

免疫複合体刺激による培養ヒト滑膜マスト細胞
からの TNF- α と IL-8 の産生に対する IL-33 の
影響に関する検討

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

柳澤 正彦

2015 年

指導教員 徳橋 泰明

免疫複合体刺激による培養ヒト滑膜マスト細胞
からの TNF- α と IL-8 の産生に対する IL-33 の
影響に関する検討

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

柳澤 正彦
2015 年
指導教員 徳橋 泰明

目次

概要	．．． 1
諸言	
1. 関節リウマチ	．．． 3
2. IL-33	．．． 5
3. IL-33 及び IL-33 受容体(ST2)と関節炎	．．． 6
4. マスト細胞と関節炎	．．． 8
5. 関節リウマチとヒトマスト細胞の関係	．．． 9
6. ヒトマスト細胞における IgG 受容体発現	．．． 10
7. ヒト滑膜マスト細胞	．．． 11
目的	．．． 13
対象と方法	
1. 使用試薬と使用抗体	．．． 14
2. ヒト滑膜マスト細胞の分離・培養	．．． 15
3. 凝集 IgG の精製	．．． 16
4. ヒト滑膜マスト細胞の活性化	．．． 16
5. メディエーターアッセー	．．． 17
6. フローサイトメトリー	．．． 17
7. 凍結スライド標本の作製	．．． 18
8. 免疫組織染色法	．．． 18
9. 統計処理	．．． 19
結果	
1. 培養滑膜マスト細胞表面上の IL-33 の受容体 ST2 の発現	．．． 20
2. RA 患者の関節滑膜組織のマスト細胞における ST2 の発現	．．． 20
3. IL-33 単独刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-8 と TNF- α の産生	．．． 21
4. Fc ϵ RI 及び Fc γ RI 架橋刺激による脱顆粒反応における IL-33 の影響	．．． 21

5. 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からのサイトカイン産生における IL-33 の影響。	・ ・ ・ 22
考察	・ ・ ・ 23
まとめ	・ ・ ・ 27
謝辞	・ ・ ・ 28
表 1. IL-33/ST-2 に対する処置と影響	・ ・ ・ 29
図	
図 1. RA におけるサイトカイン産生と病変形成	・ ・ ・ 30
図 2. IL-33 の産生機構の模式図	・ ・ ・ 31
図 3. IL-33 の細胞内シグナル伝達	・ ・ ・ 32
図 4. 培養滑膜マスト細胞表面上の ST2 発現	・ ・ ・ 33
図 5. RA 患者の関節滑膜組織のマスト細胞における ST2 発現	・ ・ ・ 34
図 6. 培養滑膜マスト細胞における IL-33 依存性のサイトカイン産生	・ ・ ・ 34
図 7. FcεRI および FcγRI 架橋刺激によるヒト培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応における IL-33 の影響	・ ・ ・ 35
図 8. 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からのサイトカイン産生における IL-33 の影響	・ ・ ・ 36
図 9. IL-33 と FcεRI の架橋刺激のクロストーク	・ ・ ・ 37
図説	
図 1. RA におけるサイトカイン産生と病変形成	・ ・ ・ 38
図 2. IL-33 の産生機構の模式図	・ ・ ・ 39

図 3. IL-33 の細胞内シグナル伝達	・・・ 39
図 4. 培養滑膜マスト細胞表面上の ST2 発現	・・・ 40
図 5. RA 患者の関節滑膜組織のマスト細胞における ST2 発現	・・・ 40
図 6. 培養滑膜マスト細胞における IL-33 依存性のサイトカイン産生	・・・ 41
図 7. FcεRI および FcγRI 架橋刺激によるヒト培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応における IL-33 の影響	・・・ 41
図 8. 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からのサイトカイン産生における IL-33 の影響	・・・ 42
図 9. IL-33 と FcεRI の架橋刺激のクロストーク	・・・ 42
引用文献	・・・ 44
研究業績	・・・ 55

概要

背景：関節リウマチ rheumatoid arthritis (RA) は関節破壊を伴う自己免疫疾患である。RA の病態として Th1 および Th17 細胞が IL-17 を介してマクロファージや滑膜線維芽細胞を活性化し、腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor (TNF) - α を始めとする炎症性メディエーターを分泌し、軟骨を傷害すると考えられている。また、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 受容体を介してマクロファージを活性化させ、TNF- α を産生させる機序も考えられている。Lee らは RA 患者および変形性関節症 Osteoarthritis (OA) 患者の関節滑膜よりヒト培養滑膜マスト細胞を分離および培養に成功し、凝集 IgG (免疫複合体刺激の代替として使用) が Fc γ RI と Fc γ RII を介して培養滑膜マスト細胞を活性化し多量の TNF- α を産生することを報告した。すなわち、マスト細胞も RA において TNF- α 産生細胞の 1 つであることを示した。K/BxN 血清で誘導した関節炎が Interleukin (IL) -33 投与で増悪することや、IL-33 の受容体である ST2 ノックアウトマウスでコラーゲン誘発関節炎が改善することより IL-33 の RA への関与が示唆されている。また、RA 患者では、関節液中の IL-33 が OA 患者と比較して有意に上昇していることが報告されている。さらに、IL-33 はヒト臍帯血由来培養マスト細胞から IL-13 と IL-8 を産生させ、マウスマスト細胞においては Fc ϵ RI の架橋刺激によるサイトカイン産生を増強させることが報告されている。しかし、滑膜マスト細胞において IL-33 が TNF- α を産生させるか、さらに凝集 IgG 刺激による TNF- α 産生を増強させるかは不明である。したがって免疫複合体と IL-33 の共存下における滑膜マスト細胞からの TNF- α 産生を検討することは意義がある。

目的：ヒト培養滑膜マスト細胞における IL-33 の受容体 ST2 の発現の検討と、IL-33 単独刺激による滑膜マスト細胞の活性化の検討及び免疫複合体刺激による滑膜マスト細胞活性化における IL-33 の影響を検討した。

方法：RA 患者の関節滑膜より凍結標本を作製し、マスト細胞における IL-33 の受容体である ST2 発現を免疫組織染色法で確認した。

分離したヒト滑膜マスト細胞は stem cell factor (SCF) および IL-6 を含有されたメチルセルロース培地 (methylcellulose medium) を用いて培養した。そして、培養滑膜マスト細胞上の FcεRI および ST2 発現はフローサイトメトリーを用いて確認した。免疫複合体と IL-33 共刺激後の脱顆粒反応、IL-8 および TNF-α 産生は酵素結合免疫吸着法 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した。

結果：RA 患者および OA 患者由来の培養滑膜マスト細胞はその表面に ST2 を発現していた。また、滑膜組織においてもマスト細胞が ST2 を発現していた。IL-33 の刺激によって滑膜マスト細胞から IL-8 と TNF-α が産生された。免疫複合体刺激による培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応において、IL-33 は何ら影響を及ぼさなかった。しかし、IL-8 および TNF-α 産生においては免疫複合体単独刺激と比較して、IL-33 を添加することにより IL-8 および TNF-α の産生が相乗的に増加した。

結論：免疫複合体と IL-33 の共刺激により培養ヒト滑膜マスト細胞は活性化され、多量な TNF-α を局所に産生することから、関節リウマチの病態形成や症状の増悪に関与することが示唆された。

諸言

1. 関節リウマチ

RA は、関節破壊を伴う免疫細胞に関連した慢性炎症性疾患である。RA の有病率は約 1% であり、女性に好発する。35～50 歳の間に最も好発するが小児または高齢者も罹患する(1)。

RA の関節局所での病態には、活性化された T 細胞、主に Th1 細胞及び T helper 17 (Th17) 細胞が炎症シグナルを滑膜に伝達することが重要となる(2)(図 1)。Th1 細胞は IFN- γ を産生して滑膜線維芽細胞、樹状細胞やマクロファージを活性化する。これらの細胞から産生される vascular endothelial growth factor (VEGF) および fibroblast growth factor (FGF) により血管内皮細胞は血管新生、IL-8 及び granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) により好中球の遊走と炎症及び組織傷害、IL-1、IL-6 および TNF- α により骨芽細胞の分化が起こる。一方、Th17 細胞は C-C chemokine receptor 6 (CCR6) を発現しており滑膜細胞から産生するケモカイン Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20) によって滑膜へ動員される。Th17 細胞が IL-17 を産生し、マクロファージや樹状細胞、マスト細胞に作用し、滑膜線維芽細胞分化を促進する炎症性サイトカインである IL-1、IL-6 および TNF- α の産生を増加させる。滑膜線維芽細胞の増殖は、肉芽(パンヌス)の形成をもたらし、肉芽の増大は組織の循環障害や栄養障害をもたらす。滑膜線維芽細胞および骨細胞から receptor activator of nuclear factor (RANKL) が破骨細胞前駆細胞に作用すると破骨細胞の分化を誘導する(2)。Th17 細胞は滑膜線維芽細胞にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs) の産生を誘導し、軟骨の主成分である II 型コラーゲンを切断し、炎症性肉芽と隣接する軟骨を破壊する。

炎症をおこした関節滑膜組織には、リウマトイド因子とよばれる免疫グロブリン（抗体）が大量に分泌され、免疫複合体を介して補体を活性化している。炎症性サイトカインの放出は、RAの全身および関節の症状の一因となっている(1)。RAの発病は、全身症状から始まり関節症状に進行することが多いとされる。全身症状は、関節の早朝のこわばり、倦怠感、食欲不振および全身性脱力である。関節症状は疼痛と腫脹および、こわばりがある。

RAの治療には、理学療法、薬物療法、手術療法がある。薬物療法では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て行われていた。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、治療の基本となるアンカードラッグとしてRA治療の中心となってきた。MTXは高用量で免疫抑制効果を有する葉酸の拮抗薬である。RAに使用する用量では迅速な抗炎症性を示す。しかし、MTXでさえも関節破壊の抑制に関しては十分な結果が得られていない。また、副作用などによる投与中止後に、重度の関節炎が再発も認めている(3)。

炎症性サイトカインに対する治療薬の開発により、TNF- α 阻害薬、IL-6阻害薬およびT細胞選択的共刺激調整剤 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 [CTLA-4]の細胞外ドメインとヒトIgG1のFcドメインからなる可溶性融合タンパク)の生物学的製剤により関節破壊の抑制が可能となった(4-8)。現在では早期からのMTX、そして上記の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、寛解導入が可能となってきている。これらのことから、RAの病態形成・

維持に炎症性サイトカインが重要な役割を持つことが明らかとなった。

2. IL-33

IL-33は2005年 Schmitz らによってIL-1ファミリーとして報告され、強力なTh2サイトカイン誘導能を持つサイトカインとして同定された(9)。ヒトのIL-33は内皮細胞、上皮細胞、マクロファージ、単球及びマスト細胞に発現されている。細胞核内に存在し、ストレスやネクローシスによって細胞外へ放出されTh2タイプの免疫反応を誘導する(9)(図2)。

