

図 5. Fc γ 受容体の架橋による培養滑膜マスト細胞の活性化



Primary SyMCs : primary synovial mast cells
(分離直後の滑膜マスト細胞)

Cultured Sy-d-MCs : cultured synivium-derived mast cells
(培養滑膜マスト細胞)

Cultured CBMSs : cultured cord-blood-derived mast cells
(培養臍帯血マスト細胞)

図 5 : 培養滑膜マスト細胞での Fc γ RI の架橋によるヒスタミン遊離(A)、PGD₂ 産生(B)、IL-8 産生(C)、TNF- α 産生(D)。マスト細胞は抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメントまたはマウス IgG1 F(ab')₂ フラグメント 10 μ g/ml を添加して 30 分間インキュベートした後、抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フ

ラグメントで 30 分間刺激された。バーは、平均値±標準誤差を示す。(n=4 検体) * $p < 0.05$ 。(E) Fc γ RII 架橋後の培養滑膜マスト細胞によるヒスタミン遊離。マスト細胞はマウス IgG1 F(ab')₂ フラグメント(白バー)、抗 Fc γ RII F(ab')₂ フラグメント(灰色バー)、または抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメント(黒バー) 10 μ g/ml を添加して 30 分間インキュベートした後、抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメント 0.3 μ g/ml または 3 μ g/ml で 30 分間刺激した。(n=3 検体) (F)分離直後の滑膜マスト細胞(primary synovial mast cells; Primary SyMCs)、培養滑膜マスト細胞(cultured synivium-derived mast cells; Cultured Sy-d-MCs)、培養臍帯血マスト細胞(cultured cord-blood-derived mast cells; Cultured CBMSs)における Fc γ RIIB および Fc γ RII の発現を、Alexa Fluor 647 標識した抗 Fc γ RIIB 抗体 (clone EP888Y) および Alexa Fluor 647 標識抗 Fc γ RII 抗体 (clone KB61) を用いて、フローサイトメトリーで調べた。数字は MFI を示す。

6. 凝集 IgG による培養滑膜マスト細胞の活性化

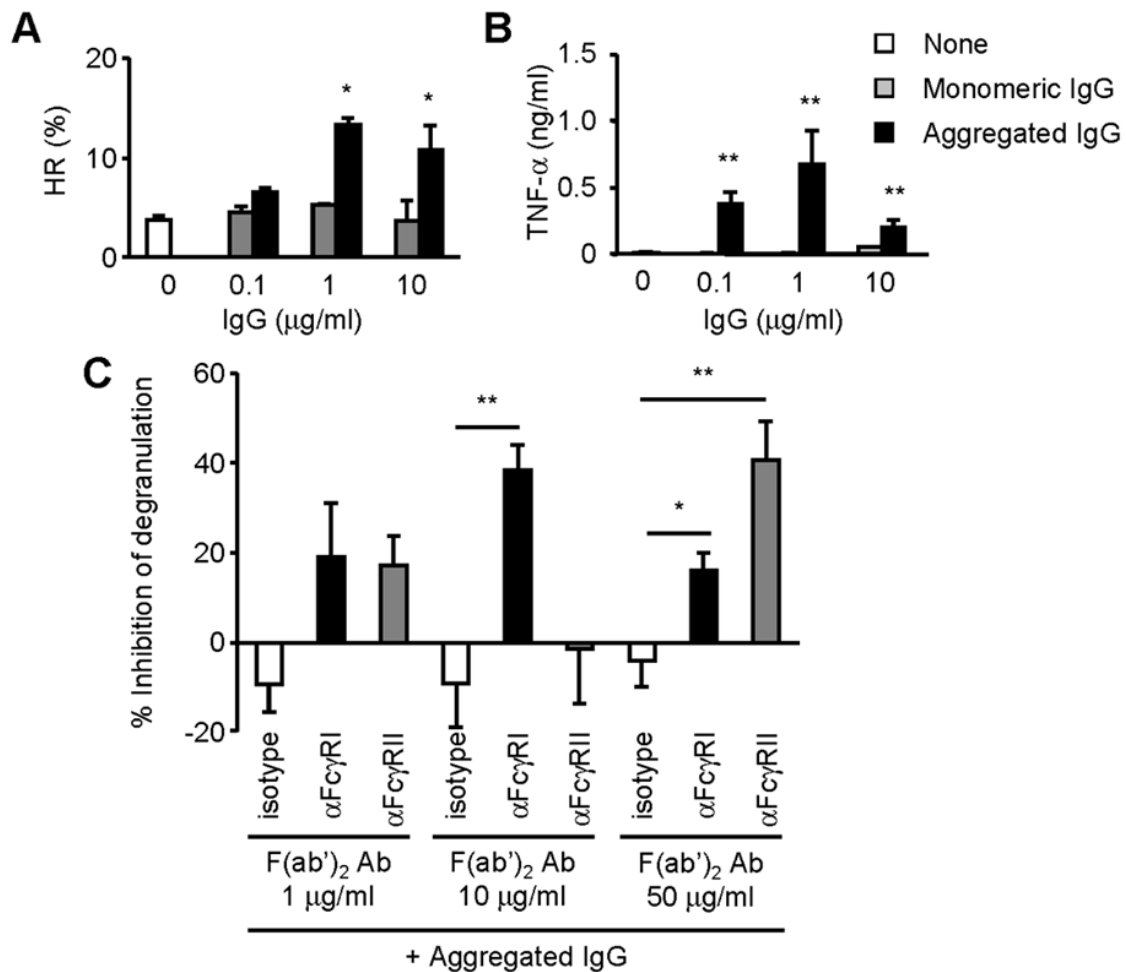
培養滑膜マスト細胞が免疫複合体により活性化されるかを調べるために、凝集 IgG で刺激することでヒスタミン遊離および TNF- α 産生が起こるかを調べた。ヒスタミン遊離および TNF- α 産生は凝集 IgG 刺激により誘導されたが、単量体 IgG 刺激では誘導されなかった(図 6A、B)。

