

重症慢性特発性蕁麻疹患者の膨疹部における
皮膚マスト細胞の Mas-related gene X2
の発現の増強

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系皮膚科学専攻

藤澤 大輔

2016 年

指導教員 照井 正

重症慢性特発性蕁麻疹患者の膨疹部における
皮膚マスト細胞の Mas-related gene X2
の発現の増強

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系皮膚科学専攻

藤澤 大輔

2016 年

指導教員 照井 正

目次

略語	・ ・ ・ ・ 1
概要	・ ・ ・ ・ 3
諸言	
1. 慢性特発性蕁麻疹	・ ・ ・ ・ 5
2. 慢性特発性蕁麻疹と神経ペプチド	・ ・ ・ ・ 5
3. MrgX2 とヒトマスト細胞	・ ・ ・ ・ 6
4. 蕁麻疹病変における好酸球とマスト細胞	・ ・ ・ ・ 6
研究の目的	・ ・ ・ ・ 7
期待される結果	・ ・ ・ ・ 7
対象と方法	
1. 倫理的考慮	・ ・ ・ ・ 8
2. 使用抗体	・ ・ ・ ・ 8
3. 細胞	・ ・ ・ ・ 9
4. フローサイトメトリー	・ ・ ・ ・ 10
5. 免疫組織染色法	・ ・ ・ ・ 10
(表 1,表 2)	・ ・ ・ ・ 12
6. 塩基性好酸球顆粒タンパクの抽出	・ ・ ・ ・ 14
7. マスト細胞の活性化	・ ・ ・ ・ 14
8. 線維芽細胞	・ ・ ・ ・ 15
9. RNA 抽出およびリアルタイム定量的 RT-PCR	・ ・ ・ ・ 15
10. レンチウイルスの shRNA ベクターの構築と遺伝子導入	・ ・ ・ ・ 15
11. 細胞内 Ca ²⁺ レベルの測定	・ ・ ・ ・ 16
12. ヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 発現に対する治療、 神経伝達物質、およびサイトカインの影響	・ ・ ・ ・ 16
13. 統計解析	・ ・ ・ ・ 17
結果	
1. ヒト皮膚由来培養マスト細胞は MrgX2 が発現している。 ・ ・ ・ 18	

2. 慢性特発性蕁麻疹患者では健常人に比べ MrgX2 を発現している皮膚マスト細胞数が有意に高い。
．．．22
3. 慢性特発性蕁麻疹患者と健常人の背景、マスト細胞と MrgX2 陽性細胞の分布。
．．．25
4. SP 刺激により MrgX2 を介してヒト皮膚由来培養マスト細胞は活性化する。
．．．29
5. 慢性特発性蕁麻疹患者の病変部でのマスト細胞と好酸球の局在について。
．．．32
6. MBP と EPO は MrgX2 を介してヒト皮膚由来培養マスト細胞の活性化を誘導する
．．．35
7. 健常人と慢性特発性蕁麻疹患者の上肢、下肢、および体幹の皮膚組織におけるマスト細胞の phenotype の比較。
．．．38
8. ヒスタミン、SP、IL-33 および TSLP と慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤による MrgX2 発現レベルの影響。
．．．41
9. ヒト末梢血由来培養マスト細胞と LAD2 細胞の細胞表面と細胞内の MrgX2 の発現、および MrgX2 mRNA 発現レベル。
．．．44

考察 ．．．．47

まとめ ．．．．51

謝辞 ．．．．52

引用文献 ．．．．53

研究業績 ．．．．65

略語

CB, Cord blood

CSU, Chronic spontaneous urticaria

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO, Dimethyl sulfoxide

DNA, Deoxyribonucleic acid

EDN, Eosinophil-derived neurotoxin

EIA, Enzyme immunoassay

EPO, Eosinophil peroxidase

FACS, Fluorescence activated cell sorter

IMDM, Iscove modified Dulbecco medium

LSM, lymphocyte separation medium

MBP, Major basic protein

MC, Mast cell

MFI, Mean fluorescence intensity

MrgX2, Mas-related gene X2

NC, Nonatopic control

NK-1R, Neurokinin-1 receptor

PB, Peripheral blood

PACAP, Pituitary adenylate cyclase-activating

polypeptide

PG, Prostaglandin

RFU, Relative fluorescent unit

RNA, Ribonucleic acid

SCF, Stem cell factor

shRNA, Small hairpin RNA

SP, Substance P

TSLP, Thymic stromal lymphopoietin

UAS7, Urticaria Activity Score 7

VIP, Vasoactive intestinal peptide

概要

背景：慢性特発性蕁麻疹は6週間以上繰り返す紅斑と膨疹が明らかな誘因がなく生じる疾患であり、マスト細胞の活性化が発症に関与している。慢性特発性蕁麻疹患者に、神経ペプチドの一つである Substance P (SP) を皮内注射すると健常人と比較して大きな膨疹反応が長く続く。SP は Neurokinin-1 receptor (NK-1R) を介してヒトマスト細胞を活性化していると考えられてきたが、近年ヒト臍帯血由来培養マスト細胞で Mas-related gene X2 (MrgX2) が新たな SP 受容体として同定された。また、慢性特発性蕁麻疹患者で皮膚病変中に好酸球浸潤が観察され、好酸球顆粒蛋白質により慢性的に局所反応が起きると考えられてきた。しかしその機序は不明のままである。

目的：慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞における MrgX2 の発現レベル、ならびに皮膚から分離したマスト細胞が発現する MrgX2 の機能解析を目的とする。MrgX2 は SP と好酸球顆粒蛋白質の受容体であるかを検討する。

方法：慢性特発性蕁麻疹患者9人から皮膚生検で採取した病変部、および植皮術に用いた健常人13人の余剰部位を用いた。ヒト由来培養皮膚マスト細胞は、ヒト皮膚組織より酵素的に細胞を分散し、stem cell factor 存在下にメチルセルロースを用いて約10週～12週培養して得られた。患者皮膚組織中マスト細胞の MrgX2 発現を免疫組織化学染色法により検出した。ヒト由来培養皮膚マスト細胞における MrgX2 発現はフローサイトメーターで解析し、MrgX2 を標的とした shRNA はレンチウイルスベクターを用いて導入した。ヒスタミンは EIA 法で測定した。細胞内 Ca²⁺動態の解析は蛍光指示薬として Fluo3-AM を用いて測定した。

結果：健常人皮膚組織と比較して、慢性特発性蕁麻疹患者の病変部マスト細胞における MrgX2 発現の上昇を確認した。SP や塩基性好酸球顆粒蛋白 major basic protein (MBP)、eosinophil peroxidase (EPO) によるヒト皮膚由来培養マスト細胞の脱顆粒は NK-1R アンタゴニストでは抑制されなかった。しかし MrgX2 の shRNA を導入し MrgX2 の発現を抑制した細胞において脱顆粒が有意に抑制されたことから、MrgX2 が責任受容体であることが示された。

結論：慢性特発性蕁麻疹病変部マスト細胞で MrgX2 の発現が上昇し、かつ NK-1R ではなく MrgX2 がヒト皮膚由来培養マスト細胞の SP や MBP、EPO に対する応答性の責任受容体であることを明らかにした。MrgX2 は慢性特発性蕁麻疹治療の新たな分子標的になりうると考えられた。

諸言

1. 慢性特発性蕁麻疹

慢性特発性蕁麻疹は、少なくとも 6 週間、明らかな誘因がなく搔痒のある紅斑や膨疹が出現と消退を繰り返すものとして定義されている⁽¹⁾。

マスト細胞は、ヒスタミンやプロテアーゼの遊離、サイトカイン産生を介して膨疹反応の誘導に重要な役割を果たしている⁽²⁾。

また慢性特発性蕁麻疹の 30%-50%は、高親和性 IgE の受容体 FcεRI 又は IgE に対する自己抗体を有することが知られている^(1,3)。

残りの慢性特発性蕁麻疹患者 50%が実際にみられる"特発性"と定義されている^(1,3)。

2. 慢性特発性蕁麻疹と神経ペプチド

慢性特発性蕁麻疹患者は健常人と比較して SP および Vasoactive intestinal peptide (VIP) のようないくつかの神経ペプチドを皮内注射すると大きな膨疹を形成する^(4,5)。細胞表面上の FcεRI を発現しないマスト細胞腫細胞株 HMC-1 は、慢性蕁麻疹患者の血清によって活性化され⁽⁶⁾、FcεRI 非依存性のマスト細胞活性化機構が慢性蕁麻疹の病因に参与し得ることを示唆している。SP、VIP、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) といった神経ペプチドや、ソマトスタチンなどでヒト皮膚マスト細胞は脱顆粒が起こるが、Neurokinin (NK) A や NK B では脱顆粒は惹起されない。またこの現象は神経ペプチドによるヒト肺マスト細胞の脱顆粒においても確認されない^(7,8)。NK-1R は、SP の受容体であり T リンパ球、B リンパ球、単球、マクロファージ、および線維芽細胞など多くの細胞に発現している⁽⁹⁾。ヒトマスト細胞腫患者骨髄由来マスト細胞株である LAD2 細胞には NK-1R が発現しているが⁽¹⁰⁾、ヒトマスト細胞の表

面に NK-1R が発現しているという報告はない。

3. MrgX2 とヒトマスト細胞

MrgX2 は G 蛋白質共役型受容体 Mas-related gene ファミリーの一つであり、主にヒトの後根神経節で発現され、これらの受容体のサブグループ(MrgX1-MrgX7) は、マウスには存在しておらず、ヒトのニューロンで発現している^(11,12)。近年、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞において MrgX2 は SP、VIP、コルチスタチン、ソマトスタチン、および化合物である compound 48/80 を含む塩基性ペプチドに対する受容体であることが判明した⁽¹³⁾。MrgX2 を導入したラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3) 細胞は SP による活性化の後に脱顆粒を示し、MrgX1 を導入した (RBL-2H3) 細胞ではみられなかった⁽¹⁴⁾。

4. 蕁麻疹病変における好酸球とマスト細胞

マスト細胞の活性化によるサイトカイン産生は、炎症細胞、主に好酸球、CD4 陽性 T 細胞、および好中球の組織浸潤による急性アレルギー反応と 6~9 時間後の後期アレルギー反応を誘発する^(15,16)。慢性特発性蕁麻疹患者では、好酸球浸潤が観察される^(17,18)。慢性特発性蕁麻疹病変の MBP と eosinophil cationic protein (ECP) の顕著な沈着を示す研究では、好酸球顆粒蛋白質が放出され、直接または間接的に他の炎症細胞を介し、慢性特発性蕁麻疹患者で局所的な炎症をおこすと考えられてきた^(19,20,21)。また MBP は、線維芽細胞で共培養したヒトの心臓と肺マスト細胞を活性化させる^(22,23)。

慢性特発性蕁麻疹の病態解明において、ヒト皮膚マスト細胞と MrgX2 との関係を示した報告はない。また蕁麻疹病変部でマスト細胞と好酸球の局在を観察し、慢性特発性蕁麻疹の病因における好酸球の役割を明らかにした報告はない。

研究の目的

以下の項目を研究の目的とした。①皮膚マスト細胞が機能的な MrgX2 を発現するかどうかを検討。②慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚のマスト細胞において MrgX2 陽性マスト細胞数または MrgX2 発現頻度を検討する。③MrgX2 は SP と塩基性好酸球顆粒蛋白質の責任受容体であるかどうかを検討すること。

期待される成果

この研究結果は、慢性特発性蕁麻疹の病態や難治化機序を解明する糸口となるだけでなく、MrgX2 を標的とした新たな治療戦略を提示することが期待される。

対象と方法

1. 倫理的考慮

この研究は、生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得た。ヒト皮膚由来培養マスト細胞の使用に際して、平成24年3月2日付けで承認番号(RK-120210-3)として承認を受けた。ヒト肺由来培養マスト細胞の使用は、平成20年3月2日付けで研究課題(マスト細胞と肺線維芽細胞を標的とした呼吸器疾患開発研究)として承認を受けた。すべての被験者は、ヘルシンキ宣言に従い、インフォームドコンセントを得た。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組み換え実験実施規定に定める学長の承認を受けて平成26年3月10日に(2007 医 1-5)として承認をうけた。

2. 使用抗体

以下の抗体はそれぞれ下記の会社から購入した。抗ヒト MrgX2 モノクローナル抗体 (clone 477533) は R&D Systems (Minneapolis, MN)、抗ヒト MrgX2 ポリクローナル抗体 Abcam (Cambridge, United Kingdom)、ビオチン化された抗ヒト FcεRIαモノクローナル抗体 (clone CRA1 : eBioscience, San Diego, CA)、抗ヒト NK-1R ポリクローナル抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO)、抗トリプターゼモノクローナル抗体 cloneAA1 は (Dako, Glostrup, Denmark)、抗ヒトキマーゼモノクローナル抗体 (clone B7 : Chemicon International, Temecula, CA)、ビオチン化された抗ヒト ECP ポリクローナル抗体 (Bioss, Boston, MA)、抗ヒト PGP 9.5 モノクローナル抗体(clone 13C4/13CA, Abcam)、抗ヒト CD3-ζ モノクローナル抗体 (clone 6B10.2 : Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、抗ヒト von Willebrand factor モノクローナル抗体 (clone

MCA127T : AbD Serotec, Raleigh, NC) からそれぞれ購入した。

3. 細胞

ヒトマスト細胞腫患者骨髄由来マスト細胞株である LAD2 細胞は Dr Kirshenbaum (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD) より提供された⁽²⁴⁾。ヒト白血病患者 T 細胞株である Jurkat 細胞は (ATCC, Manassas, VA) より購入した。ヒト臍帯血 CD34⁺細胞は RIKEN BioResource Center (Tsukuba, Ibaraki, Japan) より購入した。ヒト末梢血マスト細胞は末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞 (CD4⁻, CD8⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD16⁻ および CD19⁻細胞) を分離したのち、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞はヒト臍帯血より CD34⁺細胞を分離したのち、200 ng/mL stem cell factor (SCF : PeproTech, London, United Kingdom) と 50 ng/mL IL-6 (PeproTech) を含んだ無血清培地 Iscove methylcellulose medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada) と Iscove modified Dulbecco medium (IMDM : Invitrogen, CA) で培養した⁽²⁴⁾。42 日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、0.1% BSA、100 ng/mL SCF と 50 ng/mL IL-6 を含んだ IMDM で培養した。マスト細胞の純度は異染性染色で確認し 98%以上であった。