IL-33の構造は270からなるアミノ酸蛋白から成りN末端には核移行シグナルを有し、核内で機能する蛋白と考えられていた(9)。同様のIL-1ファミリーであるIL-1 β やIL-18などは前駆体で産生されcaspase-1の酵素反応でN末端のペプチドが切断され分子量18kDaの型で活性化されるのに対し、IL-33はcaspase-1によるcaspase不活性化サイト(Asp178)で切断されると不活性化される(10)(図2)。核内で産生された前駆体IL-33はcaspase-1によりSer111とSer112の間で切断されると活性型IL-33となるが、前駆体でも生理活性を持つことが報告されている(11,12)(図2)。IL-33の産生機構としては、核内に存在し、細胞壊死(ネクローシス)あるいは細胞破壊の場合、活性を保ったまま分子量33kDaの全長の形で細胞外へ放出される。しかし、アポトーシスによる細胞死の場合、アポトーシス関連プロテアーゼ(caspase-3, caspase-7)によってIL-33は切断され、不活化される(12)(図2)。

IL-33の活性シグナル伝達は、IL-1ファミリーであるIL-1 β やIL-18と同様であり、その受容体は、細胞外に特徴的な免疫グロブリン様構造をもつIL-1受容体ファミリーとして分類される(13)。IL-33の受容体は1989年に

富永らによりクローニングされた ST2 と同一の物質である(14)。ST2 は Th2 細胞や好塩基球、マスト細胞、そして好酸球上に発現している(14.)。IL-33 はマスト細胞の生存を延長させる (15)。ST2 には可溶性の分泌型 ST2 (sST2) と膜貫通受容体型 ST2 (ST2L) が存在し IL-33R を構成するのは受容体型 ST2 である (13) (図 3)。一方、sST2 はデコイ受容体として IL-33 と結合することで細胞内にシグナルを伝達できずに IL-33 の機能を抑制する (16.17) 。IL-33R は IL-33 結合分子である ST2 (IL-33R α 鎖) とシグナル伝達に参与する interleukin-1 receptor accessory protein [IL-1RAcP] (IL-33 β 鎖) のヘテロダイマーで構成される (16.17) (図 3)。IL-33 がそれら受容体に結合すると IL-33R の細胞内ドメインにアダプター分子である myeloid differentiation factor (MyD88)が結合し、 IL-1R-associated kinase 4 (IRAK4)、IRAK1、TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)を介して、nuclear factor-kappa B (NF- κ B)経路と mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路が活性化され、IL-33 のシグナルが伝達される (18) (図 3)。IL-33 は関節リウマチ、気管支喘息、炎症性腸疾患、動脈硬化、虚血性心疾患、神経疾患、敗血症などの病態に参与することが報告されている (18)。

ST2 は Th2 細胞、好塩基球、好酸球そしてマスト細胞上に発現し、IL-33 の投与によって気道アレルギーを惹起できることから、IL-33 はアレルギー性炎症に重要な作用があると示唆されている (19) 。

3. IL-33 及び IL-33 受容体(ST2)と関節炎

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 (GPI) 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 関節

炎)を誘導する。関節炎の発症に抗 GPI 抗体 (IgG)およびその受容体 FcγRIII が重要な役割を果たす。この抗 GPI 抗体が認識する抗原は体内に普遍的に存在するユビキタスな糖代謝酵素(GPI)である。関節炎を発症したマウスの軟骨表面上には GPI と GPI 抗体の免疫複合体、さらに補体 C3 の局在が認められる。細胞表面には補体の不活性化因子が存在しているが、軟骨にはその因子は欠損している。そのため軟骨では GPI-抗 GPI 免疫複合体と補体を沈着による補体第二経路と C5aR を介した免疫複合体の活性化により K/BxN 関節炎が誘導される(20)。

IL-33 を K/BxN 関節炎マウスに投与すると、関節炎症状の増悪を認めた(表 1)。また、TNF-αや IL-1βと、IgG1、IgG2b の産生を増強させた(21)。さらに、コラーゲン誘発関節炎(CIA)マウスモデルの培養滑膜線維芽細胞や RA 患者の滑膜線維芽細胞では IL-33 mRNA の発現が増強している(22,23)。

野生型マウスに比べ ST2 ノックアウトマウスで CIA を惹起させると野生型マウスに比べ ST2 ノックアウトマウスで関節炎症状の改善と、所属リンパ節細胞の IL-17、IFN-γおよび TNF-αの産生と、抗コラーゲン抗体産生の著明な低下が認められる。また、野生型マウス由来のマスト細胞を ST2 欠損マウスに移入すると、CIA の炎症症状が野生型マウスと同様になった(21)。

抗 ST2 抗体を投与した CIA マウスモデルの所属リンパ節細胞と、コントロール抗体を投与したマウスの所属リンパ節細胞と比較したところ、IFN-γの産生が著明に減少していた。IL-17、IL-10 および TNF-αの産生も抑制されたが、その程度はわずかであった(22)。

分泌型 ST2 (sST2)を投与すると CIA マウスモデルの関節炎を抑制した。この抑制効果は分泌型 ST2 による IL-33 の中和によると考える(24)。

しかしながら、IL-33 ノックアウトマウスを用いて K/BxN 関節炎を惹起しても関節炎症状は改善しないという報告もある(25,26)。

RA 患者の血清および関節滑液において、抗 IL-33 抗体を用いて IL-33 の蛋白質の検出を行うと、活性型 IL-33 と考えられる蛋白質と同様の約 30kDa のバンドが検出された(27)。また、関節炎の重症度と血清及び関節液の IL-33 濃度は相関していると報告されている(28)。

CIA マウスモデルの関節炎の系では、IL-33 が増悪因子として働いていることがわかる。一方、K/BxN 関節炎マウスでは過剰の IL-33 を投与すると関節炎症状は増悪するが、内在性 IL-33 を抑えても関節炎は改善しない。この機序の違いは明らかではないが、マウスのストレインの違いや誘導する関節炎の機序すなわち受動免疫 (K/BxN 関節炎) あるいは能動免疫 (CIA) の違いによるものと思われる。

以上より IL-33 はマウスにおいて関節炎の炎症性サイトカインを産生することで関節炎の増悪因子であることが報告されている。RA 患者においても関節滑膜に IL-33 が高度に発現することや、IL-33 が関節炎の重症度と相関していることより、RA の増悪に関与することが示唆されている。

4. マスト細胞と関節炎

マスト細胞はアレルギー反応においてだけでなく、自然免疫においても、重要な細胞である。K/BxN マウスモデル血清中には抗 GPI 抗体が含まれており、K/BxN マウス血清を野生型マウスに移入すると、滑膜増生、パンヌス形成、炎症細胞浸潤および骨・軟骨破壊を有する関節炎が生じる(20)。そこで、W/W^v マウスモデルと S1/S1^d マウス (マスト細胞欠損マウス) を用いて K/BxN 血清によ

る関節炎を誘発した実験では関節炎症状は軽症化や無症状を示した(29.30)。また、K/BxN 関節炎は FcγR や FcγRIII を欠損したマウスでは生じない(31.32)。さらに *Pretty2*マウス (Kitに変異を持つマスト細胞欠損マウス) において K/BxN 血清による関節炎を誘発すると関節の炎症は減弱する(30)。一方、W^{sh}マウス (マスト細胞欠損マウス) と Cre-mediated マウス(マスト細胞根絶マウス) では関節の炎症は減弱しない(33-35)。そのため、関節炎マウスモデルを用いたマスト細胞の役割については異論もある。しかし、mouse mast cell protease (mMCP-6) (ヒトβ-トリプターゼの相同分子)を欠損したマウスモデルを用いて、K/BxN 誘発関節炎を惹起させると、ワイルドタイプと比較して関節の炎症は減弱する(36)との報告もある。

5. 関節リウマチとヒトマスト細胞の関係

RA 患者の関節滑膜組織には正常患者の関節滑膜組織に僅かにしか存在しないマスト細胞が全細胞中の 5%以上と比較的多量に存在している(37.38)。

RA 患者では滑膜組織の脱顆粒したマスト細胞数の増加と炎症の強さが相関する報告されている(39-41)。そして、RA 患者の関節滑液中のヒスタミンとトリプターゼ濃度は OA 患者と比較して上昇している(39.40.42.43)。RA 滑膜組織ではマスト細胞がトリプターゼを放出し、そのレセプターである protease activated receptor 2 (PAR2) は RA 滑膜線維芽細胞に高発現していることが報告されている(44)。マスト細胞より産生したトリプターゼは RA 滑膜線維芽細胞の PAR2 を介して Fas 依存性アポトーシスを阻害することで RA 患者の滑膜組織の増殖に関与している(45)。

また、RA の関節組織や関節滑液には補体である C5a が

存在している(46)。そして滑膜線維芽細胞はマスト細胞の遊走、成熟因子である stem cell factor (SCF) を大量に産生し、マスト細胞を滑膜炎局所に動員させる。組織内で成熟したマスト細胞は、CD88 及び C3a 受容体の補体レセプターや FcγR を発現し、それぞれ C5a や C3a などの補体活性化、IgG 自己抗体や免疫複合体と結合して脱顆粒する(47)。

以上より、マスト細胞の活性化が RA の病態に関与していることも示唆された。

6. ヒト滑膜マスト細胞における IgG 受容体発現

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る。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 を産生したという報告はされている(48)が、IgG 受容体は特定されていなかった。

FcγRIII は培養ヒト末梢血マスト細胞では発現していないが(49.50)、Okayama らは以前、培養ヒト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 FcγRI を発現することを報告した(49.51)。免疫複合体や抗 FcγRI 抗体を用いた FcγRI の架橋により、培養ヒト末梢血マスト細胞において脱顆粒、Prostaglandin D₂ (PGD₂) 産生、サイトカイン産生が惹起された(50.52.53)。FcγRI 依存性のマスト細胞の活性化には FcεRI のγ鎖を必要とすることを明らかにした(52)。Lee らは、ヒト滑膜マスト細胞は FcγRI を恒常的かつ機能的に発現していることを報告した。培養ヒト滑膜マスト細胞を樹立し、FcγRI および FcεRI を介する刺激により、脱顆粒反応、PGD₂ およびサイトカイン産生が誘導されることを報告した(53)。同時に、FcγRI および FcγRII は、凝集 IgG 刺激に

よる滑膜マスト細胞での TNF- α 産生における責任受容体であることを報告した(53)。しかし、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なかった(53)。

7. ヒト滑膜マスト細胞

粘膜に局在するマスト細胞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)が優位であり、結合織や粘膜深層に局在するマスト細胞はトリプターゼ、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})が優位である。

分離直後のヒト滑膜マスト細胞の形態は光学顕微鏡および電子顕微鏡では単核であり、細胞質に豊富な顆粒と脂肪体を認めた(53)。細胞内の顆粒は渦巻状および格子状が混合しており、OA 患者と RA 患者の間で形態学的な違いは認めていない(53)。分離直後の滑膜マスト細胞は80%が MC_{TC} であり、20%が MC_T であった(53)。