また、高濃度(10 μ g/ml)の凝集 IgG 刺激では、0.1 μ g/ml および 1 μ g/ml 刺激よりも TNF- α 産生量が低値であった(図 6B)。

Fc γ RI と Fc γ RII のどちらが凝集 IgG による滑膜マスト細胞の活性化に寄与しているかを評価するために、それぞれの中和抗体である抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメント(clone 10.1)および抗 Fc γ RII F(ab')₂ フラグメント(clone 7.3)を用いて、ヒスタミン遊離の減少率(percent inhibition of degranulation)を調べた。[(刺激により放出されたヒスタミン量 - 中和抗体を添加した場合に放出されたヒスタミン量)/(刺激により放出されたヒスタミン量)] \times 100%として算出した。抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメント 10 μ g/ml、50 μ g/ml、または抗 Fc γ RII F(ab')₂ フラグメント 50 μ g/ml を添加した場合では、凝集 IgG 刺激によるヒスタミン遊離は有意に抑制された(図 6C)。

小括：これらから免疫複合体は Fc γ RI および Fc γ RII を介して滑膜マスト細胞を活性化させることが示された。

図 6. 凝集 IgG による培養滑膜マスト細胞の活性化



Monomeric IgG : 単量体 IgG
 Aggregated IgG : 凝集 IgG

図 6 : 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞におけるヒスタミン遊離(A)と TNF-α産生(B)。(n=4 検体)
 (C) 抗 FcγRI 中和抗体または抗 FcγRII 中和抗体による凝集 IgG 刺激後のヒスタミン遊離の抑制率。なお、無刺激時のヒスタミン遊離率の平均値±標準誤差は、3±1%、凝集 IgG 刺激によるヒスタミン遊離率は 35±6%であった。アイソタイプコントロールとしてマウス IgG1 F(ab')₂ フラグメントを用いた。F(ab')₂ フラ

グメント 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いた実験では 11 検体を用い、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメント 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いた実験では 3 検体を用いた。
バーは、平均値 \pm 標準誤差を示す。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

考察

本研究は、分離直後の滑膜マスト細胞と培養滑膜マスト細胞上の IgG 受容体の発現パターンを示した最初の報告である。分離直後の滑膜マスト細胞表面には、恒常的に機能的な FcγRI を発現していた(図 1、2)。OA および RA 由来の分離直後の滑膜マスト細胞は、顆粒の形態、MC_{TC} と MC_T の比率、IgG 受容体の発現パターンにおいて、同様のフェノタイプを呈していた。