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。健常人の皮膚組織は、アレルギー疾患のない患者で行われた良性または悪性腫瘍切除術後に、切除部位より離れた部位の皮膚から採取した全層皮膚植皮に使用する皮膚の余剰部位を用いた。肺の組織は悪性腫瘍切除術時に得られた切除組織の中で、肉眼的に腫瘍浸潤がない肺組織の余剰部位を用いた。できるだけ新鮮な肺組織と皮膚組織は採取後ただちに、はさみを用いて 1mm³に細切し、1.5 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)、0.75 mg/mL

hyaluronidase (Sigma-Aldrich)、0.1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin[BSA] : Sigma-Aldrich)、ペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen)を添加した IMDM で 37°C 1 時間酵素処理を行った⁽²⁵⁾。分散した細胞はリンパ球分離溶液(lymphocyte separation medium[LSM] : Organon Teknika, Durham, NC) を用いて遠心し、洗浄し回収した⁽²⁵⁾。回収したマスト細胞を serum-free Iscove's methylcellulose medium に 200 ng/ml SCF と 50 ng/ml IL-6 を添加した IMDM で培養した。

4. フローサイトメトリー

細胞表面および細胞内の蛋白質の MrgX2、FcεRIα および NK-1R の発現を調べるために使用した。

マスト細胞を回収し 4% パラホルムアルデヒドで 4°C 20 分固定した。FcR のブロッキングのためヒト TruStain FcX™ (BioLegend, San Diego, CA) にて 4°C 15 分反応させた後、抗ヒト MrgX2 モノクローナル抗体、抗ヒト NK-1R 抗体およびビオチン標識した抗ヒト FcεRIα 抗体と洗浄した細胞を 4°C 30 分間静置した。その後、PBS で洗浄し、抗ヒト MrgX2 モノクローナル抗体と抗ヒト NK-1R 抗体はそれぞれ PE 標識した抗マウス IgG モノクローナル抗体 (BD Bioscience, San Jose, CA) とビオチン標識抗ラビット IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で 4°C 30 分間反応させた。次にビオチン標識した抗ヒト FcεRIα 抗体とビオチン標識抗ラビット IgG 抗体は 4°C 30 分間 PE-streptavidin で細胞は染色された。また透過処理は BD Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) で行った。

マスト細胞表面上の発現を FACSCalibur (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA) で検出し、FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) で解析した。

5. 免疫組織化学染色法

9 人の慢性特発性蕁麻疹患者 (年齢範囲は 24 から 69 歳、

平均 45.1 歳、女性 5 人と男性 4 人) と健常人 (年齢範囲は 27 から 85 歳、平均 66.5 歳、女性 6 人と男性 7 人) で実験を行なった。慢性特発性蕁麻疹患者および健常人の詳細を表 1、表 2 に要約した。慢性特発性蕁麻疹患者は、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬とヒスタミン H2 受容体拮抗薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、シクロスポリン、トラネキサム酸、またはベタメタゾンで治療されていた。しかしこれらの治療では蕁麻疹を抑えることはできていなかった。重症度は Urticaria Activity Score 7 (UAS7) に基づいて測定した (表 1)。UAS7 は 1 週間の膨疹の数と搔痒の強さを患者から報告を得る評価法である^(26,27)。痒みの強さ (3[重度]、0[なし]) と膨疹の数 (3[>12 個]、0[なし])、(最大 1 日あたり 6 点) を毎日記録する。1 週間のスコアを合計し UAS7 (0 から 42 まで) とする。重症慢性特発性蕁麻疹は UAS7 30 以上の患者と定義した。また、総 IgE および 33 の共通アレルゲンに対する特異的 IgE 抗体価 (MAST33 : SRL, Tokyo, Japan) を含め自己血清皮内試験と血液検査を実施した。皮膚組織切片は、慢性特発性蕁麻疹患者 9 人の膨疹病変 (上肢、下肢、または体幹) から皮膚生検を行い得られた。健常人の皮膚組織は皮膚移植術の移植片 (上肢、下肢、および体幹) の余剰部位から得られた。

表 1 慢性特発性蕁麻疹患者の詳細

	Age	Sex	Duration of illness (M)	ASST	Serum IgE (IU/ml)	UAS7 scores	Positive for specific IgE	Treatment	Biopsy site
1	24	M	7	-	130	35	Dermatophagoides farinae House dust	H1RA,H2RA,LTRA	right upper arm
2	48	M	18	+	50	33	Dermatophagoides farinae House dust	H1RA,H2RA	trunk
3	63	M	3	+	90	34	None	H1RA,CsA	right thigh
4	69	F	8	+++	14.7	37	None	H1RA,H2RA LTRA,CsA	trunk
5	32	F	47	-	705	32	Dermatophagoides farinae House dust	H1RA,H2RA	right upper arm
6	44	F	20	-	381	32	None	H1RA,H2RA, Tranexamic Acid	left thigh
7	27	F	15	-	67	36	Cedar poller	H1RA,H2RA	right upper arm
8	40	M	4	-	108	34	Cedar poller, Worm wood Cat dandruff, Crab	H1RA,H2RA	trunk
9	59	F	52	-	50	35	None	H1RA,H2RA Betamethasone	trunk

ASST, autologous serum skin test; H1RA, histamine H1 receptor antagonist; H2RA, histamine H2 receptor antagonist; LTRA, leukotriene receptor antagonist; CsA, cyclosporine A;

表 2 健常人の詳細

NC Subject	Age	Sex	Biopsy site
1	79	F	trunk
2	83	F	trunk
3	72	M	trunk
4	68	F	left thigh
5	78	M	trunk
6	82	F	trunk
7	85	M	trunk
8	64	F	right thigh
9	85	F	Trunk
10	76	M	Trunk
11	33	M	right forearm
12	33	M	right forearm
13	27	M	left thigh

採取した皮膚組織を固定液として 4% パラホルムアルデヒドを使用し、4°Cで 24 時間浸漬した。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。最後に、20% スクロース含有 PBS に 4°Cで 1 晩浸漬し、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した後、クライオスタットで凍結切片が作製されるまで-80°C で保存した。凍結切片は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 4 μm に薄切し、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、ラミネートフィルムに入れて封をした。-80°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。

1% PBS を洗浄液として使用し、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。皮膚組織は Alexa Fluor 488 (Life technologies, San Jose, CA) 標識した抗ヒトトリプターゼモノクローナル抗体、ビオチン標識抗ヒト MrgX2 抗体、抗ヒト ECP 抗体、Alexa Fluor 488 標識抗ヒト PGP 9.5 モノクローナル抗体、Alexa Fluor 488 標識抗ヒト CD3- ζ モノクローナル抗体、Alexa Fluor 488 標識抗ヒト von Willebrand factor モノクローナル抗体、ビオチン標識抗ヒトキマーゼモノクローナル抗体で暗所 4°C 1 晩静置とした。アイソタイプコントロールには Alexa Fluor 488 標識マウス IgG1、ビオチン標識ラビット IgG、ビオチン標識マウス IgG1 を使用した。

3 回洗浄した後に streptavidin-Cy3 (BioLegend) を使用し室温で 1 時間染色した。洗浄を 3 回施行し、4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI : Invitrogen, Carlsbad, CA) を半滴ほど滴下し、カバーガラスを重ねた。

LAD2 細胞とヒト滑膜由来線維芽細胞、ヒト末梢血由来培養マスト細胞は DAPI を滴下、染色したのち観察に使用した。

共焦点顕微鏡 (IX71 : Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

6. 塩基性好酸球顆粒蛋白の抽出

MBP、EPO と eosinophil-derived neurotoxin (EDN) の蛋白は好酸球増多症患者の末梢血よりクロマトグラフィー法を用いて抽出を行なった^(28,29,30)。

7. マスト細胞の活性化

マスト細胞 (マスト細胞数 : 100 μ l あたり 1×10^3 個) はヒスタミンおよび PGD₂ 測定のため 0.1% BSA 及び 1 mmol/L 塩化カルシウムを添加した HEPES 緩衝液に懸濁した。マスト細胞は SP (Sigma-Aldrich)、好酸球カチオン性蛋白質である 10~100 μ g/ml (MBP、EPO、および EDN) と 10^{-6} mol/L カルシウムイオノフォア A23187 (Sigma-Aldrich) で 30 分間 37°C にて刺激した。その後、細胞上清と細胞ペレットを回収した。

また細胞を、1、3、および 10 μ mol/L NK-1R アンタゴニスト (CP-963453 : Sigma-Aldrich) 30 分で前処理し、SP で 30 分刺激した。また他の実験でヒスタミン H1 受容体拮抗薬の 10 μ mol/L オロパタジン塩酸塩 (Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom) とヒスタミン H2 受容体拮抗薬の 10 μ mol/L ファモチジン (LKT Laboratories, St Paul, MN) を 30 分前処理し、10 μ mol/L デキサメサゾン (Cayman, Ann Arbor, MI) は 16 時間前処理したのち、SP で 30 分刺激をした。同様に細胞上清と細胞ペレットを回収し、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 enzyme immunoassay (EIA) 法で測定した。薬物の濃度および処理時間は以前の報告を参照し決定した^(31,32,33)。

ヒスタミンの測定には 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) を用いた。Histamine 遊離率は、(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)×100%として算出した。

8. 線維芽細胞

インフォームドコンセントを得た日本大学医学部附属板橋病院の患者の人工膝関節置換術の際に滑膜組織は採取された。すぐに細切し、2% ウシ胎児血清(Gibco, CA)と 100 units/ml ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した IMDM で培養したのち得られた。

9. RNA 抽出およびリアルタイム定量的 RT-PCR

マスト細胞の total RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し、精製した。500 µg/mL oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA)、10 mM dNTP mix (Invitrogen)、5 x first strand buffer (Invitrogen)、0.1 M DTT (Invitrogen)、SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写を行った。MrgX2 および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) のものを使用した。定量的 RT-PCR は、TaqMan 解析を用いた⁽³⁴⁾。MrgX2 センスプライマー (5'-GCCCATCTGGTATCGC-3') およびアンチセンスプライマー (5'-GGGTTGGCACTGCTGTTAAGA-3') および NK-1R センスプライマー (5'-TCTTCTTCCTCCTGCCCTACATC-3') およびアンチセンスプライマー (5'-AGCACCGGAAGGCATGCTTGAAGCCCA-3') (Invitrogen)。

10. レンチウイルスの shRNA ベクターの構築と遺伝子導入

MrgX2 shRNA の構築のためのセンスおよびアンチセンス

オリゴヌクレオチド配列を有するレンチウイルス発現ベクター (MISSION shRNA plasmid DNA, catalog no. TRCN0000357642) は (Sigma-Aldrich) から購入した。パッケージングベクター (MISSION lentiviral packaging mix : Sigma-Aldrich) とレンチウイルス発現ベクター (pLKO-puro) MrgX2 shRNA または MISSION 非標的 shRNA 対照ベクター (Sigma-Aldrich) は TransIT (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) で 293T 細胞に導入した。6 時間後、培養上清を交換し、48 時間後に、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、0.45 μm のフィルターで濾過した。濾過した上清を、4°C で 1 晩 9000 rpm で遠心分離し、放出したウイルスを 1 時間氷上で静置した。この段階で、220 mL の上清を 1~2 mL に濃縮した。ヒト皮膚由来培養マスト細胞 (1×10^5) に濃縮ウイルス上清 100 μL を懸濁し導入を行った。感染の 3 日後、培地を、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ピューロマイシン、100 ng/mL SCF、50 ng/mL IL-6、および 0.1% BSA を含有するウイルスを含まない IMDM に交換した。7 日間の抗生物質選択後、ウイルスに感染したヒト皮膚由来培養マスト細胞を実験に使用した。

11. 細胞内 Ca^{2+} レベルの測定

MrgX2 およびベクターのみ導入した CHO 細胞を、2.5 mmol/L プロベネシドと 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Fluo-3AM (Dojindo, Kumamoto, Japan) を添加した HEPES 緩衝化 HBSS (pH 7.4) 中で 37°C 1 時間静置した。次に細胞を、Fluo-3AM を含まない溶液で 4 回洗浄した。細胞内の Ca^{2+} 濃度は、蛍光イメージングプレートリーダーシステム FLIPR (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用い、SP、MBP、EPO、EDN、およびカルシウムイオノフォア A23187 を添加した前後で測定した。

12. ヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 発現に対する治療、神経伝達物質、およびサイトカインの影響

ヒスタミン H1 受容体拮抗薬の 10 $\mu\text{mol/L}$ オロパタジン塩酸塩(Tocris Bioscience)、ヒスタミン H2 受容体拮抗薬の 10 $\mu\text{mol/L}$ ファモチジン (LKT Laboratories)、10 $\mu\text{mol/L}$ デキサメサゾン (Cayman)、10 $\mu\text{mol/L}$ ヒスタミン二塩酸塩 (Acros Organics, Geel, Belgium)、3 $\mu\text{mol/L}$ SP (Sigma-Aldrich)、30 ng/mL IL-33 (PeproTech)、10 ng/mL TSLP (PeproTech)、および 30 ng/mL IL-33 と 10 ng/mL TSLP 両方を、それぞれ 24 時間刺激し、ヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 発現に対する影響をフローサイトメーターで解析した^(35,36,37,38,39,40)。

13. 統計解析

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

結果

1. ヒト皮膚由来培養マスト細胞は **MrgX2** が発現している。

最初に、ヒトのマスト細胞で **MrgX2** の発現を評価するために、皮膚、臍帯血、肺由来の培養マスト細胞から **total RNA** を抽出し **MrgX2 mRNA** レベルを **RT-PCR** にて比較した。また、**LAD2** 細胞および皮膚、臍帯血、肺由来の培養したマスト細胞表面での **MrgX2** の発現をフローサイトメーターで比較した。

LAD2 細胞は **MrgX2** の **mRNA** を発現しているという報告から⁽⁴⁰⁾、この細胞をポジティブコントロールとし、**LAD2** 細胞の **MrgX2 mRNA** の発現レベルを 1 とした。以前の報告と同様に⁽⁴¹⁾、皮膚由来培養マスト細胞で **MrgX2 mRNA** の発現レベルは、肺由来培養マスト細胞に比べて著明に高値であった (図 1A)。**MrgX2** の細胞表面の蛋白発現はヒト肺由来培養マスト細胞にはみられず、**LAD2** 細胞およびヒト臍帯血とヒト皮膚由来培養マスト細胞の表面で検出された(図 1B)。

MrgX2 の局在を解析するため、**LAD2** 細胞において抗 **MrgX2** 抗体を用いて免疫組織化学染色法にて解析した。**MrgX2** は主に **LAD2** 細胞の細胞質に局在していることを確認した (図 1C)。

ヒトマスト細胞腫患者骨髄由来マスト細胞株である **LAD2** 細胞に **NK-1R** が発現しているが⁽¹⁰⁾、ヒトマスト細胞の表面に **NK-1R** が発現している報告がないことから、フローサイトメーターにて **NK-1R** の発現をヒト皮膚およびヒト肺由来培養マスト細胞で解析した。ヒト皮膚由来、ヒト肺由来培養マスト細胞は、細胞表面上に **NK-1R** を発現していなかった。陽性コントロールである **Jurkat** 細胞は、**NK-1R** を細胞表面上に発現していた (図 1D)。