培養 10 週後のマスト細胞はトルイジンブルー染色陽性であり、その顆粒は、細胞内の顆粒は渦巻状および格子状が混合しており、分離直後の滑膜マスト細胞と同様の顆粒像を示した(53)。培養滑膜マスト細胞は分離直後の滑膜マスト細胞と比較して Fc 受容体の発現パターン、MC_{TC} と MC_T の割合において同様の特徴を有した(53)。

以上を要約すると、RA は関節破壊を伴う自己免疫疾患である。RA の病態として Th1 および Th17 細胞が IL-17 を介してマクロファージや滑膜線維芽細胞を活性化し、TNF- α を始めとする炎症性メディエーターを分泌し、軟骨を傷害すると考えられている。また、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 受容体を介してマクロファージを活性化させ、TNF- α を産生させる機序も考えられている。Lee らは RA 患者および OA 患者の関節滑膜よりヒト培養滑膜マスト細胞を分離および培養に成功し、凝集 IgG (免疫複合体刺激の代替として使用) が Fc γ RI と Fc γ RII を介して培養滑膜マスト細胞を活性化し多量の TNF- α を産生することを報告した (53)。すなわち、マスト細胞も RA において TNF- α 産生細胞の 1 つであることを示した。K/BxN 血清で誘導した関節炎が IL-33 投与で増悪することや (21)、IL-33 の受容体である ST2 ノックアウトマウスでコラーゲン誘発関節炎が改善することより IL-33 の RA への関与が示唆されている (21)。また、RA 患者では、関節液中の IL-33 が OA 患者と比較して有意に上昇していることが報告されている (28)。さらに、IL-33 はヒト臍帯血由来培養マスト細胞から IL-13 と IL-8 を産生させ (54)、マウスマスト細胞においては Fc ϵ RI の架橋刺激によるサイトカイン産生を増強させることが報告されている。しかし、滑膜マスト細胞において IL-33 が TNF- α を産生させるか、さらに凝集 IgG 刺激による TNF- α 産生を増強させるかは不明である。したがって免疫複合体と IL-33 の共存下における滑膜マスト細胞からの TNF- α 産生を検討することは意義がある

目的

本研究は、

1. RA または OA 患者より採取した滑膜組織から樹立した培養ヒト滑膜マスト細胞が IL-33 により活性化されるかどうかを検討すること。

2. 免疫複合体刺激による培養ヒト滑膜マスト細胞の活性化における IL-33 の影響をヒスタミン遊離量、IL-8 及び TNF- α の産生量を指標に検討すること。

を目的とした。

対象と方法

1. 使用試薬と使用抗体

ヒトリコンビナント IL-33 とヒトリコンビナント IL-6、ヒトリコンビナント SCF は PeproTech 社 (Rocky Hill, NJ, USA)、ヒト IgG は Jackson Immune Laboratory 社 (West Grove, PA, USA)、ヒト TruStain FcX™ は BioLegend 社 (San Diego, CA, USA)、抗トリプターゼ抗体 cloneAA1 は DAKO Cytomation 社 (Carpinteria, CA, USA)、抗ヒト ST2 抗体は R&D System 社 (Minneapolis, MN, USA)、ビオチン標識された抗ヒト FcεRIα 抗体 clone CRA1 は BD Bioscience 社 (San Jose, CA, USA)、streptavidin-PE は BD Bioscience 社、streptavidin-Cy3 は BioLegend 社 (San Diego, CA, USA)、Alexa Fluor 488 は Life technologies 社 (San Jose, CA, USA)、DAPI は Life technologies 社、Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) は Invitrogen 社 (Carlsbad, CA, USA)、コラゲナーゼは Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA)、ヒアルロニダーゼ Sigma-Aldrich 社、ウシ胎児血清 Fetal Bovine Serum (FBS) は Gibco 社 (Life technologies 社) (San Jose, CA, USA)、ペニシリン/ストレプトマイシンは Invitrogen 社、HistoDenz solution は Sigma-Aldrich 社、リンパ球分離溶液 lymphocyte separation medium (LSM) は Organon Teknika 社 (Durham, NC, USA)、ウシ血清アルブミン bovine serum albumin (BSA) は Sigma-Aldrich 社、無血清メチルセルロース METHOCULT SFBIT は Stem Cell Technologies 社 (Vancouver, BC, Canada) よりそれぞれ購入した。

凍結組織切片作製用包埋剤 Optimal Cutting Temperature (OCT) コンパウンドはサクラファイテックジャパン社 (Tokyo, Japan) より購入した。

2. ヒト滑膜マスト細胞の分離・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、書面で承諾書を頂いた。その後、日本大学医学部附属板橋病院で行われた OA 患者と RA 患者の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使用した。滑膜組織は細菌増殖を防ぐために氷で冷やし作業をした。まず、クーパーを用いてできるだけ細切した。次に、IMDM 浮遊させた細胞をコラゲナーゼ（Sigma-Aldrich 社、1.5mg/ml）とヒアルロニダーゼ（Sigma-Aldrich 社、0.75mg/ml）を 50ml Falcon チューブに混和して、37°C 40 分インキュベーターでシェイクすることで細胞を分散振盪した。次に酵素処理した組織をガーゼで濾過し、細胞を単離した（マスト細胞の純度は約 5%）。マスト細胞の純度を上げるために、単離された細胞に、FBS とペニシリン/ストレプトマイシン（100 units/ml）を添加した。IMDM に再浮遊させた後、22.5% HistoDenz 溶液と LSM を用いて遠心した。滑膜マスト細胞を含む単核球分画は、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。マスト細胞の純度は $43 \pm 4\%$ （OA 患者の 9 検体の平均 ± 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）。回収された滑膜マスト細胞を含む単核球分画は、BSA、ヒトリコンビナント SCF (100 ng/ml)、およびヒトリコンビナント IL-6 (50 ng/ml) 含んだ IMDM で 24-48 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を含む細胞分画

とした。

分離直後の滑膜マスト細胞を含む細胞分画を無血清メチルセルロース培地にヒトリコンビナント SCF (200 ng/ml) とヒトリコンビナント IL-6 (50ng/ml) を添加した IMDM で培養した(55)。42 日目には無血清メチルセルロース培地をリン酸緩衝液 (PBS) で溶解し、0.1% BSA、ヒトリコンビナント SCF (100 ng/ml)、ヒトリコンビナント IL-6 (50 ng/ml) を含有した IMDM (以下、MC 培地) に再浮遊させ培養を継続したが、培養開始 10 週後にはキムラ染色陽性細胞の割合は約 98% となった。10 週後の培養細胞における、トリプターゼおよびキマーゼの発現は 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。このことは培養細胞がマスト細胞であることを示している。また 1g の滑膜組織から約 19×10⁵ 個の培養滑膜マスト細胞が得られた(53)。マスト細胞の純度の測定にはキムラ染色を用いた。キムラ染色はサポニン含有したトルイジンブルー染色液である。

3. 凝集 IgG の精製

凝集 IgG はヒト IgG からマイクロチューブヒーターを用いて 63°C で 1 時間加熱することで得られた(56)。10,000g で 30 分遠心することで大きな凝集物を沈殿除去した上清を回収した。上清中の凝集 IgG を実験に使用した。

4. ヒト滑膜マスト細胞の活性化

滑膜マスト細胞 (2.0×10⁴/ml に調整) は HEPES 緩衝液もしくは MC 培地に浮遊させた。ヒスタミン遊離量の測定や PGD₂ 産生量の測定実験では、IL-33 (3, 10 および 30 ng/ml)、CRA-1 (0.3 µg/ml)、単量体 IgG (1.0 µg/ml) あるいは凝集 IgG (1.0 µg/ml) を滑膜マスト細胞に添加し

37°Cで30分間刺激した。細胞上清中のヒスタミン遊離量およびPGD₂産生量、及び細胞内のヒスタミン量をEIAで測定した。

サイトカインアッセーでは滑膜マスト細胞 (2.0×10⁶/mlに調整)にCRA-1 (0.3 µg/ml)、単量体IgG (1.0 µg/ml)あるいは凝集IgG (1.0 µg/ml)を添加し、また同時にIL-33 (10, 30 ng/ml)で添加し、37°Cで6時間刺激した。細胞上清中のIL-8産生量およびTNF-産生量をELISAで測定した。

5. メディエーターアッセー

ヒスタミンの測定には酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA) kit (MBL Co., Ltd., Nagano, Japan)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 BD Bioscience社 (San Jose, CA, USA)、R&D System社 (Minneapolis, MN, USA)を用いた。

6. フローサイトメトリー

ヒト滑膜マスト細胞における、細胞表面のタンパク質の発現を調べるために、フローサイトメーターで解析を行った。FcRのブロッキングのためヒトTruStain FcX™にて4°C、15分反応させた後、ビオチン標識抗FcεRIα抗体及び抗ST2抗体と細胞を暗所、4°Cで30分間インキュベートした。その後、PBSで2回洗浄した。次に、蛍光色素PE-streptavidinと共に4°C、30分間反応させた後、FcεRIαとST2のマスト細胞表面上の発現をFACSscan (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)で検出し、FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA)で解析した。

7. 凍結スライド標本の作製

採取した関節滑膜組織を固定液として 10%ホルマリンを使用し、4°Cで 24 時間固定液に浸漬した。固定を行った後は、固定液の洗浄・置換操作のため PBS で 3 回洗浄後、10%スクロース含有 PBS に 4°Cで 4 時間浸漬した後、15%スクロース含有 PBS に 4°Cで 4 時間浸漬した。そして最後に、20%スクロース含有 PBS に 4°Cで一晩浸漬した。OCT コンパウンドで包んで凍結させた。液体窒素で瞬間凍結された後、クライ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。クライオスタットを用いて約-20°Cの低温度下でミクロトームにより 10 μm の薄切し、スライドガラスに貼り付けた。作成したスライドは解凍時の霜の付着を防ぐためにプラスチックケースに入れ、その上からラミネートフィルムに入れて封をした。-20°Cで保存し、使用時は室温で徐々に解凍してから、スライドを取り出した。

8. 免疫組織染色法

前述したクライオスタットを用いて作成したスライドを使用した。1%PBS を洗浄液として使用した。スライドは室温で解凍した後、5 分間の洗浄を洗浄液で 3 回施行し、細胞内染色のために-20°Cのアセトンで 5 分間固定をした。5 分間の洗浄を 3 回施行し、2%スキムミルクを用いて室温で 1 時間非特異的結合をブロッキングした。マスト細胞はアレクサ 488 標識抗トリプターゼ抗体 (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および、ビオチン標識抗ヒト ST2 抗体 (2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で添加し氷を入れたケースの中で暗所、30 分染色した。そして、3 回洗浄した後に streptavidin-Cy3 とともに室温で 1 時間染色することで、ST2 陽性細胞を可視化した。5 分間の洗浄を 3 回施行し、DAPI を半適ほど滴下し、カバー

ガラスを重ねた。共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

9. 統計処理

2群間の有意差はウィルコクソン・マン・ホイットニー検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差があるものとした。