また、滑膜マスト細胞の培養に成功し、そのフェノタイプは分離直後の滑膜マスト細胞と同様であった。培養滑膜マスト細胞は Kit、FcεRI、FcγRI、FcγRII を発現しており、80%以上が MC_{TC} であった(図 3)。培養滑膜マスト細胞では FcεRI および FcγRI の架橋により、ヒスタミンの遊離と PGD₂ やサイトカインの産生が起こり、またサブスタンス P や C5a の刺激でもヒスタミンの遊離が生じた(図 4、5)。さらに、中和抗体を用いることで、FcγRI および FcγRII が凝集 IgG によるマスト細胞活性化の責任受容体であることを確認した(図 6)。これらの結果から、滑膜マスト細胞は Fc 受容体を介して、RA の病態形成に重要な役割を果たしていると示唆される。

免疫組織染色法を用いて Blom らは、RA 患者から採取した滑膜組織中のマクロファージにおける FcγRII と FcγRIII の発現は、健常者のマクロファージより高値であったことを報告した(43)。一方で、FcγRI 発現レベルは同等であった(43)。その他、RA 患者の末梢血および関節液中の単球における FcγRI の発現レベルは、健常者や OA 患者よりも高値であった

と報告されている(44, 45)。加えて、RA 患者の滑膜マスト細胞上の C5a 受容体(CD88)の発現レベルは OA 患者よりも高かったとも報告されている(25)。

一方、本研究においては、RA 患者由来滑膜マスト細胞と OA 患者由来滑膜マスト細胞との間で、Fc 受容体の発現、そして IgE および IgG 依存性刺激によるヒスタミン遊離量と TNF- α 産生量、さらにはサブスタンス P および C5a 刺激によるヒスタミン遊離量に差は認められなかった。

しかし、RA 患者と OA 患者では滑膜組織中の微小環境に違いがあり、この微小環境の違いが RA 患者において滑膜マスト細胞を活性化させ、OA 患者と RA 患者との症状の違いを生じさせている可能性がある。すなわち、ACPAs は RA 患者に特異的な自己抗体であり、予後不良因子の一つである(46, 47)。また、*in vitro* の実験で ACPAs の免疫複合体はヒトのマクロファージと補体系を活性化させると報告されている(48-50)。したがって ACPAs をはじめとした IgG タイプの免疫複合体が RA 患者の滑膜マスト細胞を活性化させる可能性がある。さらに、RA 患者の滑液中のサブスタンス P の濃度は、OA 患者の滑液中より高い(51)。補体の活性化は RA の特徴の一つであり、C5a と C3a の値は RA 患者の関節液で上昇していると報告されている(52)。このような滑膜マスト細胞周囲の微小環境の違いが、RA 患者の滑膜マスト細胞を活性化している可能性が高い。

なお、RA 患者および OA 患者の滑膜組織において同様にマスト細胞が検出された。組織採取の際には肉眼的に滑膜組織のみを採取しており、また組織学的に

も滑膜組織として矛盾しないことを確認した。なお、末梢血由来培養マスト細胞は IFN- γ の存在無しには Fc γ RI を発現せず(26)、また末梢血中には成熟したマスト細胞は存在せず、細胞の採取の際に混入する微量の血液がこの結果に参与している可能性はない。つまり対象とした細胞は滑膜マスト細胞である。

我々のグループは以前に、IFN- γ がヒト末梢血由来培養マスト細胞とヒト肺マスト細胞上に Fc γ RI を発現させるために必要であると報告したが(26, 28)、今回我々は、OA 患者および RA 患者由来滑膜マスト細胞の表面に Fc γ RI が恒常的に発現していることを発見した。Kiener らは、分離直後の滑膜マスト細胞に対するフローサイトメトリーでは Fc γ RI の発現は認められなかったと報告した(25)。この Kiener らの報告と我々の実験結果との不一致は、Fc γ RI に対する抗体の違いや滑膜組織の酵素処理方法の違いによるものと考えられる。また、我々は免疫組織化学染色法においても、滑膜組織中のマスト細胞に Fc γ RI が発現していることを確認した(図 1C)。

分離直後および培養滑膜マスト細胞の両者に Fc γ RI と Fc γ RII が発現しており、培養滑膜マスト細胞は Fc γ RI および Fc γ RII の特異抗体を用いた架橋により活性化されることを確認した。培養滑膜マスト細胞における凝集 IgG によるヒスタミン遊離は、中和抗体である抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメントおよび抗 Fc γ RII F(ab')₂ フラグメントを添加することで有意に抑制された(図 6)。OA 患者、RA 患者由来の分離直後の滑膜マスト細胞では、Fc γ RII の架橋によるヒスタミン遊離を生じないが(図 2C)、これは Fc γ RIIB の発現が高