小括：ヒト皮膚由来培養マスト細胞は **MrgX2** を発現し、**NK-1R** を発現していなかった。

図 1. 皮膚由来マスト細胞の MrgX2 発現

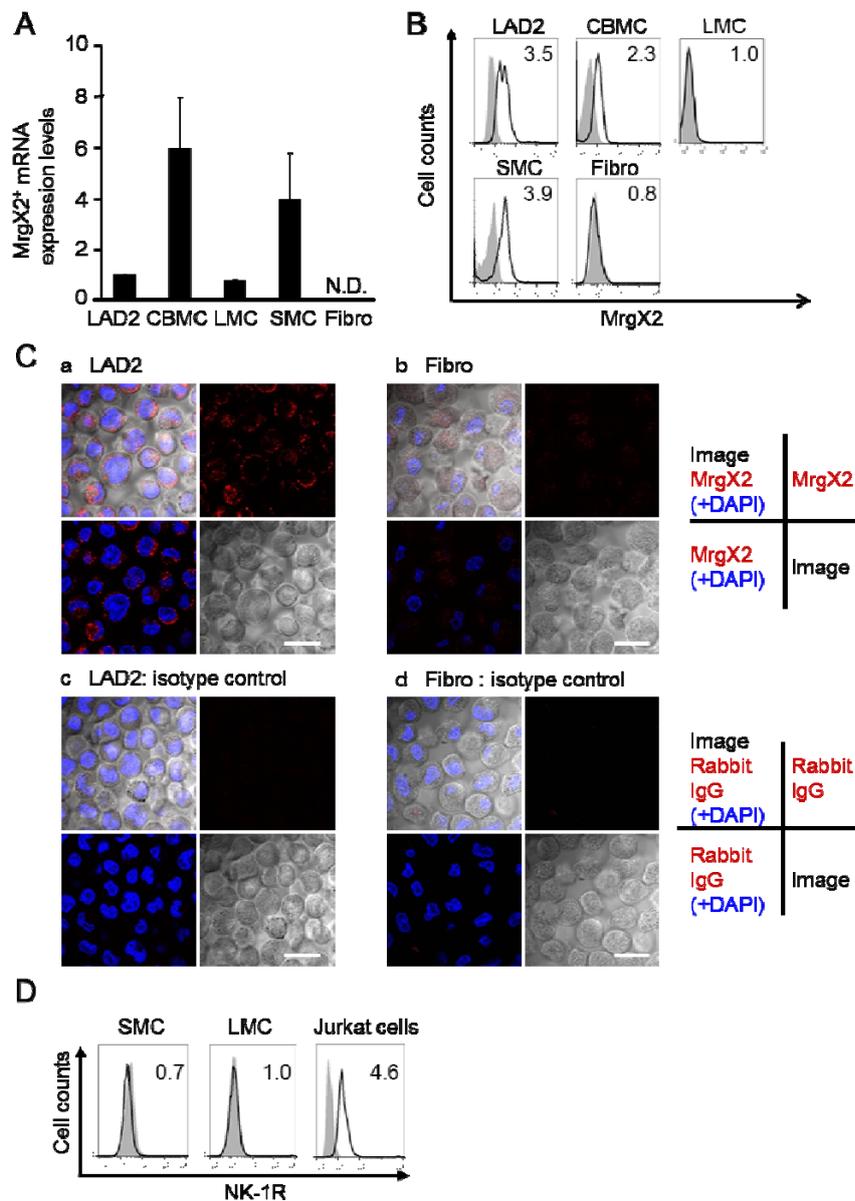


図 1 : (A) ヒトマスト細胞と線維芽細胞の MrgX2 mRNA の発現。 LAD2 細胞中の MrgX2 mRNA の発現レベルを 1 とした。(n = 3 検体) 値は、平均値 ± 標準誤差を示す。ヒト肺由来培養マスト細胞 (LMC)、ヒト皮膚由来培養マスト細胞 (SMC)、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞 (CBMC)、およびヒト滑膜由来培養線維芽細胞 (Fibro) N.D. = not detected : 検出されず (B) ヒトマスト細胞および線維芽細胞上の MrgX2 の細胞表面発現レベルをフローサイトメーターで解析した。実線は、抗 MrgX2 モノク

ローナル抗体で染色した細胞のヒストグラムを示す。アイソタイプ免疫グロブリンで染色したものは灰色のヒストグラムとして表示した。右上の値は、平均蛍光強度(Mean fluorescence Intensity : MFI) を示す。これは 2 回の実験を行い同様の結果を示した。(C) は、LAD2 細胞を抗 MrgX2 抗体 (赤,a) で染色した。対照アイソタイプとして、ウサギ IgG で染色した細胞が示されている (c)。陰性コントロールとして、線維芽細胞を抗 MrgX2 抗体 (b) で染色した。細胞の核は、DAPI (青色) で染色した。Bar = 10 μm (D) ヒト皮膚および肺由来培養マスト細胞および Jurkat 細胞に対する NK-1R の細胞表面発現レベルをフローサイトメーターで解析した。実線は、抗 NK-1R 抗体で染色した細胞を示し、アイソタイプ免疫グロブリン染色したマスト細胞は灰色のヒストグラムとして示した。右上の数字は MFI を示す。

2. 慢性特発性蕁麻疹患者では健常人に比べ MrgX2 を発現している皮膚マスト細胞数が有意に高い。

皮膚組織における MrgX2 陽性のマスト細胞の頻度を評価するため、抗 MrgX2 抗体および抗トリプターゼモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法を行なった (図 2)。慢性特発性蕁麻疹患者 (図 2B) および健常人 (図 2A) の皮膚組織のマスト細胞における MrgX2 の発現を比較した。皮膚のマスト細胞数 (緑色で示されるトリプターゼ陽性細胞 : 図 2 A,B) は慢性特発性蕁麻疹患者 (256 ± 35.2 細胞/ mm^2 、中央値と四分位範囲) と健常人 (316 ± 251 細胞/ mm^2) の皮膚組織において有意差はなかった (図 2D)。しかし、MrgX2 陽性のマスト細胞数 (黄色の細胞 : 図 2B,C) は健常人 (68.5 ± 51.1 細胞/ mm^2) より慢性特発性蕁麻疹患者 (116 ± 19.0 細胞/ mm^2) で皮膚組織において有意に大きかった (図 2 E)。皮膚組織でのマスト細胞は LAD2 細胞と同様の MrgX2 の局在パターンを示し、細胞質に局在していた (図 1C)。MrgX2 陽性マスト細胞の割合は慢性蕁麻疹患者のマスト細胞で ($47.0\% \pm 6.9\%$) が健常人 ($21.6\% \pm 7.8\%$) に比べ統計学的有意な増加がみられた (図 2F)。

小括：慢性特発性蕁麻疹患者と健常人と両者ともに MrgX2 を発現しているマスト細胞が存在しているが、慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚病変で MrgX2 を発現しているマスト細胞数が健常人に比較して有意に高いことが明らかとなった。

図 2. 慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞での有意な MrgX2 の発現上昇

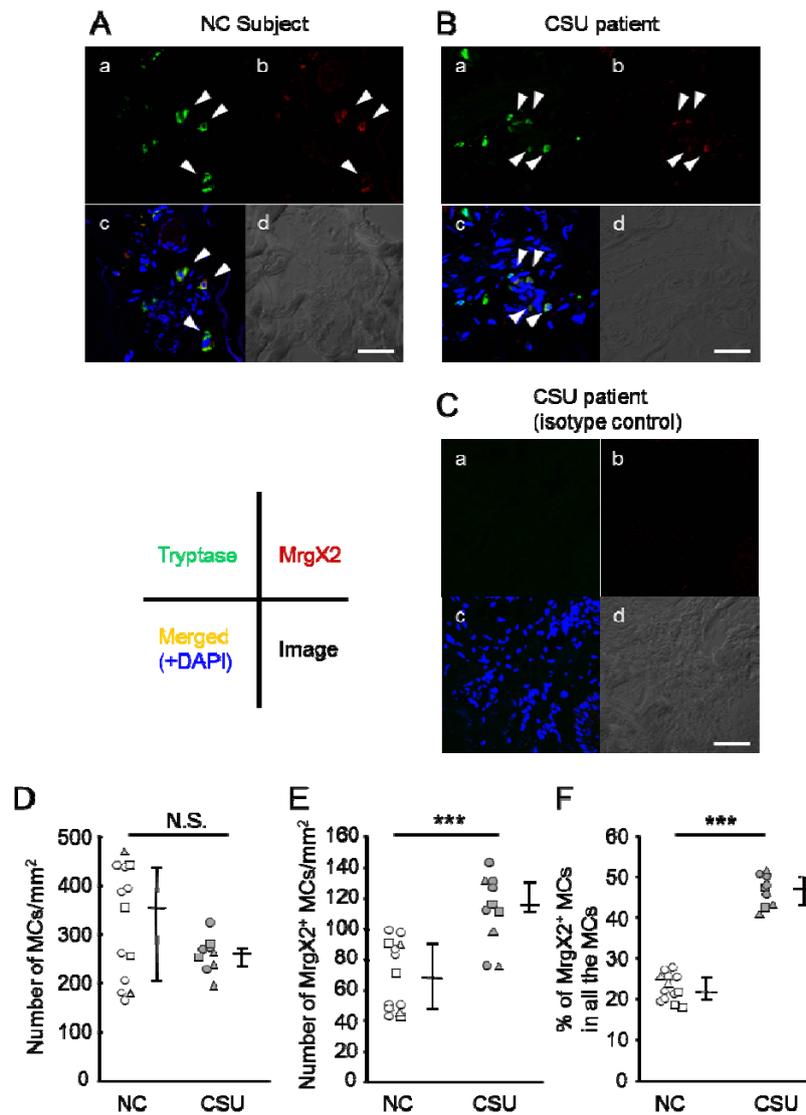


図 2 : (A,B) 慢性特発性蕁麻疹患者患者 (CSU) の皮膚組織における MrgX2 陽性のマスト細胞 (トリプターゼ陽性細胞) の画像と健常人 (NC) の画像を示す。皮膚の免疫組織化学染色法は、抗トリプターゼモノクローナル抗体 (緑,a)、抗 MrgX2 抗体 (赤,b) 及び DAPI (青,c) を用いた。白矢印は、トリプターゼ MrgX2 二重陽性細胞を示す。Bar = 50 μ m (C) 慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚組織をマウス IgG1 とウサギ IgG で染色し、アイソタイプコントロールとした。これらの組織中の細胞を、二重盲検法を用い 2 人で数え、慢性特発性

蕁麻疹と健常人の皮膚組織で 1mm^2 当たりのマスト細胞数 (D)、 1mm^2 当たりの MrgX2 陽性のマスト細胞数 (E)、マスト細胞中の MrgX2 陽性マスト細胞の割合 (F) の比較を示した。三角形、四角形、円はそれぞれ、上肢、下肢、体幹の使用した皮膚の組織部位を示す。中央値と四分位範囲でデータを表した。 *** $P < 0.001$ 。 N.S. = not significant : 有意差なし

3. 慢性特発性蕁麻疹患者と健常人の背景、マスト細胞と MrgX2 陽性細胞の分布。

慢性特発性蕁麻疹患者の平均年齢は 45.1 歳で (表 1)、健常人の平均年齢は 66.5 歳であったため (表 2)、MrgX2 陽性マスト細胞数と、マスト細胞中の MrgX2 陽性マスト細胞の割合に対する年齢の影響を評価した。50 歳以上と 50 歳未満の慢性特発性蕁麻疹患者でこれらの値を比較した。マスト細胞数と MrgX2 陽性マスト細胞の数、MrgX2 陽性マスト細胞の割合はそれぞれ 2 つに分けた年齢のグループ間で有意な差はみられなかった (図 3A,B,C)。健常人も同様に 35 歳以上と 35 歳未満で比較し、マスト細胞数と MrgX2 陽性マスト細胞数、MrgX2 陽性マスト細胞の割合は年齢のグループ間に有意な差はみられなかった (図 3D,E,F)。

次に健常人のマスト細胞の密度が生検部位によって異なることを考え、(図 2D) に示した生検部位を検討した。健常人の上肢、下肢、および体幹の生検標本 (図 3G) においてマスト細胞の 1mm² 当たりの数を比較した。マスト細胞の密度が生検部位に依存しないことがわかった (図 2D、図 3G)。さらに、慢性特発性蕁麻疹患者 (n = 4) と健常人 (n = 8) と患者の間での体幹の生検標本から 1mm² 当たりのマスト細胞数を比較し、有意差を認めなかった (図 3H)。

次に、皮膚組織内の MrgX2 陽性神経細胞数を比較した。慢性特発性蕁麻疹患者と健常人における MrgX2 陽性神経細胞の頻度は、12.8% と 13.3% であった (図 3I)。すなわち皮膚における MrgX2 陽性細胞の大部分は、マスト細胞であった。Allia らは⁽⁴²⁾、免疫組織学的解析によって、リンパ球および内皮細胞および消化管神経節細胞における MrgX2 蛋白質を発現していることを報告しており、抗 MrgX2 抗体および抗 CD3 抗体と抗 von Willebrand 因子モノクローナル抗体 (n = 3 検体) を用いて慢性特発性蕁麻疹患者からの皮膚組織の二重染色を行った。しかし MrgX2 陽性リンパ球または MrgX2 陽性血管内皮細胞を確認しなかった。

小括：慢性特発性蕁麻疹患者と健常人と両者ともに年齢と部位で **MrgX2** を発現しているマスト細胞に有意な差はみられなかった。また皮膚組織内で神経細胞に **MrgX2** を発現されていることが確認されたが多くはマスト細胞で発現がみられた。