結果

1. 培養滑膜マスト細胞表面上の IL-33 の受容体 ST2 の発現

OA 患者および RA 患者の培養滑膜マスト細胞に FcεRI が発現しているかを、フローサイトメーターを用いて確認した(図 4A)。このことは、その細胞がマスト細胞であることを示している。平均蛍光強度比 (mean fluorescence intensity ratio; MFI) は OA 患者の培養滑膜マスト細胞で 4.0 ± 1.0 であり、RA 患者の培養滑膜マスト細胞では 5.7 ± 2.1 であった(図 4B)。

抗ヒト ST2 抗体を使用しフローサイトメーターにて、両者の細胞表面上に ST2 が発現していることを確認した(図 4A)。培養滑膜マスト細胞表面上の ST2 の発現は OA と RA 患者間に有意差を認めなかった。OA 患者の培養滑膜マスト細胞では MFI ratio が 1.5 ± 0.1 であり、RA 患者の培養滑膜マスト細胞では 1.3 ± 0.1 であった。FcεRI および ST2 の発現の強度は RA、OA 間に有意差を認めなかった(図 4B)。

2. RA 患者の関節滑膜組織のマスト細胞における ST2 の発現

RA 患者の関節滑膜組織を用いて、免疫組織染色法によって、トリプターゼ陽性のマスト細胞に ST2 が発現していることを示した(図 5, 白矢印)。RA 患者の関節滑膜組織のマスト細胞における ST2 の発現を認めた。RA 患者 1 症例の関節滑膜組織ではトリプターゼ陽性細胞中の ST2 陽性細胞の割合は 12.7% であった。また OA 患者 1 症例の関節滑膜組織ではトリプターゼ陽性細胞中の ST2 陽性

細胞の割合は 10.3%であった。

3. IL-33 単独刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-8 と TNF- α の産生

培養滑膜マスト細胞表面上に ST2 の発現を認めたのでその ST2 が機能を有するか検証するために、IL-33 単独刺激によって IL-8 と TNF- α が産生されるかを検討した。

RA、OA 患者由来の培養滑膜マスト細胞に IL-33 (3, 10 および 30 ng/ml)を添加し 37°Cで 6 時間刺激した。刺激後、上清中の IL-8 と TNF- α 量を測定した。IL-8 と TNF- α は共に 30 ng/ml の IL-33 刺激で IL-33 無添加群と比較して有意な産生量の増加を認め ($p < 0.05$)。しかし、OA、RA 間で IL-8 と TNF- α 産生量に有意差を認めなかった(図 6)。

4. Fc ϵ RI および Fc γ RI 架橋刺激による脱顆粒反応における IL-33 の影響

Fc ϵ RI および Fc γ RI 架橋刺激による培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応における IL-33 による影響を抗 Fc ϵ RI 抗体 (CRA-1)と凝集 IgG 刺激を用いて検討した(図 7)。

培養滑膜マスト細胞に IL-33 (10, 30 ng/ml)、CRA-1 (0.3 μ g/ml)、単量体 IgG (1.0 μ g/ml) あるいは凝集 IgG (1.0 μ g/ml)を添加し、37°C、30 分刺激後の上清中および細胞内のヒスタミン量を測定した。抗 Fc ϵ RI 抗体と凝集 IgG 刺激によって有意なヒスタミン遊離を認めた ($p < 0.05$)。しかし、IL-33 単独刺激ではヒスタミンは遊離されず、また IL-33 は CRA-1 あるいは凝集 IgG 刺激によるヒスタミン遊離量には有意な影響を認めなかった(図 7)。

5 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からのサイトカイン産生における IL-33 の影響。

FcγRI を介したサイトカイン産生における IL-33 の影響について検討した。IL-33 を 10 および 30 ng/ml の濃度で凝集 IgG (1.0 μg/ml) と同時に添加し、IL-8 と TNF-α の産生について検討した(図 8)。IL-33 (30 ng/ml) 単独刺激においても少量の IL-8 (750 pg/10⁶MCs) と TNF-α (25 pg/10⁶MCs) が産生された。凝集 IgG 刺激は単量体 IgG 刺激と比較して有意な IL-8 と TNF-α の産生を惹起した ($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$)。IL-33 (30 ng/ml) は凝集 IgG 刺激による IL-8 と TNF-α の産生を相乗的に増加させた ($p < 0.05$)。

考察

培養滑膜マスト細胞は、細胞表面上に ST2 を発現していることを示した。関節滑膜組織のマスト細胞においても ST2 が発現していた。しかし、培養滑膜マスト細胞の ST2 発現レベルは RA 患者と OA 患者では同等であった(図 4)。

培養滑膜マスト細胞は、IL-33 の単独刺激ではヒスタミンの脱顆粒反応は誘導されないが、IL-33 (30 ng/ml)では IL-8 および TNF- α 産生を惹起した(図 6)。この作用はすでにヒト臍帯血マスト細胞で報告されており(54)、図 3 で示した通り ST2 を介する刺激が NF κ B の活性化を惹起することよりサイトカイン産生を誘導されたと考える。しかし、脱顆粒に必須の Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-カルシウムの増加-プロテインキナーゼ C の活性化の経路は活性化されないため脱顆粒を惹起されないと考えられる(図 9)。培養滑膜マスト細胞は抗 Fc ϵ RI 抗体および凝集 IgG 刺激によって有意なヒスタミン遊離を認めた(図 7)。しかし、培養滑膜マスト細胞は IL-33 の添加によって抗 Fc ϵ RI 抗体および凝集 IgG 刺激によるヒスタミン遊離量には有意な影響を認めなかった(図 7)。これも脱顆粒に必須のシグナル伝達経路が IL-33 によって誘導されないためと考えられる。また、培養滑膜マスト細胞において凝集 IgG 刺激は単量体 IgG 刺激と比較して有意に多量の IL-8 と TNF- α の産生を惹起した(図 8)。加えて、培養滑膜マスト細胞において IL-33 (30 ng/ml)は凝集 IgG 刺激による IL-8 と TNF- α の産生を相乗的に増加させた(図 8)。関節液中の IL-33 濃度は OA 患者では 424.8 ± 40.5 pg/ml であり、これと比較して RA 患者では 2235.8 ± 5035.4 pg/ml と有意に高値と報告されている(28)。したがって、IL-33 は主に滑膜線維芽細胞より産生されていることより、RA 患者の滑膜組織局所では IL-33 の濃度は

さらに高いことが予想され、*in vitro* の実験で用いた濃度まで上昇している可能性はあると考える。本研究では RA 患者由来と OA 患者由来のマスト細胞から IL-33 によるサイトカイン産生能と ST2 発現強度において違いはなかった。しかし、RA 患者と OA 患者の関節滑液中の濃度の報告 (28) からも示唆されるように微小環境ではマスト細胞周囲の IL-33 濃度が RA で優位に高くなっているために、RA 患者のマスト細胞には IL-33 の影響が及び、一方 OA 患者のマスト細胞では IL-33 の影響が少ないと考える。

本研究では、培養滑膜マスト細胞における ST2 の分子間のシグナル経路と凝集 IgG 刺激によるサイトカインの産生経路については検討していない。IL-33 の受容体は ST2 (IL-33R α 鎖) とシグナル伝達に参与する IL-1RAcP (IL-33 β 鎖) から構成される。IL-33 が ST2 と結合すると細胞内アダプター分子である MyD88、IRAK1、IRAK4、TRAF6 を介して NF- κ B 経路と p38-mytogen-activated protein kinase (MAPK) 経路が活性化され、シグナルは細胞核内に伝達される。MyD88 は ST2 のアダプター分子であり、ST2 の凝集により IRAK1、IRAK4、TRAF6 を修飾させ、inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase (IKK) 依存性 nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α) のリン酸化を介してその刺激は NF- κ B の活性化に至る。一方、Fc ϵ RI の架橋刺激は活性化 T 細胞核因子 Nuclear Factor of Activated T cell (NFAT) 活性化のシグナルと transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) にも作用し、p38-MAPK と c-Jun N-terminal kinase (JNK) をリン酸化させる。そのシグナルは核内の activating transcription factor-2 (ATF-2) の経路と c-Jun と NFAT の経路により炎症性サイトカイン産生のシグナルが伝達される (57) (図 9)。IL-33 のシグナルと

FcR γ を介するシグナルはTAK1やPL3Kを介したCa²⁺経路や核内における activator protein 1 (AP-1) と NFAT の経路でシグナルリンクし相乗的なサイトカイン産生を起こすと報告されている(57)。IL-33 刺激単独では Ca²⁺ 動員や NFAT 活性化のシグナルは惹起できない(57)。

ヒトマスト細胞が Fc ϵ RI 刺激と同様に Fc γ RI 刺激においても Fc ϵ RI γ 鎖を介して活性化シグナルを伝達するので同様のシグナル経路を介して IL-33 と凝集 IgG はサイトカイン産生を相乗的に増加したと考える(52)。

可溶性の分泌型 sST2 はデコイ受容体として IL-33 と結合して、細胞表面上の ST2 と IL-33 の結合を阻害する(16.17)。さらに IL-33 のシグナル経路のアダプター分子ある MyD-88 をロックアウトしたマウス末梢血単核球では IL-33 による刺激において IL-6 と IL-13 が産生低下している(57)。これらの報告は、IL-33 の経路を阻害することにより炎症性サイトカインの産生が抑制されることを示唆する。免疫複合体による滑膜マスト細胞からの IL-8 及び TNF- α の産生を減弱させるため IL-33/ST2 を標的とした新たな治療薬の開発が期待される。また、IL-33/ST2 経路の阻害は脱顆粒反応を抑制しないため、正常な即時型アレルギー反応には影響を与えない点は寄生虫や真菌に対する防御反応を抑制しないと考えられる。また、ヒスタミン遊離による血管のトーンスの調整などのホメオスターシスに関与する機能も抑制しないと考えられる。しかしながら、IL-33 は抗ウイルス作用を弱める作用があることが報告されている(58)。ヒトパピローマウイルス感染による子宮頸がんを発症した患者の子宮頸部では IL-33 の mRNA と蛋白の低下が報告されており(58)、IL-33 を単純に阻害することは副作用のリスクもあると考えられる。

Lee らはすでに凝集 IgG が Fc γ RI と Fc γ RIIA を介して

マスト細胞を活性化させることを報告した(53)。本研究で用いている培養滑膜マスト細胞では FcγRI と FcγRIIA の両者が発現しているが、滑膜組織のマスト細胞は FcγRIIB の発現が高く、FcγRII からの刺激は入りにくい(53)。したがって、FcγRI、FcγRIIA および FcγRIIB の発現の比率で免疫複合体刺激によってどれだけ TNF-α が産生されるかが決まるため、RA および OA において FcγRIIA と FcγRIIB の発現の差を今後検討していく予定である。

本研究では免疫複合体刺激による滑膜マスト細胞からの TNF-α や IL-8 の産生を IL-33 は相乗的に増加させることにより RA 患者における関節組織の炎症反応を増悪させていることが示唆された。