く **FcγRIIA** の架橋によるマスト細胞の活性化を抑制していると考えられた。しかしながら **FcγRIIB** の発現が低下するような環境において、滑膜組織に免疫複合体が沈着するような状況下で、**FcγRII** がマスト細胞の活性化に寄与している可能性がある。なお、**FcεRI** に対する抗原濃度が高くなると、受容体と抗原が一对一で結合するようになり架橋が障害されること、ネガティブシグナルの産生が増加することにより、活性化が抑えられることが知られているが(53)、図 6B において高濃度(10 μg/ml)の凝集 IgG 刺激では **TNF-α** 産生量が低値となったのは、これと同様の機序によるものと考えられる。

我々は培養滑膜マスト細胞を樹立し、分離直後の滑膜マスト細胞と同様のフェノタイプを示すことを確認した。分離直後の **FcεRI** 陽性マスト細胞の 80%以上で、トリプターゼとキマーゼが共に発現していたこと、分離直後の滑膜マスト細胞はサブスタンス P および **C5a** の刺激でヒスタミン遊離を生じたこと、分離直後の滑膜マスト細胞の顆粒の電顕像では細胞内の顆粒は渦巻状および格子状のパターンが混合していたことから、滑膜組織内のマスト細胞は結合織型マスト細胞が主である。

培養滑膜マスト細胞は、RA 患者の滑膜マスト細胞に対する新しい治療法の効果を確認するために有用な材料となり得る。しかしながら、注意しなければならないのは、分離直後の滑膜マスト細胞と培養滑膜マスト細胞との間で、**FcγRII** を介した反応に違いがあることである。つまり、培養滑膜マスト細胞では **FcγRII** の架橋により脱顆粒が生じるが、分離直後の

滑膜マスト細胞では生じないということである。**FcγRIIB** の発現が分離直後のマスト細胞で認められたが、培養滑膜マスト細胞では認められなかった(図 5F)。このことから、分離直後の滑膜マスト細胞における抗 **FcγRII F(ab')₂** フラグメントへの反応の低さは、**FcγRIIA** と **FcγRIIB** の発現の程度によって生じていると考えられる。**FcεRI**、**FcγRI**、サブスタンス P および **C5a** 受容体を介した反応で、分離直後のマスト細胞と培養マスト細胞とを単純に比較することはできないが、**FcγRI** の発現と細胞内顆粒の超微細構造は同様であった。

TNF-α は RA 患者に滑膜炎を引き起こす上で特に重要なサイトカインである。マクロファージは免疫複合体刺激により **TNF-α** を産生する主要な細胞であると考えられている(43)。我々は、滑膜マスト細胞もまた免疫複合体刺激による滑膜組織での多量な **TNF-α** 産生において中心的な役割を果たしうることを本研究で示した。さらに興味深いのは、抗マウス **IgG F(ab')₂** フラグメント特異的ヤギ **F(ab')₂** フラグメントは添加せずに、抗 **FcγRI F(ab')₂** フラグメントの刺激のみでも **TNFα** 産生が誘導されたことである。抗 **FcγRI F(ab')₂** フラグメントの刺激のみでは脱顆粒は惹起されなかったことを考えると、強い **FcγRI** の架橋なしに **TNF-α** が産生されたということである。また、他のマスト細胞と **TNF-α** 産生を比べると、滑膜マスト細胞は **FcγRI** の架橋により、**IFN-γ** 刺激後のヒト肺マスト細胞、ヒト末梢血マスト細胞、ヒト末梢血単球の約 7 倍の **TNF-α** を産生した(28, 32)。これらのことから、滑膜マスト細胞は **FcγRI** の弱い架橋により、多量な

TNF- α を産生することで、滑膜炎の発生と悪化に寄与している可能性がある。

まとめ

本研究で著者は、RA 患者および OA 患者から得られたヒト滑膜マスト細胞が機能的な FcγRI を発現していることを示した。また、培養滑膜マスト細胞の樹立に成功した。さらに、凝集 IgG 刺激により、滑膜マスト細胞から多量な TNF-α が産生されることを示し、FcγRI および FcγRII がその責任受容体である可能性が強く示唆された。このことから免疫複合体は、FcγRI および FcγRII を介して滑膜マスト細胞を活性化している可能性があることが考えられた。