図 3. 慢性特発性蕁麻疹患者と健常人の mast 細胞と MrgX2 陽性細胞の分布

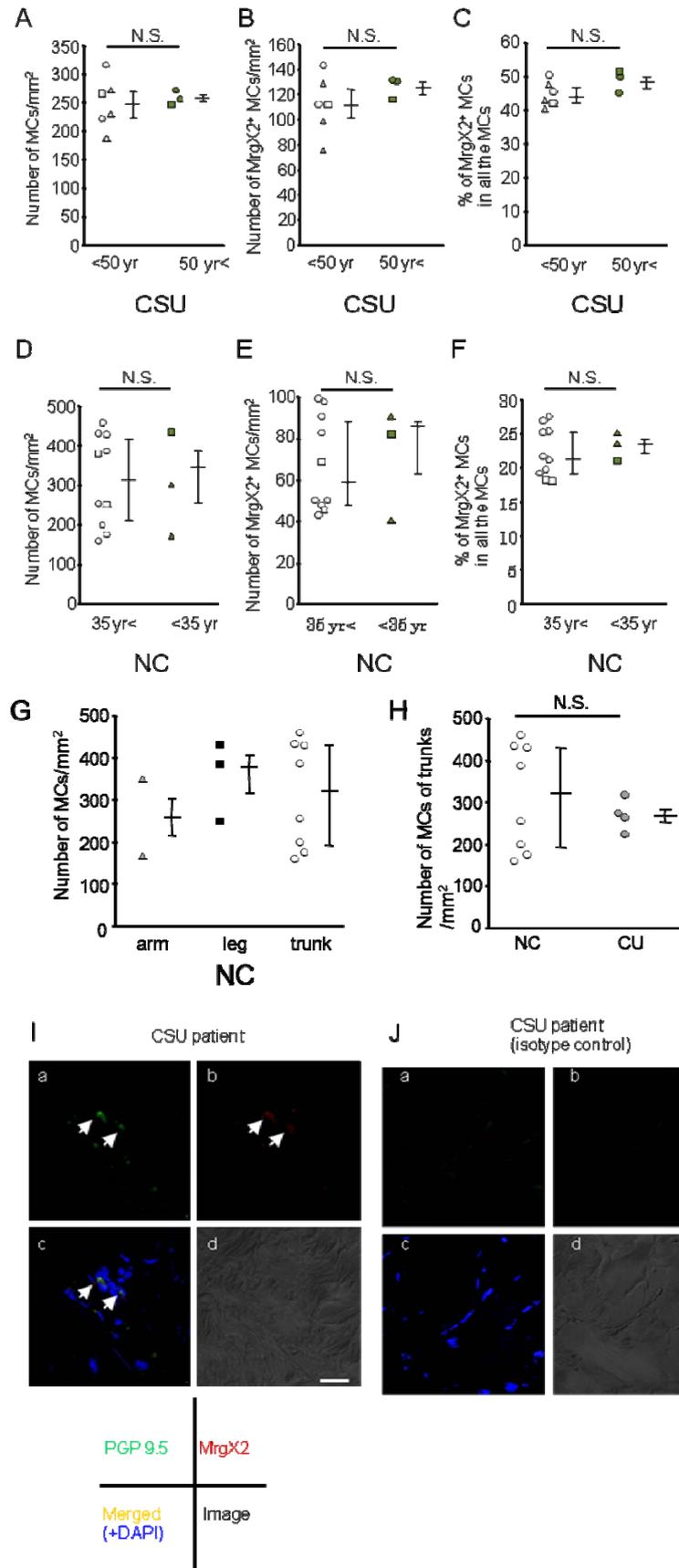


図 3：皮膚組織中のマスト細胞数 (A)、MrgX2 陽性マスト細胞数 (B) と、マスト細胞中の MrgX2 陽性マスト細胞の割合 (C) に対する年齢の影響を評価するために、50 歳以上と 50 歳未満の慢性特発性蕁麻疹患者でこれらの値を比較した。皮膚組織中のマスト細胞数 (D) と MrgX2 陽性マスト細胞数 (E)、MrgX2 陽性マスト細胞の割合 (F) を健常人で 35 歳以上と 35 歳未満で比較した。三角形、四角形、円はそれぞれ、皮膚組織部位である上肢、下肢、体幹を示す。(G) 健常人から採取した上肢、下肢、体幹からの皮膚組織中のマスト細胞数の比較を示し、(H) 体幹における慢性特発性蕁麻疹と健常人の皮膚組織のマスト細胞数の比較を示した。中央値と四分位範囲でデータを表した。N.S. = not significant：有意差なし (I) の皮膚の免疫組織化学染色は、抗 PGP9.5 モノクローナル抗体(緑,a)、抗 MrgX2 抗体(赤,b) 及び DAPI (青,c) を用いた。白矢印は、PGP9.5 MrgX2 二重陽性細胞を示す。Bar = 30 μm (J) は慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚組織をマウス IgG1 とウサギ IgG で染色し、アイソタイプコントロールとした。Bar = 50 μm

4. SP 刺激により MrgX2 を介してヒト皮膚由来培養マスト細胞は活性化する。

SP によるマスト細胞の MrgX2 の機能を解析するため、レンチウイルスによる shRNA 技術を用いて、ヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 発現を減少させフローサイトメーターで解析した。MrgX2 発現レベルは未処理のヒト皮膚由来培養マスト細胞、コントロールの shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞と比較して、MrgX2 の shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞で減少した (図 4A)。また MFI での MrgX2 の発現は MrgX2 の shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞で有意に低下した (図 4C)。FcεRI の発現は MrgX2 shRNA の導入によって低下しなかった (図 4B)。

さらに SP 刺激による MrgX2 を介したヒト皮膚由来培養マスト細胞からのヒスタミン遊離と PGD₂ 産生があるかを EIA 法を用いて確認した。ヒスタミン遊離および PGD₂ 産生は未処理のヒト皮膚由来培養マスト細胞およびコントロールの shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞と比較して、MrgX2 の shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞は有意に減少した (図 4D)。

ヒト皮膚由来培養マスト細胞の SP による活性化は、NK-1R を介するか調べるため、ヒト NK-1R の特異的阻害剤である CP-96345 の存在下または非存在下において、SP 刺激後のヒト皮膚由来培養マスト細胞からヒスタミン遊離を測定した。CP-96345 の存在下で SP 刺激を行ったヒト皮膚由来培養マスト細胞のヒスタミン遊離は阻害されず、SP によるヒト皮膚由来培養マスト細胞の活性化は NK-1R を介していないことがわかった (図 4E)。

小括：SP 刺激でヒト皮膚マスト細胞の活性化は NK-1R を介してではなく MrgX2 を介して起こることを示した。

図 4. SP 刺激により MrgX2 shRNA を導入し MrgX2 を抑制したヒト皮膚由来培養マスト細胞からのヒスタミン遊離と PGD₂ 産生

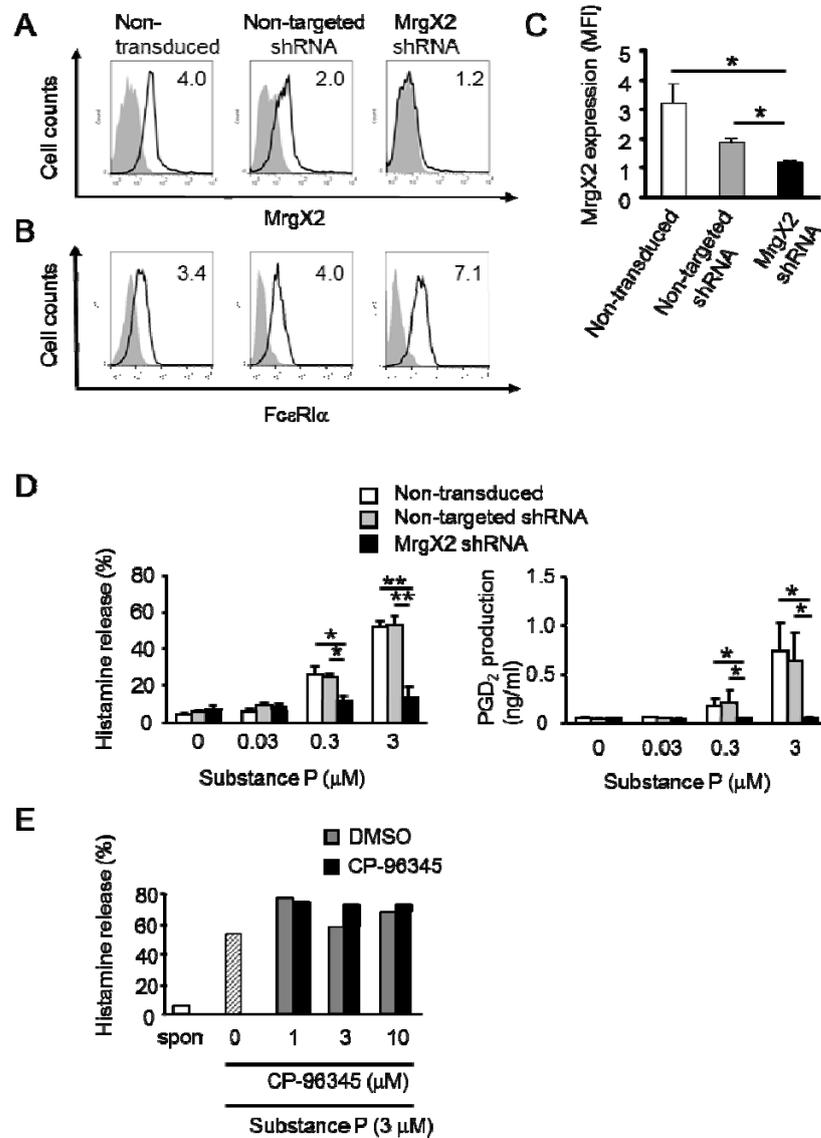


図 4 : (A) 細胞表面の MrgX2 発現をフローサイトメーターで解析した。実線は、抗 MrgX2 モノクローナル抗体で染色した細胞を示し、アイソタイプ免疫グロブリンで染色したマスト細胞は灰色のヒストグラムとして示す。MrgX2 発現レベルは未処理のヒト皮膚由来培養マスト細胞 (Non-transduced) およびコントロールの shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞 (Non-targeted shRNA) と比較して、MrgX2 の shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養

マスト細胞 (MrgX2 shRNA) で減少した。(B) 細胞表面の FcεRIα発現をフローサイトメーターで解析した。実線は、抗 FcεRIαモノクローナル抗体で染色されたマスト細胞を示し、アイソタイプ免疫グロブリン染色したマスト細胞は灰色のヒストグラムとして示す。右上の数字は MFI を示す。(n = 3 検体) (C) 発現レベルの統計学的分析を示す。MrgX2 (A) の発現レベルを示す。(n = 3 検体) * $P < 0.05$ 。(D) SP で刺激したマスト細胞からのヒスタミン遊離と PGD₂ 産生のレベルを表し、未処理のヒト皮膚由来培養マスト細胞、コントロールの shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞、MrgX2 の shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞をそれぞれ、白、グレー、黒のバーとして示す。(n = 3 検体) 値は、平均値 ± 標準誤差として示した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。(E) CP-96345 の存在下または非存在下で、ヒト皮膚由来培養マスト細胞を SP で刺激し、ヒスタミン遊離を測定した。(n = 2 検体)

5. 慢性特発性蕁麻疹患者の病変部でのマスト細胞と好酸球の局在について。

慢性特発性蕁麻疹患者において、好酸球浸潤とマスト細胞の脱顆粒は、蕁麻疹病変で見られる^(1,43)。そこで蕁麻疹病変と健常人皮膚組織における1mm²あたりの好酸球数を数えた(図5A,C,E)。好酸球の浸潤は、健常人の皮膚組織において観察されず、慢性特発性蕁麻疹患者9人中7人の患者の蕁麻疹病変皮膚組織で観察された。健常人と比較すると、慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚組織における好酸球数の有意な増加がみられた(図5E)。また好酸球とマスト細胞は近傍に存在している像が、慢性特発性蕁麻疹患者の蕁麻疹病変で観察された(図5A)。

小括：免疫組織化学染色法で慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚の生検組織ではマスト細胞と好酸球が近傍に存在している。

図 5. 慢性特発性蕁麻疹患者の蕁麻疹病変のマスト細胞と好酸球の局在について

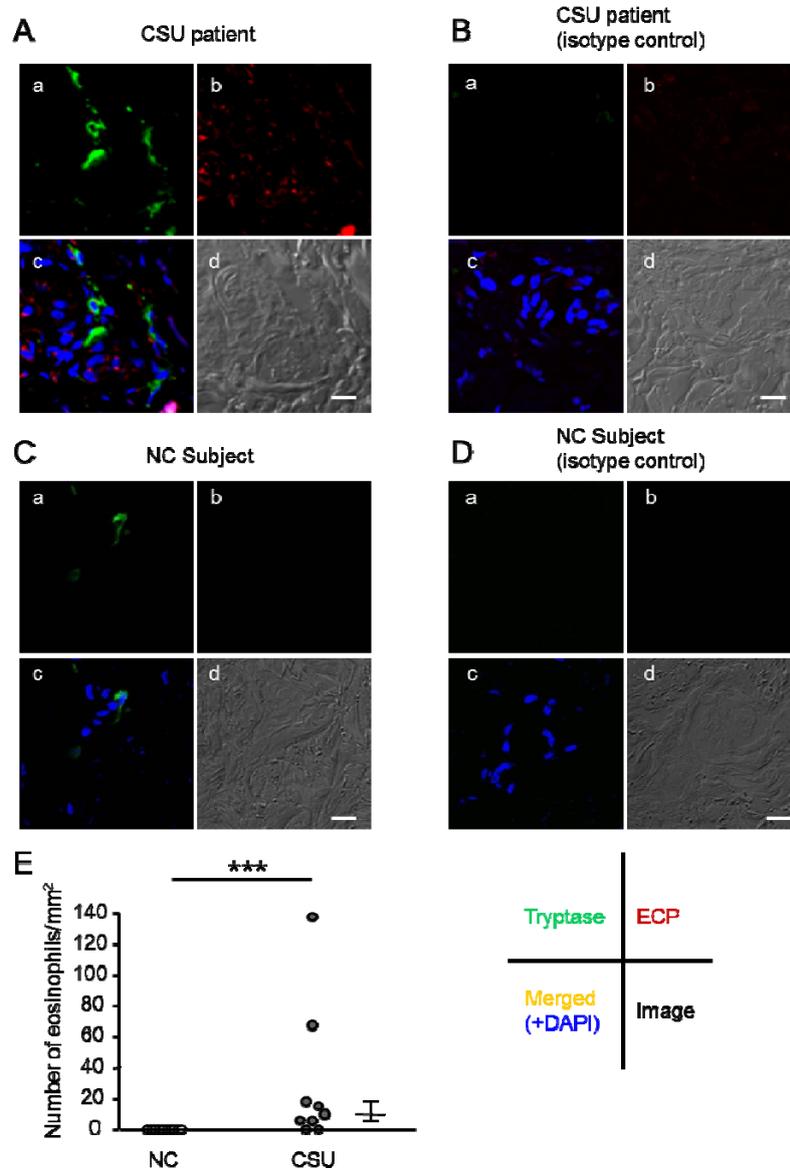


図 5 : (A) 慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚組織のマスト細胞および好酸球の局在を免疫組織化学染色で検討した。(C) 健常人の免疫組織化学染色像を示す。抗トリプターゼモノクローナル抗体は(緑)で、抗 ECP 抗体は(赤)、および DAPI は(青)で示される。Bar = 10 μm アイソタイプコントロールは、マウス IgG1 またはウサギ IgG で染色した。それぞれ (B,D)。(E) 慢性特発性蕁麻疹患者(n = 9) と健常人 (n = 13) の皮膚組織中の 1mm^2 あたりの好酸球数の比較。値は中央値と四分