まとめ

本研究では、RA 患者および OA 患者由来の培養滑膜マスト細胞の IL-33 産生能と ST2 発現強度において違いは示されなかったが、RA 患者と OA 患者の関節滑液中の濃度の報告 (28) から示唆されるように微小環境ではマスト細胞周囲の IL-33 濃度が RA で優位に高くなっているために、RA 患者のマスト細胞には IL-33 の影響が及び、一方 OA 患者のマスト細胞では IL-33 の影響が少ないと考える。RA 患者および OA 患者由来の関節滑膜マスト細胞が IL-33 の受容体である ST2 を発現していることを示した。IL-33 単独刺激で TNF- α と IL-8 が培養滑膜マスト細胞より産生され、免疫複合体と IL-33 の共刺激により滑膜マスト細胞は相乗的に TNF- α と IL-8 を局所に産生することから、関節リウマチの病態形成や症状の増悪に関与することが示唆された。

謝辞

本研究は日本大学医学部総合医学研究所免疫・アレルギー学グループ(岡山吉道准教授)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日本大学医学部総合医学研究所免疫・アレルギー学グループ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坂本-佐々木朋美氏に深謝いたします。

本研究の御指導を賜りました日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、徳橋泰明教授、日本大学医学部病態病理学系微生物学分野、羅智靖客員教授に深謝いたします。

表

表 1 IL-33/ST-2 に対する処置と影響

IL-33/ST-2処置	誘導した 関節炎	影響	論文
IL-33投与	K/BxN 関節炎	関節炎症状の増悪 TNF- α 、IL-1 β とIgG1、IgG2b産生の増加	Xu D et al 2010
IL-33 ノックアウト マウス	K/BxN 関節炎	関節炎症状は改善しない	Kamradt T et al 2013 Martin P et al 2013
分泌型ST2処置	CIA	関節炎症状の改善	Leung et al 2004
ST2 ノックアウト マウス	CIA	関節炎症状の改善 IL-17、IFN- γ 、TNF- α 産生の低下 抗コラーゲン抗体産生の低下	Xu Dら 2010
抗ST2阻止抗体 処置	CIA	関節炎症状の改善 所属リンパ節の IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-17産生の低下	Palmer Gら 2009

図

図 1. RA におけるサイトカイン産生と病変形成

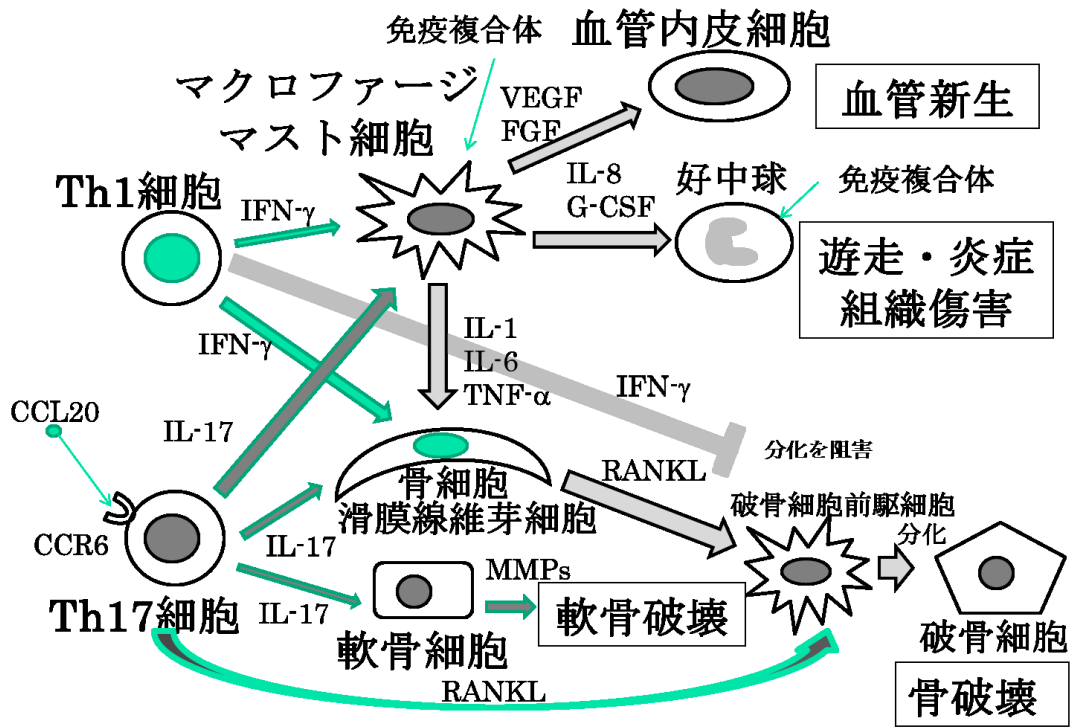
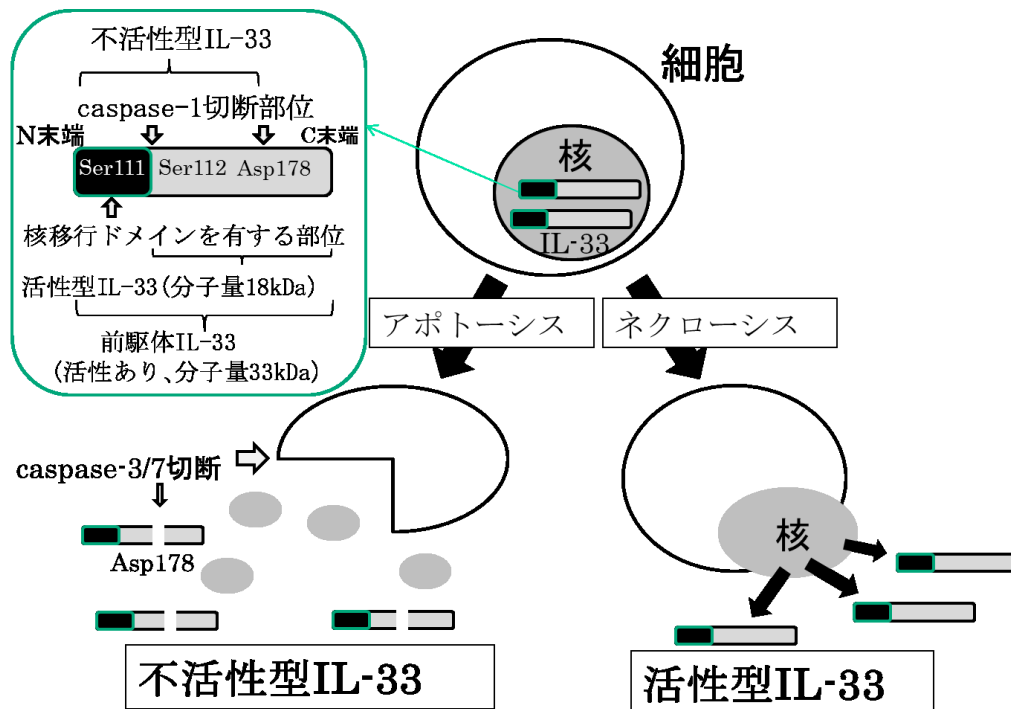
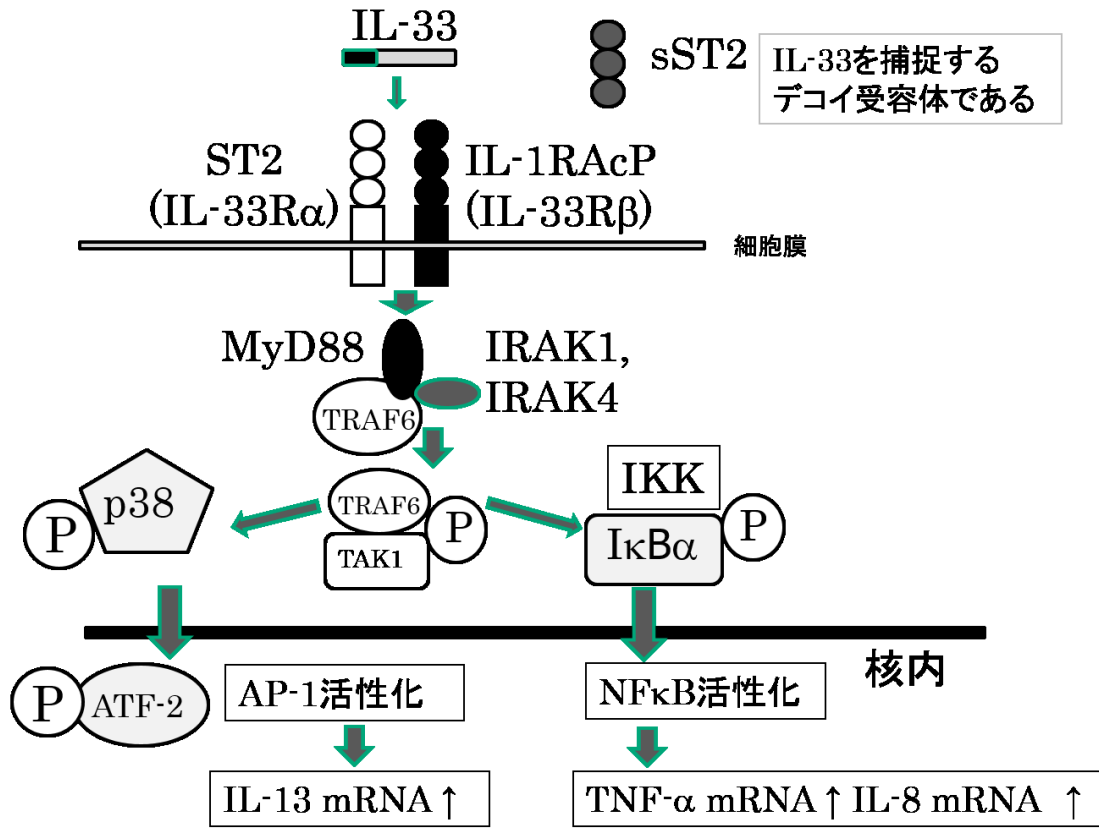