謝辞

本研究は日本大学医学部大学院医学研究科先端医学系分子細胞免疫・アレルギー学研究室（羅智靖教授）において実施したものです。

本研究に関して、研究ならびに学位論文の御指導、御校閲を直接賜りました同研究室の岡山吉道准教授に深謝いたします。また、研究の御指導を賜りました柏倉淳一博士ならびに佐々木朋美さんに深謝いたします。

本研究の御指導を賜りました日本大学医学部整形外科系整形外科学分野、長岡正宏教授ならびに日本大学医学部大学院医学研究科先端医学系分子細胞免疫・アレルギー学分野、羅智靖教授に深謝いたします。

引用文献

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-61.
2. Suwannalai P, Willemze A, van Toorn L, Stoeken-Rijsbergen G, Levarht N, Drijfhout JW, et al. The fine specificity of IgM anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) is different from that of IgG ACPA. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R195.
3. Monach PA, Mathis D, Benoist C. The K/BxN arthritis model. *Curr Protoc Immunol* 2008; Chapter 15: Unit 15.22.
4. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 2002; 16: 157-68.
5. Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, Ravetch JV. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity* 2003; 18: 573-81.
6. Van Lent PL, van Vuuren AJ, Blom AB, Holthuysen AE, van de Putte LB, van de Winkel JG, et al. Role of Fc receptor γ chain in inflammation and cartilage damage during experimental antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 740-52.
7. Kleinau S, Martinsson P, Heyman B. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fc γ receptors. *J Exp*

- Med 2000; 191: 1611-6.
8. Kagari T, Tanaka D, Doi H, Shimozato T. Essential role of Fc γ receptors in anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *J Immunol* 2003; 170: 4318-24.
 9. 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: 1689-92.
 10. Corr M, Crain B. The role of Fc γ R signaling in the K/BxN serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 2002; 169: 6604-9.
 11. Nigrovic PA, Binstadt BA, Monach PA, Johnsen A, Gurish M, Iwakura Y, et al. Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2325-30.
 12. Guma M, Kashiwakura J, Crain B, Kawakami Y, Beutler B, Firestein GS, et al. JNK1 controls mast cell degranulation and IL-1 β production in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 22122-7.
 13. 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: 2797-802.
 14. Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, et al. Cutting edge: the murine high-affinity IgG receptor Fc γ RIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011; 186: 1899-903.
 15. 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: 832-44.
16. Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, et al. Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J Immunol* 2009; 182: 647-56.
 17. Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 845-51.
 18. 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: 956-63.
 19. Tetlow LC, Woolley DE. Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 896-903.
 20. Eklund KK. Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev* 2007; 217: 38-52.
 21. Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007; 217: 19-37.
 22. Sawamukai N, Yukawa S, Saito K, Nakayamada S, Kambayashi T, Tanaka Y. Mast cell- derived tryptase inhibits apoptosis

of human rheumatoid synovial fibroblasts via rho-mediated signaling. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 952-9.

23. Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Rönnelid J, et al. Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R13.
24. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010; 184: 3336-40.
25. Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, Walchshofer S, Ghannadan M, Willheim M, et al. Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 233-45.
26. Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc γ RI, on human mast cells: up-regulation by IFN- γ . *J Immunol* 2000; 164: 4332-9.
27. Okayama Y, Hagaman DD, Woolhiser M, Metcalfe DD. Further characterization of Fc γ RII and Fc γ RIII expression by cultured human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 155-7.
28. Okayama Y, Hagaman DD, Metcalfe DD. A comparison of mediators released or generated by IFN- γ -treated human mast cells following