位範囲として示す。 *** $P < 0.001$

6. MBP と EPO は MrgX2 を介してヒト皮膚由来培養マスト細胞の活性化を誘導する。

好酸球顆粒蛋白質が MrgX2 を介して細胞を活性化するかどうかを調べるため、MrgX2 が導入された CHO 細胞を用いて Ca^{2+} の流入を測定した。SP 刺激で MrgX2 を導入した CHO 細胞は細胞内への Ca^{2+} 流入の増加がみられ、ベクターのみ遺伝子導入した CHO 細胞 (Mock と呼ぶ) ではみられなかった (図 6A)。この MrgX2 を導入した CHO 細胞を用いて、好酸球顆粒蛋白質刺激による Ca^{2+} 流入を測定した。MBP と EPO で濃度依存的に Ca^{2+} の流入が確認されたが、EDN では確認されなかった (図 6B)。

また、MBP、EPO 刺激によるヒト皮膚由来培養マスト細胞活性化の MrgX2 の機能を分析するために、レンチウイルスによる shRNA 技術を用いてヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 の発現を減少させた。MBP と EPO によるヒスタミン遊離は未処理のヒト皮膚由来培養マスト細胞、コントロールの shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞と比較し MrgX2 の shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞で大幅に減少した (図 6C)。

小括：好酸球塩基性顆粒蛋白質は MrgX2 を介してヒト皮膚由来培養マスト細胞を活性化していた。

図 6. SP は MrgX2 を介して細胞内 Ca^{2+} の流入を誘導し、MBP と EPO は MrgX2 を介して細胞内 Ca^{2+} の流入とヒスタミン遊離を誘導する

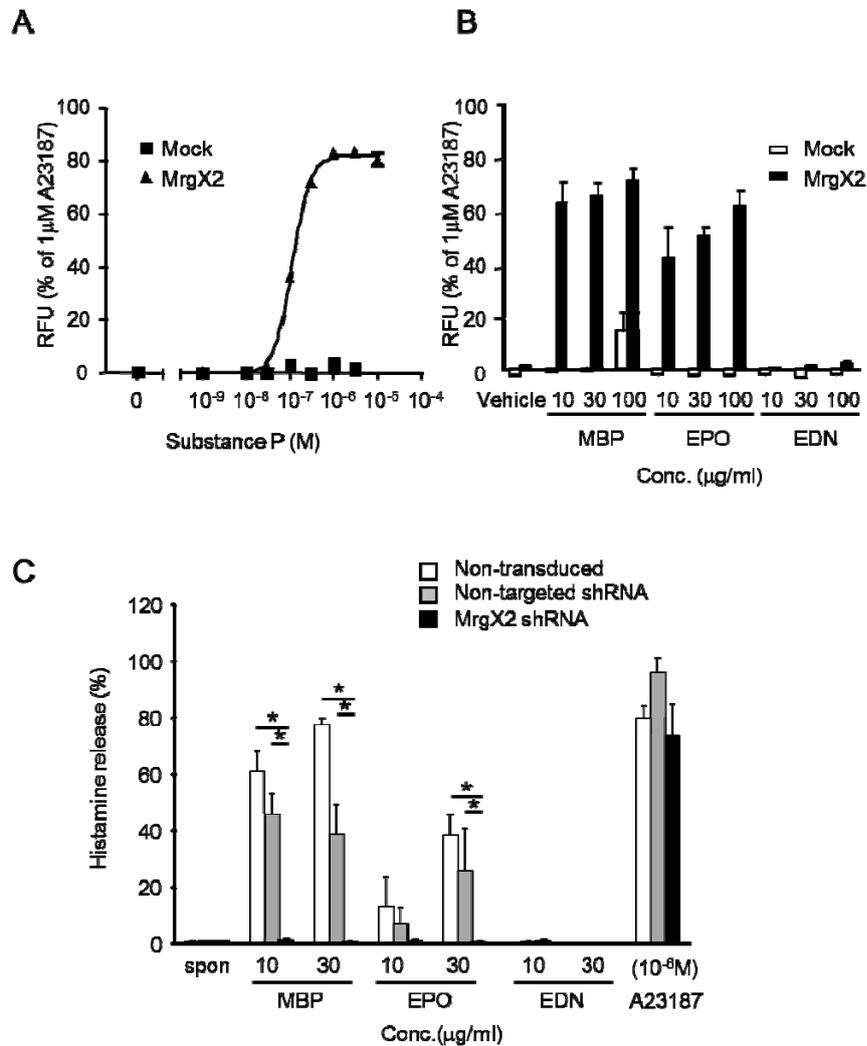


図 6 : (A) MrgX2 またはベクターのみ遺伝子導入した CHO 細胞 (Mock と呼ぶ) を、 10^{-9} から 10^{-4} mol/L の SP で刺激し、細胞内の Ca^{2+} レベルを測定した。 (B) MrgX2 またはベクター単独 (Mock) を導入した CHO 細胞を、10、30、および $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の好酸球顆粒蛋白質 MBP および EPO で刺激し、細胞内の Ca^{2+} レベルを測定した。Y 軸は RFU を示す。(RFU: $1 \mu\text{M}$ のカルシウムイオノフォア A23187 刺激で Mock 細胞を刺激した際の Ca^{2+} 細胞内濃度上昇を 100% として SP、MBP、EPO、および EDN 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をその比率で表した) (C) 好酸球顆粒蛋白質に応答し

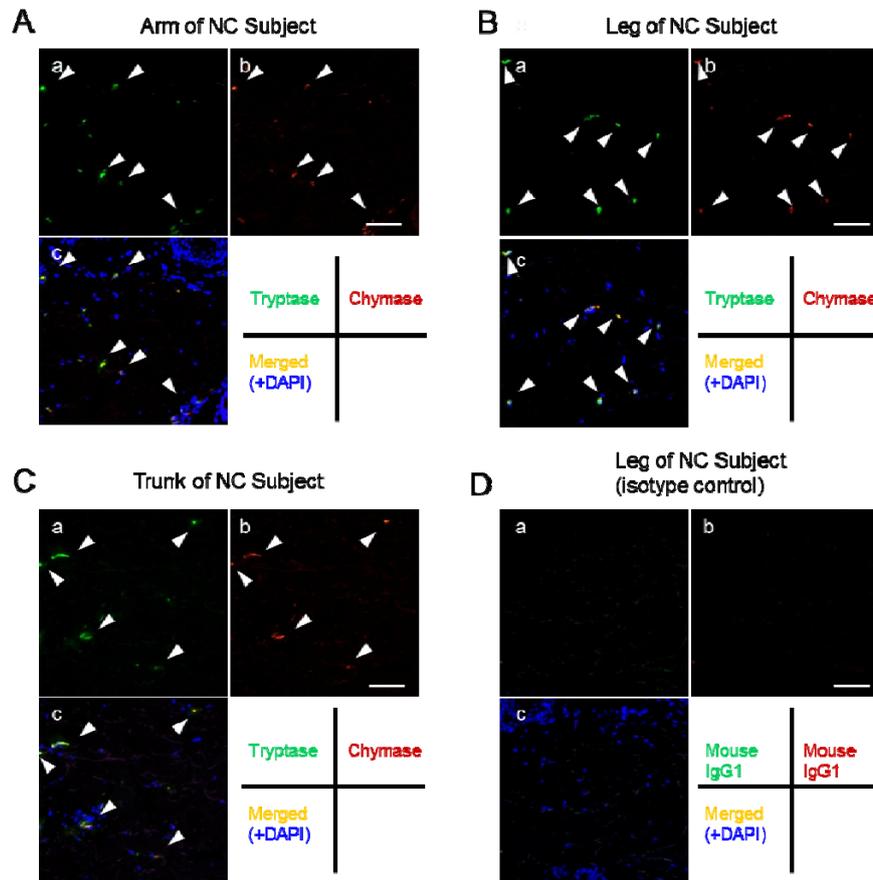
て、未処理のヒト皮膚由来培養マスト細胞（白のバー）、コントロールの shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞（グレーのバー）に比較し MrgX2 の shRNA が導入されたヒト皮膚由来培養マスト細胞（黒のバー）を MBP、EPO、EDN および A23187 で刺激した時のヒスタミン遊離量を示す。（n = 3 検体）値は、平均値±標準誤差として示す。
* $P < 0.05$ 。

7. 健常人と慢性特発性蕁麻疹患者の上肢、下肢、および体幹の皮膚組織におけるマスト細胞の phenotype の比較。

マスト細胞の phenotype が、部位により異なるか調べるため、健常人の上肢、下肢、および体幹の皮膚組織を免疫組織化学染色法によって、MC_Tの phenotype (トリプターゼ陽性) と MC_{TC}の phenotype (トリプターゼとキマーゼ共に陽性) の割合を比較した (図 7)。健常人の上肢、下肢、および体幹の皮膚組織における MC_{TC} phenotype の割合は、それぞれ 96.3%、93.4%、92.1%であった。さらに、慢性特発性蕁麻疹患者の上肢、下肢および体幹の皮膚組織における MC_{TC} phenotype の割合は、それぞれ 96.2%、93.6%、95.2%であった (図 7)。

小括：上肢、下肢、および体幹の皮膚マスト細胞の phenotype は、慢性特発性蕁麻疹患者と健常人ともに差はなかった。

図 7. 健常人と慢性特発性蕁麻疹患者の上肢、下肢、および体幹の皮膚組織におけるマスト細胞の phenotype の比較



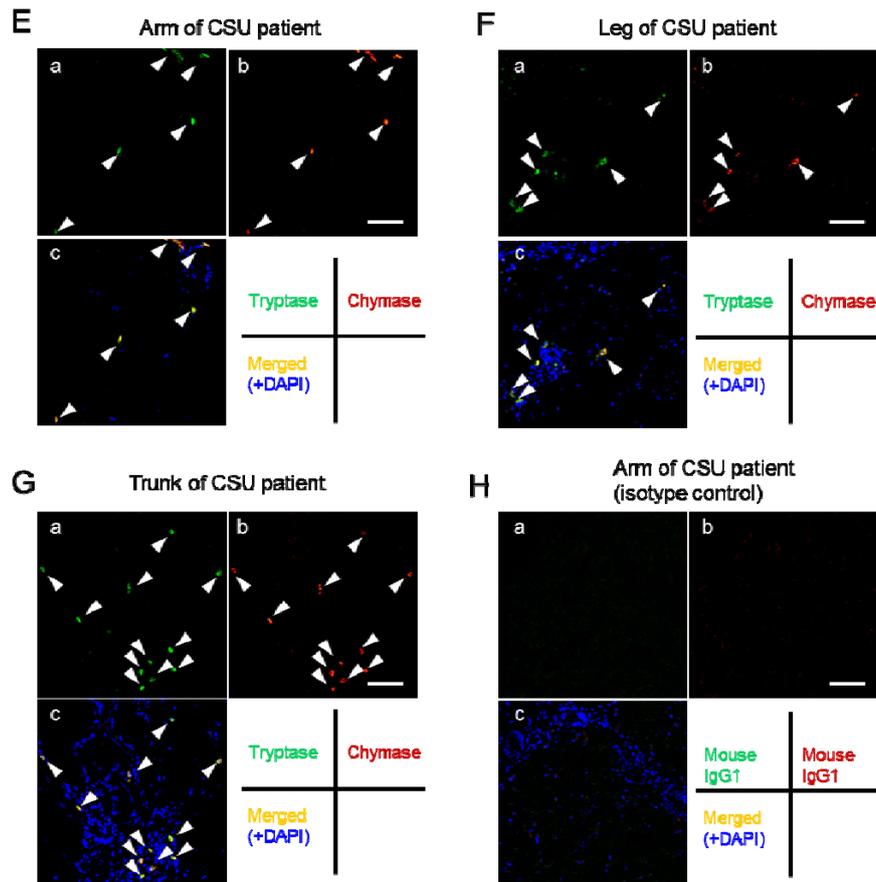


図 7： 健常人の上肢の皮膚組織 (A)、下肢の皮膚組織 (B)、体幹の皮膚組織 (C)、慢性特発性蕁麻疹の上肢の皮膚組織 (E)、下肢の皮膚組織 (F)、体幹の皮膚組織 (G) におけるトリプターゼ陽性細胞およびキマーゼ陽性細胞を示す。皮膚の免疫組織化学染色は、抗トリプターゼモノクローナル抗体 (緑,a)、抗キマーゼモノクローナル抗体 (赤,b)および DAPI (青,c) を使用し染色した。白矢印は、トリプターゼ、キマーゼ二重陽性細胞を示す。Bar = 50 μ m (D,H) は、アイソタイプコントロールとして、マウス IgG1 を用いた。

8. ヒスタミン、SP、IL-33 および TSLP と慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤による MrgX2 発現レベルの影響。

ヒスタミン、SP、IL-33、TSLP、慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤が、ヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 蛋白発現レベルに影響を与えるかを検討した。まず、慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤がヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 蛋白発現レベルに影響を与えるかをフローサイトメーターで解析した。それぞれの薬剤では MrgX2 蛋白発現レベルに影響はなかった (図 8A)。またヒスタミン、SP、IL-33、TSLP および TSLP と IL-33 を同時添加した場合それぞれでヒト皮膚由来培養マスト細胞の MrgX2 蛋白発現レベルをフローサイトメーターで解析した。ヒスタミン、SP およびサイトカインで MrgX2 蛋白発現レベルに影響はなかった (図 8B)。次に、ヒト皮膚由来培養マスト細胞からの SP 刺激で、慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤により、ヒスタミン遊離率に影響がないかを EIA 法を用いて検討した。慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤は SP 刺激でヒスタミン遊離率に抑制や増強などの影響を与えなかった (図 8B)。

小括：ヒスタミン、SP、IL-33、TSLP および慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤は MrgX2 発現レベルやヒスタミン遊離に影響を与えなかった。

図 8. ヒスタミン、SP、IL-33 および TSLP と慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤による MrgX2 発現レベルの影響