図 2. IL-33 の産生機構の模式図



Lüthi AU et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009 より改変

図 3. IL-33 の細胞内シグナル伝達



安田好文、中西憲司 IL-33と好酸球、マスト細胞 炎症と免疫 vol118 no.6 2010 より改変

図 4. 培養滑膜マスト細胞表面上の ST2 発現

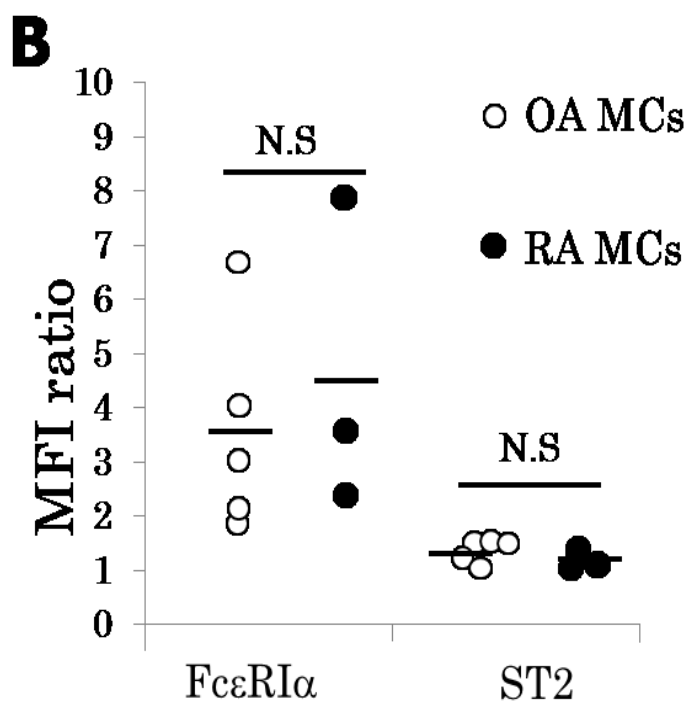
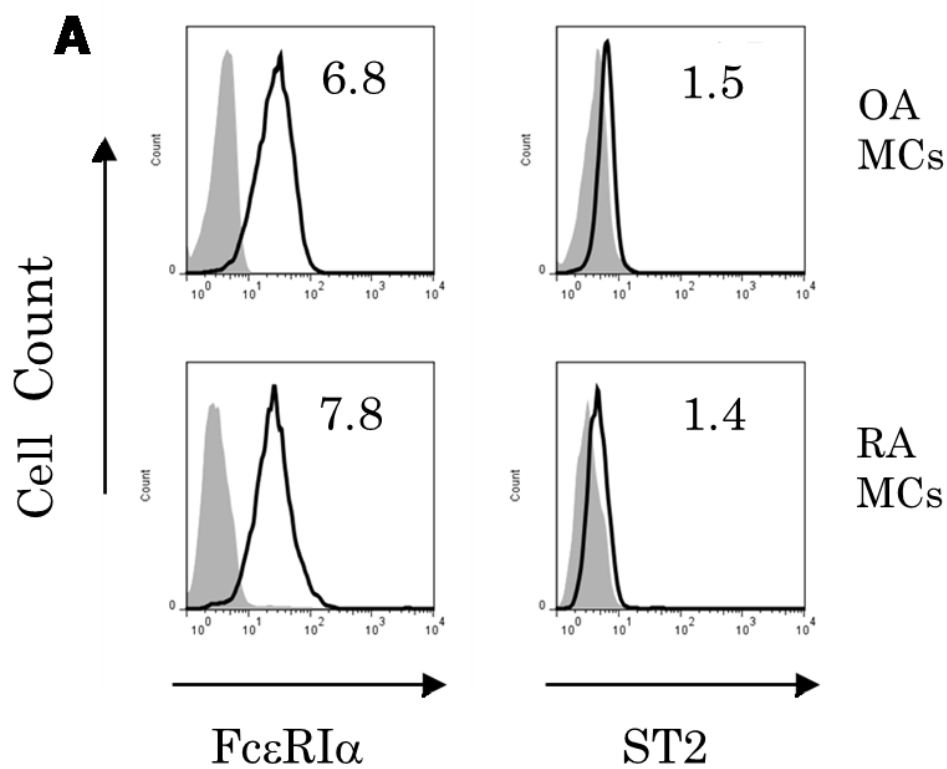


図 5. RA 患者の関節滑膜組織のマスト細胞における ST2 発現

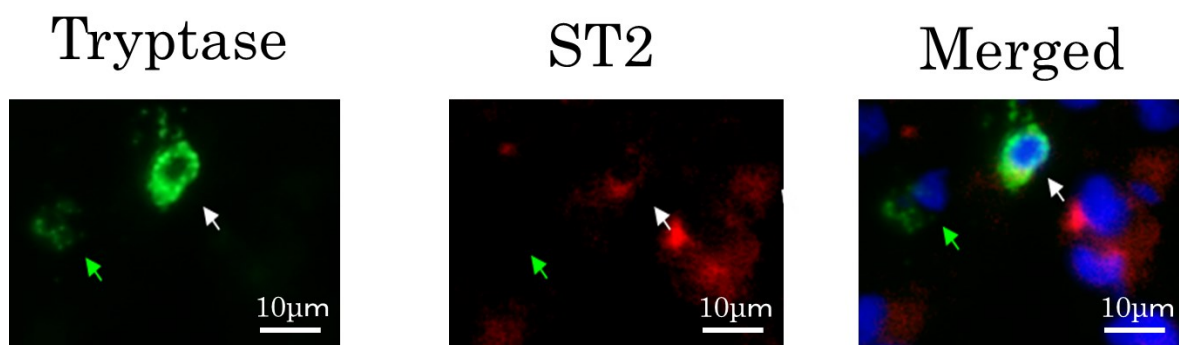


図 6. 培養滑膜マスト細胞における IL-33 依存性のサイトカイン産生

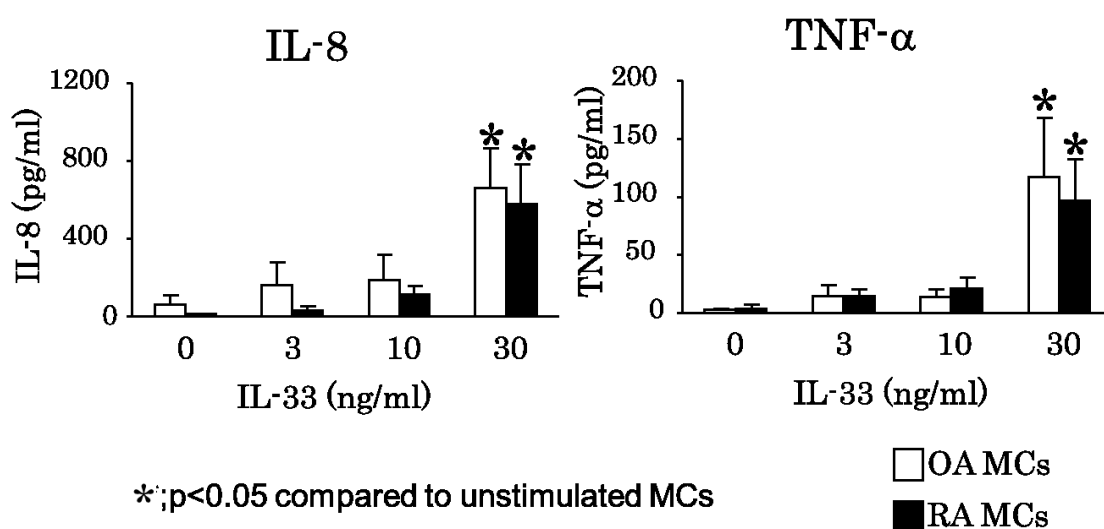
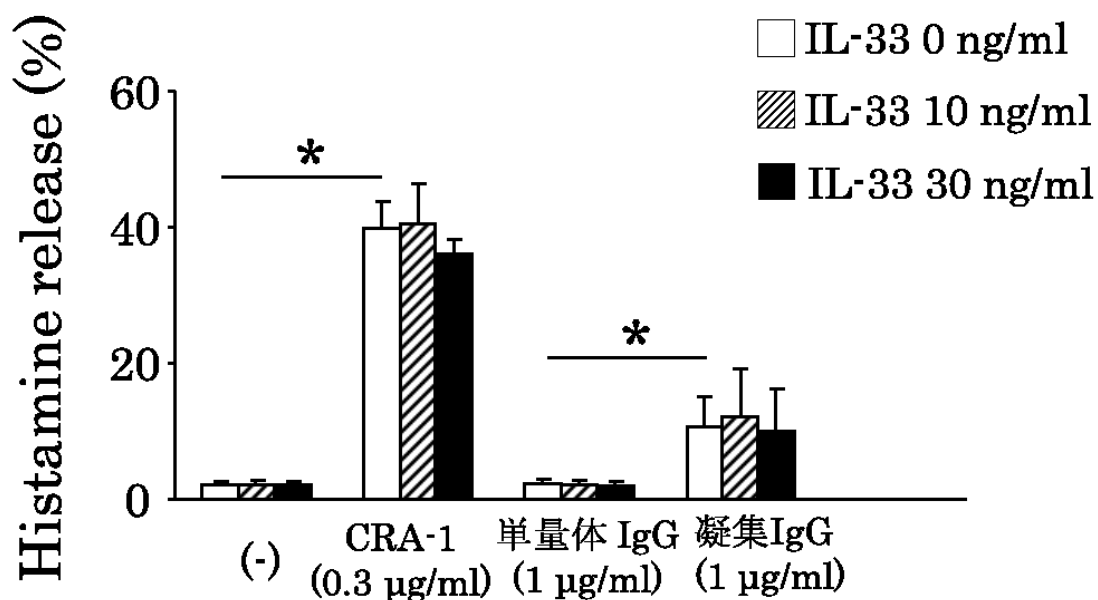
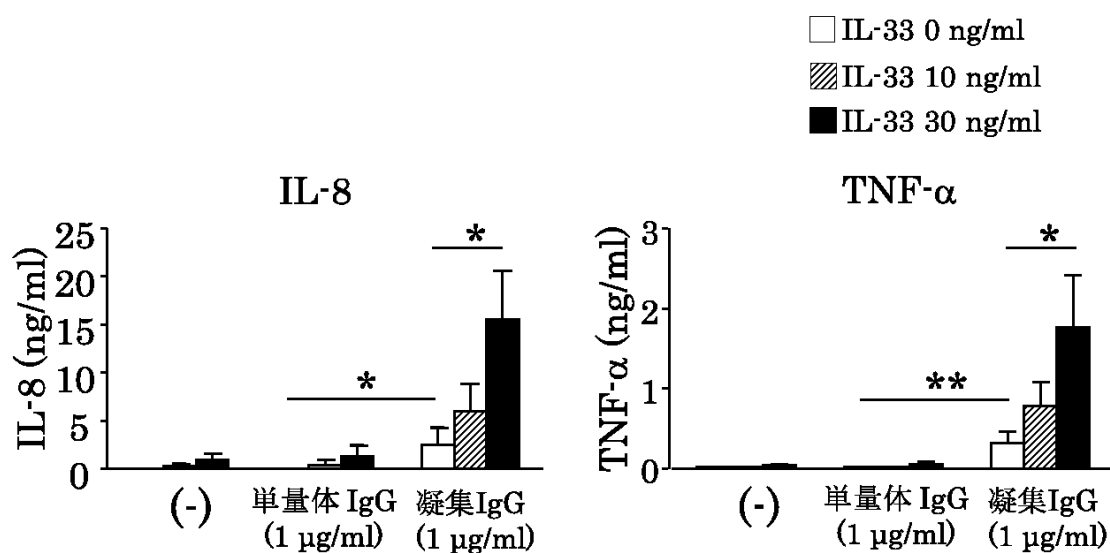


図 7. FcεRI および FcγRI 架橋刺激によるヒト培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応における IL-33 の影響