- aggregation of Fc γ RI or Fc ϵ RI. *J Immunol* 2001; 166: 4705-12.
29. Woolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, Metcalfe DD. IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of Fc γ RI by IFN- γ . *Eur J Immunol* 2001; 31: 3298-307.
 30. Okayama Y, Tkaczyk C, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Comparison of Fc ϵ RI- and Fc γ RI-mediated degranulation and TNF- α synthesis in human mast cells: selective utilization of phosphatidylinositol-3-kinase for Fc γ RI-induced degranulation. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1450-9.
 31. Tkaczyk C, Okayama Y, Woolhiser M, Hageman D, Gilfillan A, Metcalfe D. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. *Mol Immunol* 2002; 38: 1289-93.
 32. Kobayashi R, Okamura S, Ohno T, Saito H, Mori M, Ra C, et al. Hyperexpression of Fc γ RI and Toll-like receptor 4 in the intestinal mast cells of Crohn's disease patients. *Clin Immunol* 2007; 125: 149-58.
 33. Kajiwarara 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: 1137-45.
 34. Iida M, Matsumoto K, Tomita H, Nakajima T, Akasawa A, Ohtani NY, et al. Selective down-regulation of high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) α -chain messenger RNA among transcriptome

in cord blood-derived versus adult peripheral blood-derived cultured human mast cells.

Blood 2001; 97: 1016-22.

35. Kawata N, Takata M, Suwaki T, Tanimoto Y, Soda R, Takahashi K, et al. Signal transduction by IgG receptors induces calcium mobilization, but not histamine release, in the human basophilic cell line KU812F. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 27-34.
36. De Paulis A, Marino I, Ciccarelli A, de Crescenzo G, Concardi M, Verga L, et al. Human synovial mast cells. I. Ultrastructural in situ and in vitro immunologic characterization. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1222-33.
37. Kopicky-Burd JA, Kagey-Sobotka A, Peters SP, Dvorak AM, Lennox DW, Lichtenstein LM, et al. Characterization of human synovial mast cells. *J Rheumatol* 1988; 15: 1326-33.
38. He S, Gaca MD, Walls AF. The activation of synovial mast cells: modulation of histamine release by tryptase and chymase and their inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2001; 412: 223-9.
39. Kimura I, Moritani Y, Tanizaki Y. Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin Allergy* 1973; 3: 195-202.
40. Church MK, el-Lati S, Caulfield JP. Neuropeptide-induced secretion from human skin mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94: 310-8.
41. Füreder W, Agis H, Willheim M, Bankl HC, Maier U, Kishi K, et al. Differential expression

- of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J Immunol* 1995; 155: 3152-60.
42. Zhao W, Kepley CL, Morel PA, Okumoto LM, Fukuoka Y, Schwartz LB. Fc_γRIIa, not Fc_γRIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells. *J Immunol* 2006; 177: 694-701.
43. Blom AB, Radstake TR, Holthuysen AE, Sloetjes AW, Pesman GJ, Sweep FG, et al. Increased expression of Fc_γ receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor α and matrix metalloproteinase. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1002-14.
44. Highton J, Carlisle B, Palmer DG. Changes in the phenotype of monocytes/macrophages and expression of cytokine mRNA in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 541-6.
45. Gadd SJ, Felzmann T, Majdic O, Maurer D, Petera P, Chen WJ, et al. Phenotypic analysis of functionally associated molecules on peripheral blood and synovial fluid monocytes from arthritis patients. *Rheumatol Int* 1992; 12: 153-7.
46. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic

- citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63.
47. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; 146: 797-808.
 48. Verpoort KN, Jol-van der Zijde CM, Papendrecht-van der Voort EA, Ioan-Facsinay A, Drijfhout JW, van Tol MJ, et al. Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3799-808.
 49. Trouw LA, Haisma EM, Levarht EW, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Daha MR, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1923-31.
 50. Mathsson L, Lampa J, Mullazehi M, Ronnelid J. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce Fc γ RIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor- α by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R64.
 51. Menkes CJ, Renoux M, Laoussadi S, Mauborgne A, Bruxelle J, Cesselin F.

Substance P levels in the synovium and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1993; 20: 714-7.

52. Moxley G, Ruddy S. Elevated C3 anaphylatoxin levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 1089-95.
53. Huber M. Activation/Inhibition of mast cells by supra-optimal antigen concentrations. *Cell Commun Signal* 2013; 11: 7.