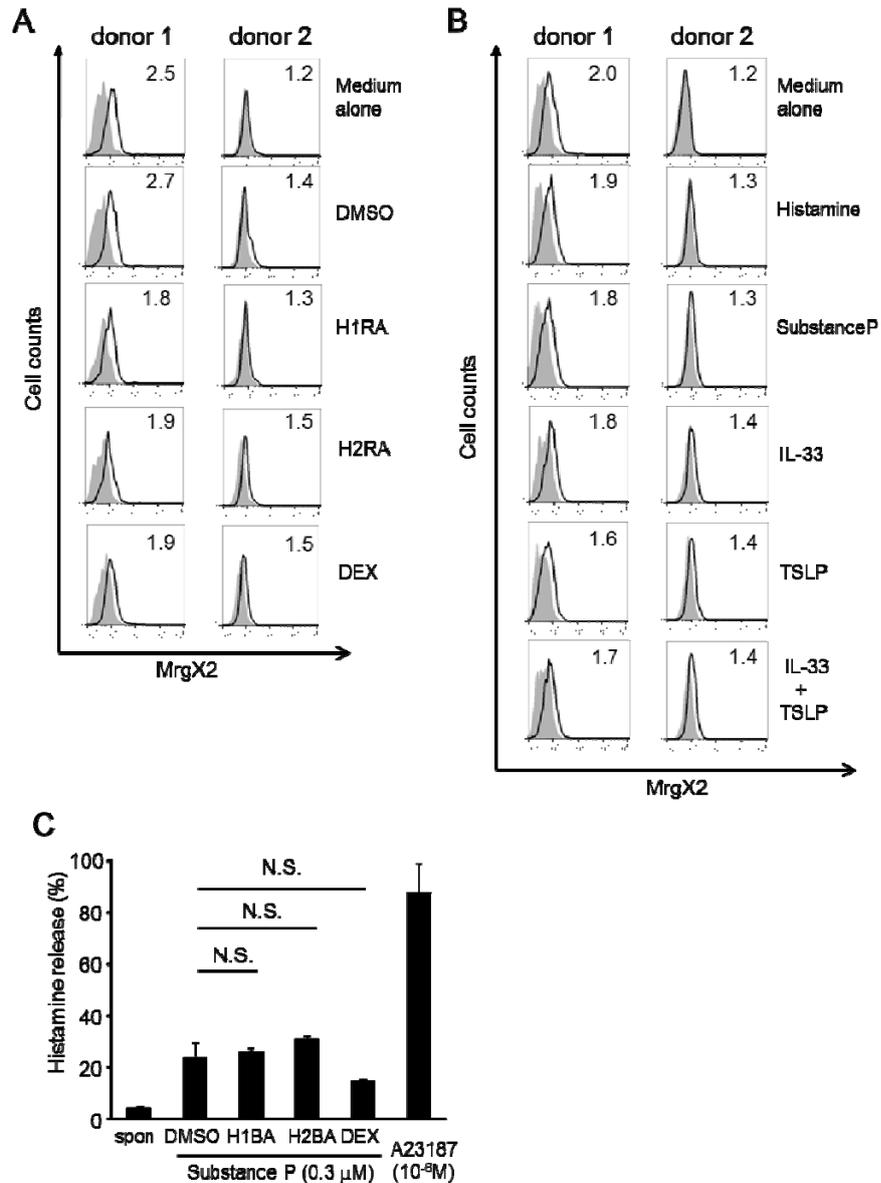


図 8 : (A)慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤によるヒト皮膚由来培養マスト細胞の細胞表面の MrgX2 発現レベルを、フローサイトメーターで解析した。(B) ヒスタミン、SP、IL-33 および TSLP のヒト皮膚由来培養マスト細胞の細胞表面の MrgX2 発現レベルの影響をフローサイトメーターで解析した。フローサイトメトリーで、実線は、抗 MrgX2 モノクローナル抗体で染色した細胞を示し、アイソ

タイプ免疫グロブリンで染色したマスト細胞は灰色のヒストグラムとして示す。右上の数字は MFI を示す。濃度はそれぞれ、オロパタジン塩酸塩 (H1RA : 10 $\mu\text{mol/L}$)、ファモチジン (H2RA : 10 $\mu\text{mol/L}$)、デキサメタゾン (DEX : 10 $\mu\text{mol/L}$)、ヒスタミン二塩酸塩 (10 $\mu\text{mol/L}$)、SP (3 $\mu\text{mol/L}$)、IL-33 (30 ng/mL)、TSLP (30 ng/mL)、および同時に使用した IL-33 と TSLP はそれぞれ (30 ng/mL) と (10 ng/ml) 。前処理時間は、オロパタジン塩酸塩、ファモチジンは 30 分間、デキサメタゾンは 16 時間、ヒスタミン二塩酸塩、SP、IL-33、TSLP、および同時に使用した IL-33 と TSLP は 24 時間であった。N.S. = not significant : 有意差なし (C) ヒト皮膚由来培養マスト細胞を慢性特発性蕁麻疹患者の治療に使用された薬剤で前処理し 0.3 $\mu\text{mol/L}$ SP で刺激し、ヒスタミン遊離率を測定した。(n = 3 検体)

9. ヒト末梢血由来培養マスト細胞と LAD2 細胞の細胞表面と細胞内の MrgX2 の発現、および MrgX2 mRNA 発現レベル。

LAD2 細胞と MrgX2 の mRNA を同程度で発現しているヒト肺由来培養マスト細胞は (図 1A)、細胞表面に MrgX2 を発現していなかった (図 1B)。MrgX2 蛋白質の細胞内の局在を確認するため、MrgX2 の mRNA を高値に発現するヒト末梢血由来培養マスト細胞を使用した (図 9A)。ヒト末梢血由来培養マスト細胞は、細胞表面に MrgX2 を発現していなかったが (図 9B)、BD Cytotfix/Cytoperm Kit を用いて細胞膜に穴をあけ、透過処理したマスト細胞では、細胞内に MrgX2 蛋白質を発現していた (図 9B)。さらに、免疫組織化学染色法を用いて MrgX2 蛋白質の細胞内発現を確認した (図 9C)。

小括：MrgX2 はヒト末梢血由来培養マスト細胞の表面上に発現せず、細胞質内に観察され、リガンドは細胞内受容体に結合しない事が明らかとなった。

図 9. ヒト末梢血由来培養マスト細胞と LAD2 細胞の細胞表面と細胞内の MrgX2 の発現、および MrgX2 mRNA 発現レベル

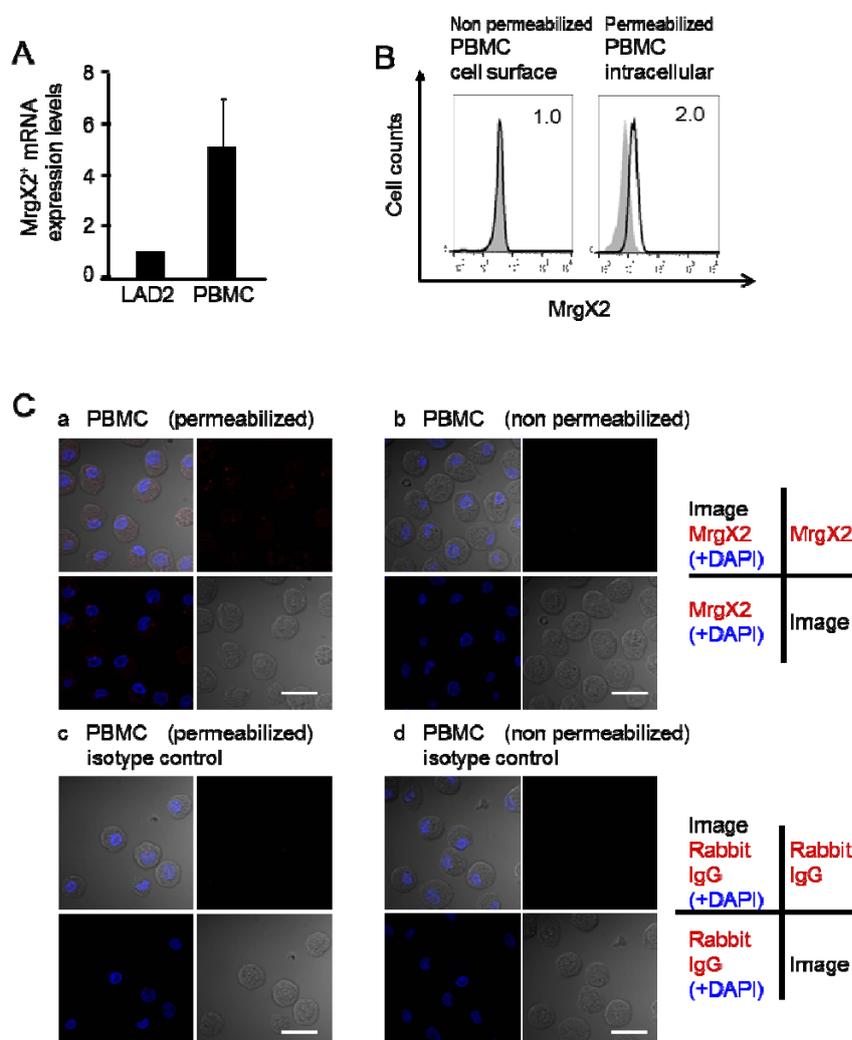


図 9 : (A) ヒト末梢血由来培養マスト細胞と LAD2 細胞の MrgX2 の発現。 LAD2 細胞中の MrgX2 mRNA の発現レベルを 1 とした。(n = 3 検体) 値は、平均値 ± 標準誤差を示す。(B) ヒト末梢血由来培養マスト細胞を使用し MrgX2 の細胞表面および細胞内発現レベルをフローサイトメーターで解析した。非透過性のマスト細胞 (左パネル) と透過処理したマスト細胞 (右パネル) で、実線は抗 MrgX2 モノクローナル抗体で、アイソタイプ免疫グロブリンのマスト細胞が灰色のヒストグラムとして示す。右上の数字は MFI を示す。(C)

透過処理したヒト血清由来培養マスト細胞は、抗 MrgX2 抗体 (赤,a) で免疫組織化学染色を行った。アイソタイプコントロールとして、ヒト血清由来培養マスト細胞をウサギ IgG で染色した細胞が示されている (c)。陰性コントロールは、非透過性ヒト血清由来培養マスト細胞を抗 MrgX2 抗体 (b) またはウサギ IgG (d) で免疫組織化学染色を行った。細胞の核は、DAPI (青) を使用し染色された。Bar = 10 μ m

考察

本研究の結果をまとめると、神経ペプチドおよび塩基性好酸球顆粒蛋白質による刺激によって MrgX2 を介してヒト皮膚マスト細胞は活性化され、MrgX2 は慢性特発性蕁麻疹の病因に関与している可能性が示唆された。

慢性特発性蕁麻疹患者の膨疹部で MrgX2 陽性トリプターゼ陽性細胞数 (図 2) は有意に増加していた。以前の報告と一致して^(18,44)、皮膚のマスト細胞数は、健常人と患者で有意差は認められなかった (図 2D)。健常人のマスト細胞の密度が組織標本の解剖学的部位によって異なることを考え、(図 2D) に示した部位を検討した。健常人の上肢、下肢、および体幹の組織(図 3G) においてマスト細胞の 1mm² 当たりの数を比較したところ (図 2D、図 3G)、マスト細胞の密度が皮膚組織部位に依存しないことがわかった。慢性特発性蕁麻疹患者 (n = 4) と健常人 (n = 8) の体幹の組織からのマスト細胞の 1mm² 当たりの個数を比較したところ、有意差は認められなかった (図 3H)。

マスト細胞の phenotype が、各部位によって異なるか調べるため、健常人の上肢、下肢、および体幹の皮膚組織における、MC_T の phenotype (トリプターゼ陽性) と MC_{TC} の phenotype (トリプターゼとキマーゼ共に陽性) を比較した (図 7)。健常人の上肢、下肢、および体幹の皮膚組織における MC_{TC} 表現型の割合は、それぞれ 96.3%、93.4%、92.1% であった。さらに、慢性特発性蕁麻疹患者の上肢、下肢および体幹の皮膚組織における MC_{TC} phenotype の割合は、それぞれ 96.2%、93.6%、95.2% であった (図 7)。マスト細胞の phenotype 各部位によって、慢性特発性蕁麻疹患者と健常人ともに差がないことがわかった。

慢性特発性蕁麻疹患者病変部でのマスト細胞の MrgX2 の発現増加の原因とその調節メカニズムは、今まで報告されて

いない。ヒスタミンは、SPと同様の局所環境で見られる神経伝達物質である。上皮細胞は thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を放出し皮膚感覚神経細胞を活性化し搔痒感を発生させる⁽⁴⁵⁾。さらに上皮細胞由来のサイトカイン IL-33 は直接ヒトマスト細胞を刺激し Th2 型サイトカインを生成させる⁽⁴⁶⁾。そのためヒスタミン、SP、TSLP、IL-33、および TSLP と IL-33 をヒト皮膚由来培養マスト細胞に同時添加し、MrgX2 発現レベルを検討したが、これらの神経伝達物質およびサイトカインは、MrgX2 の発現に有意な影響をおよぼさなかった (図 8B)。MrgX2 の発現調節機構を解明するためにさらなる研究が必要とされる。

健常人の年齢分布は慢性蕁麻疹患者に比べて相対的に高い傾向であったが、50 歳以上、50 歳未満の慢性蕁麻疹患者間の MrgX2 陽性マスト細胞の数とその割合に有意差はみられなかった (図 3)。健常人に関しても MrgX2 陽性マスト細胞数とその割合に 35 歳以上、35 歳未満に有意差はなかった (図 3)。

MrgX2 陽性神経細胞は、健常人と慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚組織において MrgX2 陽性細胞の 12%-13% を占め、マスト細胞数は健常人と慢性特発性蕁麻疹患者で有意差は無いが、慢性特発性蕁麻疹患者マスト細胞の MrgX2 の発現は健常人に比べ有意に増加しており、慢性特発性蕁麻疹患者に SP や VIP などの塩基性神経ペプチド皮内注射をすると、大きく、長時間膨疹反応がみられる現象を説明することができる^(4,5)。SP⁽⁴⁾、VIP⁽⁵⁾、やカルシトニン遺伝子関連ペプチド⁽⁴⁾などの様々な神経ペプチドが慢性蕁麻疹の病因に関与していると報告されているが、血中 SP の値は増加していないという報告がある⁽⁴⁷⁾。その報告によると健常人と慢性蕁麻疹患者の平均血中 SP 値はそれぞれ 290 と 222 pg/ml であった⁽⁴⁷⁾。マスト細胞は神経線維の近くに位置しており⁽⁴⁸⁾、蕁麻疹領域の神経終末での SP の濃度は、血中濃度よりもはるかに高い可能性がある。

MrgX2 はヒト臍帯血由来培養マスト細胞において SP、

VIP、コルチスタチン、ソマトスタチン、および化合物 48/80 を含む塩基性ペプチドの受容体であるという報告がある^(14,49)。これらの塩基性ペプチドは、構造的相同性を持つ⁽¹⁴⁾。MrgX2 発現細胞およびヒト臍帯血由来培養マスト細胞の活性化に必要なリガンドの有効濃度の中央値は 10^{-8} と 10^{-6} mol/L 間であり、典型的な神経ペプチドの受容体のような G 蛋白質共役型受容体の活性化濃度よりかなり高値である⁽¹⁴⁾。

なお、百日咳毒素感受性 G 蛋白質である MrgX2 を介し塩基性物質によりヒト臍帯血由来培養マスト細胞の活性化を惹起する⁽¹³⁾。百日咳毒素感受性 G 蛋白質 Gi3 は、MBP と相互作用し、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞活性化を誘導する⁽²³⁾。したがって、MrgX2 が塩基性好酸球顆粒蛋白質の受容体として機能するという仮説を立てた。