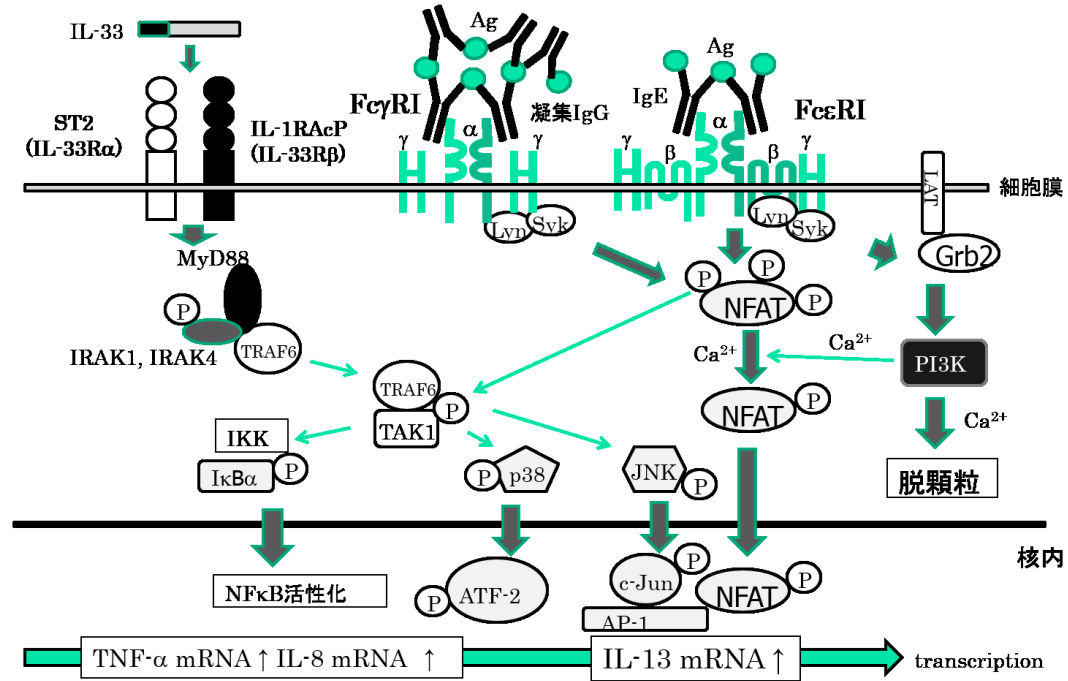
*; p<0.05

図 8. 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からのサイトカイン産生における IL-33 の影響



*; p<0.05, **; p<0.01

図 9. IL-33 と FcεRI の架橋刺激のクロストーク



Andrade MV. et al . Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. 2011 より改変

図説

図 1. RA におけるサイトカイン産生と病変形成

RA の関節局所で骨破壊の病態には、活性化された T 細胞、主に Th1 細胞及び Th17 細胞が炎症シグナルを滑膜に伝達することが重要となる。

Th1 細胞は Interferon- γ (IFN- γ) を産生してマスト細胞やマクロファージおよび滑膜線維芽細胞を活性化する。これらの細胞から産生される VEGF、FGF、IL-8、G-CSF、IL-1、IL-6、TNF- α により血管新生、好中球の遊走と炎症、組織傷害が起こる。一方、Th17 細胞は CCR6 を発現しており滑膜細胞から産生するケモカイン CCL20 によって滑膜へ動員される。Th17 細胞が IL-17 を産生し、マクロファージや滑膜線維芽細胞を活性化する。IL-17 の作用を受けた骨細胞や滑膜線維芽細胞は基質分解酵素 MMP を分泌しプロテオグリカンやコラーゲン線維を破壊し軟骨を傷害する。また、IL-17 によって滑膜線維芽細胞の RANKL の発現を上昇させ、Th17 細胞も RANKL を発現する。また、滑膜線維芽細胞分化を促進する炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、TNF- α の産生を増加させる。滑膜線維芽細胞の増殖は、肉芽(パンヌス)の形成をもたらす。肉芽の増大は組織の循環障害や栄養障害をもたらす。滑膜線維芽細胞および骨細胞から RANKL が破骨細胞前駆細胞に作用すると破骨細胞の分化を誘導する。

Th17: T helper 17

IFN- γ : Interferon- γ

VEGF: vascular endothelial growth factor

FGF: fibroblast growth factor

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor

IL-8: Interleukin-8
CCR6: C-C chemokine receptor 6
CCL20: Chemokine (C-C motif) ligand 20
RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B
ligand
M-CSF: macrophage colony-stimulating factor
MMPs: matrix metalloproteinases

図 2. IL-33 の産生機構の模式図

IL-33 は N 末端に核移行シグナル、C 末端には IL-1 様サイトカインドメインより構成されている。核内に存在する IL-33 は、ネクローシスでは生理活性を有する活性型 IL-33 として分子量 33kDa の全長のまま細胞外へ放出される。一方、アポトーシスでは IL-33 は caspase-3 と caspase-7 によって IL-1 様サイトカインドメインが分断され、不活性型 IL-33 となる。

図 3. IL-33 の細胞内シグナル伝達

IL-33 の受容体は ST2 (IL-33R α 鎖) とシグナル伝達に参与する IL-1RAcP (IL-33 β 鎖) から構成される。IL-33 が ST2 と結合すると細胞内アダプター分子である MyD88、IRAK1、IRAK4、TRAF6 を介して NF- κ B 経路と MAPK 経路が活性化される。また sST2 はデコイ受容体として IL-33 と結合して、細胞膜上の ST2 と IL-33 の結合を阻害する。

IL-1RAcP: interleukin-1 receptor accessory protein
sST2: soluble ST2
MyD88: myeloid differentiation factor 88
IRAK: IL-1R-associated kinase

TRAF6: TNF receptor associated factor 6

MAPK: mitogen-activated protein kinase

AP-1: activator protein 1

IKK: inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

図 4. 培養滑膜マスト細胞表面上の ST2 発現

図 A. 上段は OA 患者の培養滑膜マスト細胞(OA MCs)、下段は RA 患者の培養滑膜マスト細胞(RA MCs)の細胞表面における Fc ϵ RI と ST2 の発現を、フローサイトメーターを用いて確認した。培養滑膜マスト細胞に Fc ϵ RI が発現していることは、その細胞がマスト細胞であることを示している。灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロールである。右上の数値はアイソタイプコントロールの発現蛍光強度と Fc ϵ RI または ST2 の発現蛍光強度の比である。平均蛍光強度比 (mean fluorescence intensity ratio; MFI)を示している。OA 患者 1 症例と RA 患者 1 症例の代表的なヒストグラムを示した。

図 B. 培養滑膜マスト細胞表面上の Fc ϵ RI と ST2 の発現を MFI ratio で散布図で示す。5 人の OA 患者と 3 人の RA 患者の培養滑膜マスト細胞を用いた。白丸が OA で黒丸が RA を示し、有意差を認めなかった。N.S は有意差なしを示す。

図 5. RA 患者の関節滑膜組織のマスト細胞における ST2 発現

RA 患者 1 症例の関節滑膜組織を用いて、免疫組織化学染色法によって、トリプターゼ陽性のマスト細胞に ST2 が発現していること調べるために抗トリプターゼ抗体と抗 ST2 抗体で 2 重染色を行った。緑色はトリプターゼ、

赤色は ST2、青色は核を示す。トリプターゼと ST2 が merge された細胞は黄色になる。白の矢印は ST2 陽性の滑膜マスト細胞、緑色の矢印は ST2 陰性の滑膜マスト細胞をそれぞれ示している。

図 6. 培養滑膜マスト細胞における IL-33 依存性のサイトカイン産生

OA 患者由来の培養滑膜マスト細胞(白色のバー)と RA 患者由来の培養滑膜マスト細胞(黒色のバー)に IL-33 (3, 10 および 30 ng/ml)を添加し 37°C で 6 時間刺激した。刺激後、上清中の IL-8 と TNF- α 量を ELISA 法で測定した。* は IL-8 と TNF- α は共に 30 ng/ml の IL-33 刺激で IL-33 無添加群と比較して有意な産生量の増加を認めた (* ; p < 0.05) 。しかし、OA、RA 間で IL-8 と TNF- α 産生量に有意差を認めなかった。エラーバーは、平均値±標準誤差を示す。OA 患者 7 症例、RA 患者 4 症例の培養滑膜マスト細胞を用いて OA は 7 実験、RA は 4 実験を独立した ELISA の 3 アッセーにて施行した。

図 7. Fc ϵ RI および Fc γ RI 架橋刺激によるヒト培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応における IL-33 の影響

培養滑膜細胞に抗 Fc ϵ RI 抗体 (CRA-1, 0.3 μ g/ml)、単量体 IgG (mono IgG, 1.0 μ g/ml) あるいは凝集 IgG (agg IgG, 1.0 μ g/ml)を添加し 30 分刺激した。IL-33 (0 ng/ml, 白色のバー) で、IL-33 (10 ng/ml, 斜線のバー)、IL-33 (30 ng/ml, 黒色のバー) を示す。ヒスタミン遊離量は EIA を用いて測定した。抗 Fc ϵ RI 抗体は刺激有無で比較し、凝集 IgG 刺激は単量体 IgG 刺激と比較し有意差 p < 0.05 を認めた。IL-33 の添加によるヒスタミン遊離量には有

意な影響を認めなかった。*は $p < 0.05$ の有意差を認めたことを示す。エラーバーは、平均値±標準誤差を示す。OA 患者 3 症例の培養滑膜マスト細胞を用いて、3 実験施行した。

図 8 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からのサイトカイン産生における IL-33 の影響

凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-8 と TNF- α の産生における IL-33 同時添加の影響を検討した。0 ng/ml IL-33 は白いバーで、10ng/ml IL-33 は斜線のバーで、30ng/ml IL-33 は黒いバーで示す。IL-33 と単量体 IgG あるいは凝集 IgG を滑膜マスト細胞に同時添加 24 時間後の細胞上清中の IL-8 と TNF- α を ELISA にて測定した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の有意差を認めたことを示す。エラーバーは、平均値±標準誤差を示す。OA 患者 6 症例の培養滑膜マスト細胞を用いて 6 実験を独立した ELISA の 4 アッセーにて施行した。

図 9. IL-33 と Fc ϵ RI の架橋刺激のクロストーク

IL-33 が細胞表面上の ST2 と IL-1RAcP 結合すると細胞内アダプター分子である MyD88、IRAK1、IRAK4、TRAF6 を介して IKK 依存性に I κ B α をリン酸化して NF- κ B 活性化の経路と TRAF6 から TAK1 のリン酸化を介する p38-MAPK 経路が活性化されシグナルは細胞核内に伝達される。一方、Fc ϵ RI の架橋刺激は PI3K を介したカルシウムの動員で NFAT 活性化のシグナルと TAK1 をリン酸化作用し、p38-MAPK と JNK をもリン酸化させる。そのシグナルは核内の ATF-2 の経路と c-Jun と NFAT の経路により炎症性サイトカイン産生のシグナルが転写さ

れる(57)。IL-33 のシグナルと FcεRI γ 鎖を介するシグナルはTAK1や PL3K を介した Ca²⁺経路や核内における AP-1 と NFAT の経路でシグナルリンクし相乗的なサイトカイン産生を起こしている(59)。しかし、IL-33 刺激単独では Ca²⁺動員や NFAT 活性化のシグナルは惹起できない(57)。FcεRI 刺激と同様に Fc γ RI 刺激においても FcεRI γ 鎖を介して活性化シグナルを伝達する(59)ので同様のシグナル経路を介していることが考えられる。

IL-1RAcP: interleukin-1 receptor accessory protein

MyD88: myeloid differentiation factor 88

IRAK: IL-1R-associated kinase

TRAF6: TNF receptor associated factor 6

TAK1: Transforming growth factor β (TGF- β)-activated kinase 1

IKK: inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase

I κ B α : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

MAPK: mitogen-activated protein kinase

Pl3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

ATF-2: activating transcription factor-2

JNK: c-Jun N-terminal kinase

AP-1: activator protein 1

Syk: Spleen tyrosine kinase

Lyn: Lck/Yes novel (tyrosine kinase)

LAT: Linker for activation of T-cells

Grb2: growth factor receptor-bound protein 2

引用文献

1. Firestein GS: Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-61.
2. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011; 11;17(10): 1231-4. doi: 10.1038/nm.2452.
3. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, Combe B, Cutolo M, de Wit M, Dougados M, Emery P, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Haraoui B, Kalden J, Keystone EC, Kvien TK, McInnes I, Martin-Mola E, Montecucco C, Schoels M, van der Heijde D; T2T Expert Committee. : Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(4): 631-7.
4. Emery P, Breedveld FC, Hall S, Durez P, Chang DJ, Robertson D, Singh A, Pedersen RD, Koenig AS, Freundlich B: Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis(COMET): a randomized, double-blind parallel treatment trial. *Lancet* 2008; 372: 375-82.
5. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, Sharp J,

Perez JL, Spencer-Green GT: The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 26-37.