研究業績

山田 賢鎬

I	発表	①一般発表	13 (共	13)
		②特別発表	なし	
II	論文	①原著論文	3 (共	3)
		②症例報告	1 (共	1)
		③総説	なし	
III	著書		なし	

以上

I 発表

①一般発表

1. 山田賢鎬, 森本祐介, 長尾聡哉, 斎藤明義, 龍順之助: 肘関節後内側にインピンジメントを呈した滑膜ヒダ障害の1例, 第647回整形外科集談会東京地方会, 東京, 2008年12月
2. 山田賢鎬, 豊泉泰洋, 長岡正宏, 長尾聡哉, 中島伸哉, 永井悠, 斎藤明義: 母指MP関節掌側脱臼の1例, 第649回整形外科集談会東京地方会, 東京, 2009年6月
3. 山田賢鎬, 長岡正宏, 長尾聡哉, 豊泉泰洋, 山口太平: A2 pulley に生じた弾発指の1例, 第24回東日本手の外科研究会, 埼玉, 2010年2月
4. 上田修平 加藤有紀, 植松義直, 田中伸明, 谷口眞, 山田賢鎬, 大幸俊三, 徳橋泰明, 洞口敬: 関節鏡視下に摘出しえた膝関節大腿骨内顆骨内伏針の1例, 第3回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会, 札幌, 2011年6月
5. 岡山吉道, 柏倉淳一, 松田彰, 大森一光, 松本健治, 山口健哉, 小野芳啓, 山田賢鎬, 斎藤博久, 羅智靖: ヒトマスト細胞の多様性, 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011年11月
6. 山田賢鎬, 岡山吉道, 柏倉淳一, 坂本朋美, 松田彰, 斎藤修, 徳橋泰明, 羅智靖: ヒト関節滑膜マスト細胞の樹立および機能解析, 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011年11月
7. 山田賢鎬, 岡山吉道, 斎藤修, 徳橋泰明: ヒト滑膜マスト細胞におけるIgG受容体の発現とその機能解析, 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会,

東京, 2012 年 4 月

8. 岡村祐己, 岡山吉道, 柏倉淳一, 山田賢鎬, 柳澤正彦, 坂本朋美, 斎藤修, 徳橋泰明, 羅智靖: 関節リウマチにおける MrgX2 を介した滑膜マスト細胞の活性化機構, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012 年 12 月
9. 柳澤正彦, 岡山吉道, 柏倉淳一, 山田賢鎬, 岡村祐己, 斎藤修, 徳橋泰明, 羅智靖: 免疫複合体による培養滑膜マスト細胞活性化反応における IL-33 の影響, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012 年 12 月
10. 山田賢鎬, 岡山吉道, 柏倉淳一, 坂本朋美, 松田彰, 斎藤修, 徳橋泰明, 羅智靖: IgG 受容体を介した免疫複合体刺激によるヒト滑膜マスト細胞の活性化, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012 年 12 月
11. 山田賢鎬, 岡山吉道, 斎藤修, 徳橋泰明: IL-33 は免疫複合体刺激によるヒト滑膜マスト細胞からの TNF- α 産生を相乗的に増加させる, 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 京都, 2013 年 4 月
12. 岡村祐己, 岡山吉道, 山田賢鎬, 斎藤修, 徳橋泰明: ヒト関節滑膜マスト細胞は MrgX2 を介して substance P によって活性化されるのみならず、FcR γ を介した刺激で substance P を産生する, 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 京都, 2013 年 4 月
13. 平良勝章, 根本菜穂, 山田賢鎬, 間世田優文, 山口太平, 長尾聡哉, 加藤有紀, 森本祐介, 洞口敬, 徳橋泰明: 成長期正常 X 線学的評価と大腿骨頭すべ

り症 FAI の視点から，第 86 回日本整形外科学会
学術総会，広島，2013 年 5 月

②特別発表
なし

II 論文

①原著論文

1. Lee H, Kashiwakura J, 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 Fcγ receptor I and Fcγ receptor II, *Arthritis & Rheumatism*, 65: 109-119, 2013
2. 山田賢鎬，柏倉淳一，岡村祐己，柳澤正彦，斎藤修，徳橋泰明，羅智靖，岡山吉道：免疫複合体によるマスト細胞の活性化，*臨床免疫・アレルギー科*，59: 620-625, 2013
3. Kashiwakura J, Yanagisawa M, Lee H, Okamura Y, Sasaki-Sakamoto T, Saito S, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: Interleukin-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells, *International Archives of Allergy and Immunology*, 161 Suppl 2: 32-36, 2013

②症例報告

1. 山田賢鎬，長岡正宏：A2 pulley に生じた弾発指の

1 例, 関東整形災害外科学会雑誌, 42: 143-146,
2011

③総説

なし

Ⅲ 著書

なし