MBP および EPO は MrgX2 を介してヒト皮膚マスト細胞からヒスタミンを遊離させる。MBP、EPO の軽鎖、および EPO、EDN、および SP の重鎖の等電点の値は 10.9、10.7、10.8、8.9、および 9.4 であるため、高い等電点を示す蛋白質は、MrgX2 との相互作用をすると解釈できる。^(50,51,52,53)。実際に、強い塩基性アミノ酸（アルギニンおよびリジン）の割合は MBP、EPO の軽鎖、EPO および EDN の重鎖でそれぞれ 14.5%、15.3%、15.5% および 8.9% である^(50, 52)。

蕁麻疹病変で様々な度合で好酸球が存在し、活性化することがあるが^(1,43, 53)、血液の好酸球増加が検出されない場合においても、MBP は膨疹において測定されるという報告がある⁽¹⁹⁾。今回、膨疹病変でマスト細胞や好酸球を観察したが、マスト細胞と好酸球間の相互的な作用がおこり、双方向に影響をおよぼし、双方の細胞の活性化が強く起こり、炎症反応の永続化を起こす可能性があることを示唆している^(55,56,57)。また、近年、好酸球の活性化により産生された、血管内皮増殖因子や血液凝固因子が慢性特発性蕁麻疹を発症させる可能性があることが報告されている^(58,59,60)。さらに、Frigas ら

(61)は、気管支喘息患者の喀痰で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの MBP 濃度の増加を報告した。Ponikau ら(62)は、慢性鼻副鼻腔炎患者の鼻汁に最大 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MBP を含有していることを報告した。Nair ら(63)は、喘息患者の喀痰中の EPO は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と高値であることを報告した。MBP および EPO の皮膚組織濃度は、痰や鼻汁における濃度よりもさらに高くなる可能性がある。好酸球はアレルギー反応の後期や慢性期炎症部位に誘導されるので、MBP および EPO に対して MrgX2 を介する皮膚マスト細胞の活性化は、慢性特発性蕁麻疹患者の膨疹反応の後期あるいは慢性期に関連している可能性がある。

LAD2 細胞と MrgX2 の mRNA をほぼ同じ値で発現しているヒト肺由来培養マスト細胞は (図 1A)、その細胞表面に MrgX2 を発現していない (図 1B)。また肺マスト細胞は、SP によって活性化されない(7,8)。さらに SP はヒト末梢血由来培養マスト細胞を活性化しない(64)。ヒト肺由来培養マスト細胞の利用は限られていたため、MrgX2 蛋白質の細胞内の局在を確認する目的で、MrgX2 の mRNA を高値に発現するヒト末梢血由来培養マスト細胞を使用した (図 9A)。ヒト末梢血由来培養マスト細胞が、細胞表面に MrgX2 を発現していないことを確認した (図 9B)。また、MrgX2 蛋白質は透過処理したマスト細胞を使用し、MrgX2 は細胞内で発現していることを確認した (図 9B)。さらに、免疫組織化学染色法を用いて MrgX2 蛋白質の細胞内発現を確認した (図 9C)。これらの結果は、MrgX2 がヒト末梢血由来培養マスト細胞の表面上に発現せず、リガンドが細胞内受容体に結合しない事を示唆している。

まとめ

以上の事をまとめると、①ヒト皮膚マスト細胞が **MrgX2** を発現している。②健常人の皮膚組織と比較して慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚病変において **MrgX2** 陽性マスト細胞数が増加している。③ヒト皮膚マスト細胞は、**SP**、**MBP** および **EPO** に反応して、**MrgX2** を介し脱顆粒反応と **PGD₂** 産生が惹起される、ということが明らかになった。

これらの結果から、ヒト皮膚マスト細胞での **MrgX2** の阻害は、慢性特発性蕁麻疹の予防と治療への新しいアプローチを提案する。

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紀太博仁博士、布村聡博士、菊川裕介博士、藤谷靖志博士、黒田和道博士、葉山惟大博士、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内科系皮膚科学分野、照井正教授ならびに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。

引用文献

- 1 A.P. Kaplan, M. Greaves : Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*,39 :777-787 , 2009
- 2 M. Ferrer, J.M. Nunez-Cordoba, E. Luquin, C.E. Grattan, J.M. De la Borbolla, M.L. Sanz, L.B : Serum total tryptase levels are increased in patients with active chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*,40 :1760-1766 , 2010.
- 3 B.M. Vonakis, S.S. Saini : New concepts in chronic urticaria. *Curr Opin Immuno*,20 :709-716 , 2008
- 4 R. Borici-Mazi, S. Kouridakis, K. Kontou-Fili : Cutaneous responses to substance P and calcitonin gene-related peptide in chronic urticaria : the effect of cetirizine and dimethindene. *Allergy*,54 :46-56 , 1999
- 5 C.H. Smith, B. Atkinson, R.W. Morris, N. Hayes, J.C. Foreman, T.H. Lee : Cutaneous responses to vasoactive intestinal polypeptide in chronic idiopathic urticaria. *Lancet*,339 :91-93 , 1992
- 6 F. Bossi, B. Frossi, O. Radillo, M. Cugno, A. Tedeschi, P. Riboldi, R. Asero, F. Tedesco, C. Pucillo : Mast cells are critically involved in serum-mediated vascular leakage in chronic urticaria beyond high-affinity IgE receptor stimulation. *Allergy*,66 :1538-1545 , 2011

- 7 M.A. Lowman, R.C. Benyon, M.K. Church :
Characterization of neuropeptide-induced histamine
release from human dispersed skin mast cells. *Br J
Pharmacol*,95 :121-130 , 1988

- 8 M.A. Lowman, P.H. Rees, R.C. Benyon, M.K. Church :
Human mast cell heterogeneity : histamine release from
mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils,
and colon in response to IgE-dependent and
nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol*,81 :590-
597 , 1988

- 9 J.N. Pennefather, A Lecci, M.L. Candenas, E Patak,
F.M. Pinto, C.A. Maggi : Tachykinins and tachykinin
receptors: a growing family. *Life Sci*,74 :1445-1463 , 2004

- 10 M Kulka, CH Sheen, BP Tancowny, LC Grammer,
RP Schleimer : Neuropeptides activate human mast cell
degranulation and chemokine production.
Immunology.123 :398-410 , 2008

- 11 X. Dong, S. Han, M.J. Zylka, M.I. Simon, D.J.
Anderson : A diverse family of GPCRs expressed in
specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*,
106 :619-632 , 2001

- 12 P.M. Lembo, E. Grazzini, T. Groblewski, D. O'Donnell,
M.O. Roy, J. Zhang, C. Hoffert, J. Cao , R. Schmidt,
M. Pelletier, M. Labarre, M. Gosselin, Y. Fortin, D.
Banville,S.H. Shen, P. Ström, K. Payza , A. Dray, P.

Walker, S. Ahmad : Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat Neurosci*,5 :201-209 , 2002

13 K. Tatemoto, Y. Nozaki, R. Tsuda, S. Konno, K. Tomura, M. Furuno, H. Ogasawara, K. Edamura, H. Takagi, H. Iwamura, M. Noguchi, T. Naito : Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun*,349 :1322-1328 , 2006

14 S.W. Kashem, H. Subramanian, S.J. Collington, P. Magotti, J.D. Lambris, H. Ali : G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *Eur J Pharmacol*,668 :299-304 , 2011

15 M. Lampinen, M. Carlson, L.D. Hakansson, P. Venge : Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*,59 :793-805 , 2004

16 J. Bousquet, P.K. Jeffery, W.W. Busse, M. Johnson, A.M. Vignola : Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*,161 :1720-1745 , 2000

17 N. Haas, E. Toppe, B.M. Henz : Microscopic morphology of different types of urticaria. *Arch Dermatol*,134 :41-46 , 1998

18 S. Ying, Y. Kikuchi, Q. Meng, A.B. Kay, A.P. Kaplan : TH1/TH2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *J Allergy Clin Immunol*,109 :694-700 , 2002

19 M.S. Peters, A.L. Schroeter, G.M. Kephart, G.J. Gleich : Localization of eosinophil granule major basic protein in chronic urticaria. *J Invest Dermatol*,81 :39-43 , 1983

20 C.J. Spry, P.C. Tai, J. Barkans : Tissue localization of human eosinophil cationic proteins in allergic diseases. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 77 :252-254 , 1985

21 L. Juhlin, P. Venge : Eosinophilic cationic protein (ECP) in skin disorders. *Acta Derm Venereol*,71 :495-501 , 1991

22 V. Patella, G. de Crescenzo, I. Marino, A. Genovese, M. Adt, G.J. Gleich, G. Marone :Eosinophil granule proteins activate human heart mast cells. *J Immunol*,157 :1219-1225 , 1996

23 A.M. Piliponsky, G.J. Gleich, A. Nagler, I. Bar, F. Levi-Schaffer : Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the

membrane form of stem cell factor. *Blood*,101 :1898-1904 , 2003

24 A.S. Kirshenbaum, C. Akin, Y. Wu, M. Rottem, J.P. Goff, M.A. Beaven, et al : Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk Res*,27 :677-682 , 2003

25 S. Okumura, J. Kashiwakura, H. Tomita, K. Matsumoto, T. Nakajima, H. Saito, Y. Okayama : Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcepsilonRI. *Blood*,102 :2547-2554 , 2003

26 S.D. Mathias, S.C. Dreskin, A. Kaplan, S.S. Saini, S. Spector, K.E. Rosen : Development of a daily diary for patients with chronic idiopathic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol*,105 :142-148 , 2010

27 S.D. Mathias, R.D. Crosby, J.L. Zazzali, M. Maurer, S.S. Saini : Evaluating the minimally important difference of the urticaria activity score and other measures of disease activity in patients with chronic idiopathic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol*,108 :20-24 , 2012

28 G.J. Gleich, D.A. Loegering, K.G. Mann, J.E. Maldonado : Comparative properties of the Charcot-

Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J Clin Invest*,57 :633-640 , 1976

29 N.R. Slifman, D.A. Loegering, D.J. McKean, G.J. Gleich : Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol*,137 :2913-2917 , 1986

30 R.M. Ten, L.R. Pease, D.J. McKean, M.P. Bell, G.J. Gleich : Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med*,169 :1757-1769 , 1989

31 Y. Ohsawa, N. Hirasawa : The antagonism of histamine H1 and H4 receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and anti-inflammatory effects in NC/Nga mice. *Allergy*,67 :1014-1022 , 2012

32 N.A. Forward, S.J. Furlong, Y. Yang, T.J. Lin, D.W. Hoskin : Mast cells down-regulate CD4+CD25+ T regulatory cell suppressor function via histamine H1 receptor interaction. *J Immunol*, 183 :3014-3022 , 2009

33 S. Okumura, H. Sagara, T. Fukuda, H. Saito, Y. Okayama:FcepsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*,115 :272-279 , 2005

34 H. Subramanian, K. Gupta, Q. Guo, R. Price, H. Ali :

Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *J Biol Chem*, 286 :44739-44749 , 2011

35 Y. Ohsawa, N. Hirasawa : The antagonism of histamine H1 and H4 receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and anti-inflammatory effects in NC/Nga mice. *Allergy*, 67 :1014-1022 , 2012

36 N.A. Forward, S.J. Furlong, Y. Yang, T.J. Lin, D.W. Hoskin : Mast cells down-regulate CD4+CD25+ T regulatory cell suppressor function via histamine H1 receptor interaction. *J Immunol*, 183 :3014-3022 , 2009

37 A. Lowman, R.C. Benyon, M.K. Church : Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. *Br J Pharmacol*, 95 :121-130 , 1988

38 M.A. Lowman, P.H. Rees, R.C. Benyon, M.K. Church : Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol*, 81 :590-597 , 1988

39 S.R. Wilson, L. Thé, L.M. Batia, K. Beattie, G.E.

Katibah, S.P. McClain, M. Pellegrino, D.M. Estandian :
The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine
TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*,155 :285-295 ,
2013

40 M. Iikura, H. Suto, N. Kajiwara, K. Oboki, T. Ohno, Y.
Okayama, H. Saito, S.J. Galli, S. Nakae : IL-33 can
promote survival, adhesion and cytokine production in
human mast cells. *Lab Invest*,87 :971-978 , 2007

41 N. Kajiwara, T. Sasaki, P. Bradding, G. Cruse, H.
Sagara, K. Ohmori, H. Saito, C. Ra, Y. Okayama :
Activation of human mast cells through the platelet-
activating factor receptor, *J Allergy Clin
Immunol*,125 :1137-1145 , 2010

42 E. Allia, E. Tarabra, M. Volante, M. Cerrato, E.
Ghigo, G. Muccioli, M. Papotti : Expression of cortistatin
and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human
neuroendocrine tissues and related tumours. *J
Pathol*,207 :336-345 , 2005

43 R.A. Sabroe, E. Poon, G.E. Orchard, D. Lane, D.M.
Francis, R.M. Barr, M.M. Black, A.K. Black, M.W.
Greaves : Cutaneous inflammatory cell infiltrate in
chronic idiopathic urticaria: comparison of patients with
and without anti-FcepsilonRI or anti-IgE autoantibodies.
J Allergy Clin Immunol, 103 :484-493 , 1999

44 C.H. Smith, C. Kepley, L.B. Schwartz, T.H. Lee :

Mast cell number and phenotype in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*,96 :360-364 , 1995

45 S.R. Wilson, L. The, L.M. Batia, K. Beattie, G.E. Katibah, S.P. McClain, M. Pellegrino, D.M. Estandian, D.M. Bautista : The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*,155 :285-295 , 2013

46 M. Iikura, H. Suto, N. Kajiwara, K. Oboki, T. Ohno, Y. Okayama, H. Saito, S.J. Galli, S. Nakae : IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest*,87 :971-978 , 2007

47 A. Tedeschi, M. Lorini, R. Asero : No evidence of increased serum substance P levels in chronic urticaria patients with and without demonstrable circulating vasoactive factors. *Clin Exp Dermatol*, 30 :171-175 , 2005

48 A. Iwasaki, K. Inoue, S. Hukuda : Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the synovium and adjacent bone of the rat knee joint. *Clin Exp Rheumatol*,13 :173-178 , 1995

49 H. Subramanian, S.W. Kashem, S.J. Collington, H. Qu, J.D. Lambris, H. Ali : PMX-53 as a dual CD88 antagonist and an agonist for Mas-related gene 2 (MrgX2) in human mast cells. *Mol Pharmacol*,79 :1005-1013 , 2011

50 R.L. Barker, G.J. Gleich, L.R. Pease : Acidic

precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA. *J Exp Med*,168 :1493-1498 , 1988

51 R.L. Barker, D.A. Loegering, R.M. Ten, K.J. Hamann, L.R. Pease, G.J. Gleich : Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. *J Immunol*,143 :952-955 , 1989

52 K. Sakamaki, M. Tomonaga, K. Tsukui, S. Nagata : Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human eosinophil peroxidase. *J Biol Chem*,264 :16828-16836 , 1989

53 G.J. Gleich, C.R. Adolphson, K.M. Leiferman : The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med*,44 :85-101 , 1993