6. Kyo F, Futani H, Matsui K, Terada M, Adachi K, Nagata K, Sano H, Tateishi H, Tsutsui H, Nakanishi K: Endogenous interleukin-6, but not tumor necrosis factor alpha, contributes to the development of toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88-mediated acute arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2530-40.
7. Matsui K, Boiface JJ, Reay PA, Schild H, Fazekas de St Groth B, Davis MM: Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 1991; 254: 1788-91.
8. Moreland LW, Alten R, Van den Bosch F, Appelboom T, Leon M, Emery P, Cohen S, Luggen M, Shergy W, Nuamah I, Becker JC: Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot dose-finding. Double-blind placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1470-9.
9. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J,

- Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA: IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005; 23: 479-90.
10. Cayrol C, Girard JP: The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(22): 9021-6.
 11. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ: Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 2009; 31(1): 84-98.
 12. Ali S, Nguyen DQ, Falk W, Martin MU: Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 15; 391 (3): 1512-6.
 13. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, Katashima R, Itakura M, Tominaga S: Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem* 1999; 264(2): 397-406.
 14. Tominaga S: Murine mRNA for the beta-subunit of integrin is increased in BALB/c-3T3 cells entering the G1 phase from the G0 state. *FEBS Lett* 1988;

- 238(2): 315-9.
15. Wang JX, Kaieda S, Ameri S, Fishgal N, Dwyer D, Dellinger A, Kepley CL, Gurish MF, Nigrovic PA: IL-33/ST2 axis promotes mast cell survival via BCLXL. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 15; 111(28): 10281-6.
 16. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA: IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol.* 2007; 179(4): 2551-5.
 17. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB: Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family *Nat Rev Immunol.*2010;10(2):103-10.
 18. 安田好文、中西憲司: IL-33 と好酸球、マスト細胞炎症と免疫 2010; 18(6): 82-7
 19. Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, Hoshino T, Fujimoto J, Nakanishi K: Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 2008; 20(6): 791-800.
 20. Monach PA, Mathis D, Benoist C: The K/BxN arthritis model. *Curr Protoc Immunol* 2008; Chapter 15: Unit 15.22. doi: 10.1002/0471142735.im1522s81.
 21. Xu D, Jiang HR, Li Y, Pushparaj PN, Kurowska-Stolarska M, Leung BP, Mu R, Tay HK, McKenzie AN, McInnes IB, Melendez AJ, Liew FY: IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J*

- Immunol 2010; 184: 2620-26.
22. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, Finckh A, Smith DE, Gabay C: Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 738-49.
 23. Kunisch E, Chakilam S, Gandesiri M, Kinne RW: IL-33 regulates TNF- α dependent effects in synovial fibroblasts. *Int J Mol Med* 2012; 29: 530-40.
 24. Kamradt T, Drube S: A complicated liaison: IL-33 and IL-33R in arthritis pathogenesis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(3): 115. doi:10.1186/ar4209
 25. Martin P, Talabot-Ayer D, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, Finckh A, Smith DE, Gabay C, Palmer G: Disease severity in K/BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(1): R13. doi: 10.1186/ar4143.
 26. Hayakawa M, Hayakawa H, Matsuyama Y, Tamemoto H, Okazaki H, Tominaga S: Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387: 218-22
 27. Leung BP, Xu D, Culshaw S, McInnes IB, Liew FY: A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 2004; 173(1): 145-50.
 28. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, Oh HJ, Heo YJ, Park SH, Kim HY, Min JK:

- Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 1132-9.
29. 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.
 30. Guma M, Kashiwakura J, Crain B, Kawakami Y, Beutler B, Firestein GS, Kawakami T, Karin M, Corr M: JNK1 controls mast cell degranulation and IL-1 β production in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 22122-7.
 31. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D: Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 2002; 16: 157-68.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Mancardi DA, Jönsson F, Iannascoli B, Khun H,

- Van Rooijen N, Huerre M, Daëron M, Bruhns P: Cutting edge: the murine high-affinity IgG receptor FcγRIIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011; 186: 1899-903.
35. Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, Radermacher P, Möller P, Benoist C, Mathis D, Fehling HJ, Rodewald HR: Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* 2011; 35(5): 832-44.
36. Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, Adachi R, Gurish MF, Gobezie R, Stevens RL, Lee DM: Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J Immunol* 2009; 182: 647-56
37. Nigrovic PA, Lee DM: Mast cells in autoantibody responses and arthritis. *Novartis Found Symp* 2005; 271: 200-9
38. Rottem M, Mekori YA: Mast cells and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005; 4(1):21-7.
39. 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.
40. Tetlow LC, Woolley DE: Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 896-903.

41. Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM: Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 845-51.
42. Eklund KK: Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev* 2007; 217: 38-52.
43. Nigrovic PA, Lee DM: Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007; 217: 19-37.
44. Woolley DE, Tetlow LC: Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. *Arthritis Res* 2000; 2(1): 65-74.
45. 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.
46. Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, Walchshofer S, Ghannadan M, Willheim M, Sillaber C, Graninger WB, Smolen JS, Valent P: Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41(2): 233-45.
47. Tkaczyk C, Okayama Y, Metcalfe DD, Gilfillan AM: Fcγ receptors on mast cells. activatory and inhibitory regulation of mediator release. *Int Arch*

- Allergy Immunol 2004; 133(3): 305-15.
48. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, Melendez AJ, McInnes IB: Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010;184(7):3336-40.
 49. 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.
 50. Okayama Y, Hageman 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.
 51. 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.
 52. 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.
 53. 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 FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 109-19.
54. Iikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Okayama Y, Saito H, Galli SJ, Nakae S: IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest* 2007; 87(10): 971-8.
55. Iida M, Matsumoto K, Tomita H, Nakajima T, Akasawa A, Ohtani NY, Yoshida NL, Matsui K, Nakada A, Sugita Y, Shimizu Y, Wakahara S, Nakao T, Fujii Y, Ra C, Saito H: Selective down-regulation of high-affinity IgE receptor (FcεRI) α-chain messenger RNA among transcriptome in cord blood-derived versus adult peripheral blood-derived cultured human mast cells. *Blood* 2001; 97(4): 1016-22.
56. Kawata N, Takata M, Suwaki T, Tanimoto Y, Soda R, Takahashi K, Kimura I: 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.
57. Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA: Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol* 2011; 41 (3): 760-72.
58. Wang L, Li H, Liang F, Hong Y, Jiang S, Xiao L: Examining IL-33 expression in the cervix of

HPV-infected patients: a preliminary study
comparing IL-33 levels in different stages of disease
and analyzing its potential association with IFN- γ .
Med Oncol 2014; 31(9): 143. doi:
10.1007/s12032-014-0143-0.

研究業績

柳澤 正彦

I	発表	①一般発表	8 (共 8)
		②特別発表	なし
II	論文	①原著論文	1 (共 1)
		②症例報告	1 (共 1)
		③総説	1 (共 1)
III	著書		なし

以上

I 発表

一般発表

1. 柳澤正彦, 植松義直, 加藤有紀, 石神等, 中島智直, 山田賢鎬, 大幸俊三, 徳橋泰明: 鎖骨骨折術中に異常高血圧から褐色細胞腫の診断に至った 1 例, 第 660 回関東整形災害外科学会月例会, 東京, 2011 年 11 月
2. 岡村祐己, 岡山吉道, 柏倉淳一, 山田賢鎬, 柳澤正彦, 坂本朋美, 齋藤修, 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
3. 柳澤正彦, 岡山吉道, 柏倉淳一, 山田賢鎬, 岡村祐己, 齋藤修, 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
4. 柳澤正彦, 中島伸哉, 菅野剛, 矢作宏, 徳橋泰明: 鎖骨遠位端骨折転位例に対するロッキングプレート固定の治療経験, 第 53 回関東整形災害外科学会, 栃木, 2013 年 3 月
5. 柳澤正彦, 山田賢鎬, 岡村祐己, 柏倉淳一, 齋藤修, 徳橋泰明, 布村聡, 下川敏文, 羅智靖, 岡山吉道: マスト細胞 関節滑膜マスト細胞における FcγRI および FcγRIIA を介する活性化と FcγRIIB による抑制, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013 年 11 月
6. 岡村祐己, 柏倉淳一, 山田賢鎬, 藤澤大輔, 柳澤正彦, 坂本朋美, 石井隆雄, 齋藤修, 徳橋泰明, 布村聡, 下川敏文, 羅智靖, 岡山吉道: マスト細胞 FcR 刺激による滑膜マスト細胞からのサブスタンス P の遊離, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013 年 11 月
7. 岡山吉道, 柏倉淳一, 山田賢鎬, 坂本朋美, 小野芳啓, 岡村祐己, 柳澤正彦, 徳橋泰明, 羅智靖: マスト細胞の基礎と臨床 Update 関節炎症とマスト細胞, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013 年 11 月

8. 矢作宏, 萩原秀彦, 中島伸哉, 柳澤正彦 : ロッキングプレートを用いた鎖骨遠位端骨折の治療, 第40回日本骨折治療学会, 熊本, 2014年6月

② 特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

1. 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 2013; 161 Suppl 2: 32-6.

② 症例報告

1. 柳澤正彦, 中島伸哉, 菅野剛, 矢作宏, 徳橋泰明 : 骨遠位端骨折転位例に対するロッキングプレート固定の治療経験. 関東整形災害外科学会雑誌 2014; 45 巻 2 号 73-6.

③ 総説

1. 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 2013; 59: 620-5.

III 著書

なし