54 S.F. Natbony, M.E. Phillips, J.M. Elias, H.P. Godfrey, A.P. Kaplan : Histologic studies of chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*,71 :177-183 , 1983

55 Y. Minai-Fleminger, M. Elishmereni, F. Vita, M.R. Soranzo, D. Mankuta, G. Zabucchi, F. Levi-Schaffer : Ultrastructural evidence for human mast cell-eosinophil interactions in vitro. *Cell Tissue Res*,341 :405-415 , 2010

56 M. Elishmereni, H.T. Alenius, P. Bradding, S. Mizrahi, A. Shikotra, Y. Minai-Fleminger, D. Mankuta, R. Eliashar, G. Zabucchi, F. Levi-Schaffer : Physical interactions between mast cells and eosinophils: a novel

mechanism enhancing eosinophil survival in vitro.
Allergy,66 :376-385 , 2011

57 M. Elishmereni, I. Bachelet, A.H. Nissim Ben-Efraim, D. Mankuta, F. Levi-Schaffer : Interacting mast cells and eosinophils acquire an enhanced activation state in vitro. Allergy,68 :171-179 , 2013

58 M. Cugno, A.V. Marzano, A. Tedeschi, D. Fanoni, L. Venegoni, R. Asero : Expression of tissue factor by eosinophils in patients with chronic urticaria. Int Arch Allergy Immunol,148 :170-174 , 2009

59 A. Tedeschi, R. Asero, A.V. Marzano, M. Lorini, D. Fanoni, E. Berti, M. Cugno : Plasma levels and skin-eosinophil-expression of vascular endothelial growth factor in patients with chronic urticaria. Allergy,64 :1616-1622 , 2009

60 A.V. Marzano, A. Tedeschi, E. Berti, D. Fanoni, C. Crosti, M. Cugno : Activation of coagulation in bullous pemphigoid and other eosinophil-related inflammatory skin diseases. Clin Exp Immunol,165 :44-50 , 2011

61 E. Frigas, D.A. Loegering, G.O. Solley, G.M. Farrow, G.J. Gleich : Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. Mayo Clin Proc.56 :345-353 , 1981

62 J.U. Ponikau, D.A. Sherris, G.M. Kephart, E.B. Kern,

D.J. Congdon, C.R. Adolphson, M.J. Springett,
G.J. Gleich, H. Kita : Striking deposition of toxic
eosinophil major basic protein in mucus: implications for
chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*,116 :362-
369, 2005

63 P. Nair, S.I. Ochkur, C. Protheroe, K. Radford, A.
Efthimiadis, N.A. Lee, J.J. Lee : Eosinophil peroxidase in
sputum represents a unique biomarker of airway
eosinophilia. *Allergy*,68 :1177-1184 , 2013

64 X.S. Wang, S.W. Sam, K.H. Yip, H.Y. Lau :
Functional characterization of human mast cells cultured
from adult peripheral blood. *Int Immunopharmacol*,6 :
839-847 , 2006

研究業績

藤澤 大輔

I	発表	①一般発表	33	(共	33)
		②特別発表	1	(共	1)
II	論文	①原著論文	4	(共	4)
		②症例報告	5	(共	5)
		③総説	2	(共	2)
III	著書		なし		

以上

I 発表

①一般発表

1. 藤澤大輔, 藤平大介, 河野悟, 小池卓也, 乗松東吾, 大屋喜章, 篠美和, 吉田徹, 田中知博, 保刈岳雄, 相崎一雄, 川上新仁郎, 高野靖悟, 風間暁男: 糖原病に合併した巨大肝腫瘍の一例, 第 56 回日本農村医学会学術総会, 新潟, 2007 年 10 月
2. 藤澤大輔, 東郷香奈, 落合豊子, 西山宏幸, 高野祐策: 鯉の水槽が感染源と考えられた *M.marinum* による非結核性抗酸菌症, 日本皮膚科学会第 820 回東京地方会, 東京, 2008 年 9 月
3. 宮崎久美子, 松永晶江, 藤澤大輔, 井汲菜摘, 野口佳恵, 高橋昌五, 坂本久美子, 村井真由美, 岡田知善, 原弘之, 照井正, 桑名司: 小範囲の熱傷患者に合併した Toxic shock syndrome(TSS), 日本皮膚科学会第 820 回東京地方会, 東京, 2008 年 9 月
4. 藤澤大輔, 山内渉, 松永晶江, 岡田知善, 照井正, 生方公子: Toxic shock-like syndrome(TSLS), 日本皮膚科学会第 823 回東京地方会, 東京, 2009 年 1 月
5. 藤澤大輔, 大圃歌子, 照井正, 吉永和江: 石灰化を伴った血管平滑筋腫, 日本皮膚科学会第 824 回東京地方会, 東京, 2009 年 6 月
6. 葉山惟大, 稲富徹, 藤澤大輔, 照井正: 掌蹠膿疱症に伴う関節症状に対するシクロスポリン中用量(half-dose)内服療法の検討, 第 34 回日本乾癬学会, 東京, 2009 年 9 月
7. 藤澤大輔, 高柳たかね, 三橋真理子, 坂本久美子, 山内渉, 稲富徹, 照井正, 小松威彦: 趾間に生じた Bowen 病の 1 例, 日本皮膚科学会第 830 回東京地方会, 東京, 2010 年 6 月
8. 藤澤大輔, 篠島由一, 照井正: 乾癬治療に対するエキシマライトの有効性, 第 25 回日本乾癬学会学術大会, 山口, 2010 年 9 月
9. 車谷紋乃, 藤澤大輔, 光谷純郁, 稲富徹, 照井正, 武井正

- 美, 山本樹生, 高柳たかね, 松川吉博: SLE 加療中に SJS/TEN を生じた妊婦の 1 例, 第 27 回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会, 大阪, 2011 年 6 月
10. 藤澤大輔, 篠島由一, 照井正: アダリムマブの投与中断後再投与でも反応良好であった尋常性乾癬の一例, 第 26 回日本乾癬学会学術大会, 大阪, 2011 年 9 月
 11. 佐久間朋, 藤澤大輔, 照井正, 八木茂: 頭部に生じた Subcutaneous lobular capillary hemangioma の 1 例, 日本皮膚科学会第 841 回東京地方会, 東京, 2012 年 1 月
 12. 藤澤大輔, 照井正: 乾癬に対するレミケードの使用経験, 第 9 回城北地区皮膚科懇話会, 東京, 2012 年 4 月
 13. 畠田優子, 岡山吉道, 葉山惟大, 柏倉淳一, 藤澤大輔, 照井正, 羅智靖: 慢性蕁麻疹患者における血中自己反応性 IgE の検討, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012 年 12 月
 14. 藤澤大輔, 岡山吉道, 柏倉淳一, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 照井正, 羅智靖: ヒト皮膚マスト細胞に発現している MrgX2 受容体の慢性蕁麻疹の病態への関与, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012 年 12 月
 15. 藤澤大輔, 照井正: 当科アレルギー外来における慢性蕁麻疹の治療と研究について, 第 8 回スプリングセミナー, 東京, 2013 年 1 月
 16. 藤澤大輔, 照井正: 当科における慢性蕁麻疹の治療と研究, 第 10 回城北地区皮膚科懇話会, 東京, 2013 年 4 月
 17. 藤澤大輔, 照井正: 乾癬治療におけるアダリムマブ投与間隔延長について, 第 7 回東京乾癬研究会, 東京, 2013 年 8 月
 18. 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, 斎藤修, 徳橋泰明, 布村聡, 下川敏文, 羅智靖, 岡山吉道, : 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

19. 畠田優子, 照井正, 葉山惟大, 柏倉淳一, 坂本朋美, 藤澤大輔, 下川敏文, 布村聡, 羅智靖, 岡山吉道, : 慢性蕁麻疹患者における血中抗 dsDNA IgE 抗体価の有意な増加 (続報), 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013 年 11 月
20. 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 岡山吉道, 羅智靖 : 好中球分化誘導因子 C/EBP α の C-末端領域の解析, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013 年 11 月
21. 藤澤大輔, 照井正, 柏倉淳一, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 布村聡, 下川敏文, 羅智靖, 紀太博仁, 岡山吉道 : 好中球顆粒蛋白はヒト皮膚マスト細胞に発現している MrgX2 を介して脱顆粒を惹起する, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013 年 11 月
22. Okayama Yoshimitsu, Fujisawa Daisuke, Kashiwakura Junichi, Nunomura Satoshi, Shimokawa Toshibumi, Kita Hirohito, Ra Chisei : Identification of a receptor for eosinophil cationic protein on human skin mast cells, Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2013, Tokyo, 2013 December
23. Shimokawa Toshibumi, Nunomura Satoshi, Fujisawa Daisuke, Okayama Yoshimitsu, Ra Chisei : Analysis of C/EBP α C-terminal regulatory region in granulocytic differentiation, Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2013, Tokyo, 2013 December
24. 藤澤大輔, 岡山吉道, 柏倉淳一, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 羅智靖, 紀太博仁, 照井正 : MrgX2 を介したヒト皮膚マスト細胞の脱顆粒, 第 77 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 2014 年 2 月
25. 畠田優子, 岡山吉道, 柏倉淳一, 葉山惟大, 藤澤大輔, 坂本朋美, 羅智靖, 照井正 : 抗 dsDNA IgE 抗体価の慢性蕁麻疹患者血中での有意な増加, 第 77 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 2014 年 2 月
26. Toshibumi Shimokawa, Satoshi Nunomura, Daisuke Fujisawa, Chisei Ra : Analysis of C/EBP α C-terminal

in granulopoiesis, The Annual Meeting of The Japanese Society for Hematology, Tokyo, 2014 November

27. Fujisawa Daikuke, Hayama Koremasa, Kashiwakura Jun-ichi, Nunomura Satoshi, Ra Chisei, Okayama Yoshimitsu, Terui Tadashi : Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic spontaneous urticaria, 第 28 年表皮細胞研究会, 鹿児島, 2014 年, 12 月
28. Daikuke Fujisawa, Koremasa Hayama, Jun-ichi Kashiwakura, Hirohito Kita, Yusuke Kikukawa, Yasushi Fujitani, Tomomi Sasaki-Sakamoto, Kazumichi Kuroda, Satoshi Nunomura, Chisei Ra, Yoshimitsu Okayama, Tadashi Terui : Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the patients with severe chronic spontaneous urticaria, The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Osaka, 2014 December
29. 藤澤大輔, 照井正 : ストレスと蕁麻疹, 第 12 回城北地区皮膚科懇話会, 東京, 2015 年 4 月
30. 伊崎聡志, 布村聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 岡山吉道, 照井正 : 細胞膜発現 FcεRIα 鎖蛋白との反応性を利用した抗 FcεRIα 鎖抗体検出法の慢性蕁麻疹患者における有用性, 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015 年 5 月
31. 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 岡山吉道, 羅智靖 : 骨髄細胞における C/EBPα の C-末端領域の解析, 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015 年 5 月
32. Koremasa Hayama, Satoshi Nunomura, Satoshi Izaki, Daisuke Fujisawa, Yuko Hatada, Hideki Fujita, Chisei Ra, Yoshimichi Okayama, Tadashi Terui : Usefulness of Flow Cytometry Measurement of Reactivity Between FcRI on Gene-transfected CHO cells and Its Autoantibody in Chronic Spontaneous Urticaria, 23rd

World Congress of Dermatology, Vancouver, 2015

June

33. 西盛信幸, 藤澤大輔, 照井正 : Aquagenic palmoplantar keratoderma の 3 例 : 第 30 回角化症研究会, 東京, 2015 年 8 月

②特別発表

1. 藤澤大輔, 柏倉淳一, 布村聡, 紀太博仁, 菊川裕介, 藤谷靖志, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 照井正, 羅智靖, 岡山吉道 : 皮膚マスト細胞における Mas-related gene X2 について, 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015 年 5 月

II 論文

① 原著論文

1. Koremasa Hayama, Toru Inadomi, Daisuke Fujisawa, Tadashi Terui : A pilot study of medium-dose cyclosporine for the treatment of palmoplantar pustulosis complicated with pustulotic arthro-osteitis, *Eur J Dermatol*, 20 :758-762, 2010
2. Yuko Hatada, Jun-ichi Kashiwakura, Koremasa Hayama, Daisuke Fujisawa, Tomomi Sasaki-Sakamoto, Terui Tadashi, Chisei Ra, Yoshimitsu Okayama, : Significantly high levels of anti-dsDNA immunoglobulin E in sera and the ability of dsDNA to induce the degranulation of basophils from chronic urticaria patients, *Int Arch Allergy Immunol*, 161 :154-158, 2013
3. Toshibumi Shimokawa, Satoshi Nunomura, Daisuke Fujisawa, Chisei Ra : Identification of the C/EBP α C-terminal tail residues involved in the protein interaction with GABP and their potency in myeloid differentiation of K562 cells, *Biochim Biophys Acta*,

1829 :1207-1217, 2013

4. Daikuke Fujisawa, Jun-ichi Kashiwakura, Hirohito Kita, Yusuke Kikukawa, Yasushi fujitani, Tomomi Sasaki-Sakamoto, Kazumichi Kuroda, Satoshi Nunomura, Koremasa Hayama, Tadashi Terui, Chisei Ra, Yoshimiti Okayama : Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria, J Allergy Clin Immunol, 134:622-633, 2014

②症例報告

1. 藤澤大輔, 落合豊子, 東郷香奈, 西山宏幸, 高野祐策 : 鯉の水槽が感染源と考えられた *M.marinum* による非結核性抗酸菌症, 皮膚科の臨床, 52:161-164, 2010
2. 藤澤大輔, 篠島由一, 照井正 : 乾癬治療におけるエキシマライト療法の有効性, Visual Dermatology, 10:819-821, 2011
3. 藤澤大輔, 照井正 : ダーモスコピー所見, Visual Dermatology, 11:1022-1023, 2012
4. 佐久間朋, 藤澤大輔, 照井正 : 頭部に生じた皮下葉状毛細血管腫の一例, 皮膚科の臨床, 55:1074-1075, 2013
5. 車谷紋乃, 藤澤大輔, 光谷純郁, 稲富徹, 照井正, 武井正美, 山本樹生, 高柳たかね, 松川吉博 : SLE 加療中に Stevens-Johnson 症候群/中毒性表皮壊死症を発症した妊婦の 1 例, 臨床皮膚科, 68:684-688, 2014

② 総説

1. 岡山吉道, 藤澤大輔, 山田賢鎬, 権寧博, 橋本修, 浅野正岳, 斎藤修, 徳橋泰明, 照井正 : 関節リウマチおよび慢性蕁麻疹におけるマスト細胞を標的とした新規治療法の確立, 日本大学医学部総合医学研究所紀要, 2:15-27, 2014
2. 下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖 : IgA レセプター発現と顆粒球分化の転写調節機構, 臨床免疫・アレルギー科,

63:577-584, 2015

Ⅲ 著書

なし