

細胞外核酸を介したマスト細胞の活性化と炎症性腸疾患

倉島 洋介^{1,2}, 清野 宏^{1,3}, 國澤 純¹⁻³

1. はじめに

マスト細胞は、皮膚や粘膜といった体表面に多く存在しウイルスや細菌、寄生虫に対する感染防御を担う免疫担当細胞の一つとして知られている。一方で、花粉症や食物アレルギーなどのアレルギー疾患を引き起こす代表的悪玉細胞でもあり、さらには関節炎や接触性皮膚炎などの炎症性疾患においても炎症を悪化させる一因としても考えられている。マスト細胞による感染防御反応とアレルギー・炎症反応のいずれにおいても脱顆粒様の細胞形態変化が観察されていることから、さまざまな局面におけるマスト細胞の活性化シグナルの理解が、ワクチンアジュバントの開発など有効な感染免疫の惹起法やアレルギー・炎症性疾患の予防・改善・治療法の開発につながると期待されている。

本稿では、1970年代に脱顆粒様のマスト細胞が増加していることが報告されたものの、機能については多くが不明であった炎症性腸疾患におけるマスト細胞の役割について、細胞外核酸を介したマスト細胞の機能制御を中心に筆者らの最近の知見について紹介したい。

2. マスト細胞の活性化と炎症性腸疾患

クローン病と潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患

¹ 東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

² 独立行政法人医薬基盤研究所ワクチンマテリアルプロジェクト (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8)

³ 東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

Purinergic signaling mediates mast cell activation in intestinal inflammation

Yosuke Kurashima^{1,2}, Hiroshi Kiyono^{1,3} and Jun Kuni-sawa¹⁻³ (¹Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan; ²Laboratory of Vaccine Materials, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; ³International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

は、免疫学的異常を伴う原因不明の慢性炎症疾患であり、若年層において発症が多く認められる。本来、欧米で多く観察される疾患であったが、わが国での罹患率も近年爆発的に増加している。腸管合併症（瘻孔、狭窄、膿瘍）と腸管外合併症（関節炎、虹彩炎、結節性紅斑）が知られており、5-アミノサリチル酸製剤、副腎皮質ステロイド、血球成分除去、免疫抑制剤、抗腫瘍壊死因子 α (TNF α) 受容体拮抗薬などの薬物療法が病状の改善に有効であるが、完治に至るのは難しい。一方、発症要因ははっきりとはしていないものの、IL-23やNOD2をはじめとした免疫関連分子の遺伝的素因に加え、腸内細菌や食生活、生活環境といった環境要因の影響が大きいと考えられている^{1,2}。

クローン病および潰瘍性大腸炎患者の病変部位において、マスト細胞の増加と脱顆粒といった細胞形態の変化が観察されている³。また最近では、炎症性腸疾患を呈する患者の組織片や血中にマスト細胞から放出されたマスト細胞トリプターゼが多く検出されることも報告されている³。これらの臨床的知見から炎症性腸疾患におけるマスト細胞の関与が考えられている。マウスモデルを用いたマスト細胞の解析についても、マスト細胞を欠損したマウスやラットを用いた研究が盛んに行われている。1981年北村幸彦博士らにより見いだされたWBB6F1/kit-Kit^w/Kit^{wv}は、マスト細胞の分化に必須である幹細胞因子の受容体であるc-kitが欠損しているマウスであり、30年以上有効なマスト細胞欠損マウスとして用いられてきた。WBB6F1-Kit^{w/wv}マウスはハプテン誘導性腸炎モデルにおいて抵抗性を示すことがKraneveldらにより報告されており、これにはマスト細胞由来のTNF α が炎症の増悪化に寄与していることがわかっている⁴。しかしWBB6F1-Kit^{w/wv}マウスでは、腸管の恒常性維持に必須である $\gamma\delta$ T細胞の減少が認められ、その影響を考慮しなくてはならない。これに対して、c-kitの転位によりマスト細胞を欠損しているC57BL/6-Kit^{sh/sh}マウスでは腸管の $\gamma\delta$ T細胞が野生型マウスと同数存在するため、腸管免疫の研究にはC57BL/6-Kit^{sh/sh}マウスがより適していると考えられるが⁵、c-kitの欠損・転位は蠕動運動をつかさどるカハール細胞などにも影響を及ぼすことから、最近の研究ではさらに選択的にマスト細胞を欠損したマウスの併用が必須となりつつある。現在、ジフテリア毒素(DT)の受容体(DTR)を用いたコンディショナル

欠損マウス (toxin receptor mediated conditional cell knock out: TRECK マウス) やマスト細胞プロテアーゼをコードする遺伝子を用いたコンディショナル欠損マウスなどが新たなマスト細胞欠乏マウスとして開発されている⁵⁾。我々は、C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh} マウスおよび新たに久保らによって構築された *mast cell specific-TRECK* (MaS-TRECK) マウスを用いて腸炎におけるマスト細胞の働きについて検証した。MaS-TRECK マウスは IL-4 遺伝子座のイントロン 2 に存在するエンハンサー (HS2 あるいは IE 領域) がマスト細胞特異的に働くことを利用し、DTR をマスト細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスである。つまり、MaS-TRECK マウスに DT を投与することでマスト細胞を選択的に除去できる。これらのマウスを用いた実験の結果、C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh} マウスと MaS-TRECK トランスジェニックマウスともに体重減少や炎症細胞の浸潤などの腸炎発症に伴う病態が軽減することが見いだされた⁶⁾。すなわち Kraneveld らの結果と同様、マスト細胞は炎症性腸疾患の発症において炎症促進因子として働いていることが示された。

これらの臨床的・実験的証拠から考えると、炎症部位のマスト細胞の活性化機序のメカニズムを知ることは炎症性腸疾患の病態形成の詳細を知る手がかりになると推察される。筆者らは、これまで腸管のマスト細胞の組織浸潤機構、アレルギー疾患の治療標的分子の探索、組織特異性の獲得機序といったマスト細胞バイオロジーの研究に取り組んでおり、その中の一つの取り組みとしてマスト細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を行っている。筆者らが作製したマスト細胞特異的抗体の一つである 5A9 抗体は、定常状態ではマスト細胞の顆粒膜に局在し、脱顆粒反応に伴い細胞膜へと局在を変える CD63 分子を認識する抗体である。そのため、5A9 抗体は、活性化マスト細胞を検出する有効なツールとなる。実際に *in vitro* でマスト細胞を IgE + 抗原もしくはカルシウムイオノフォアで刺激すると、5A9 抗体に反応性を示すマスト細胞が増加する⁶⁾。そこで、5A9 抗体を用いて、腸炎発症時におけるマスト細胞の活性化について検証した。その結果、腸炎の発症に伴い 5A9 抗体に反応性を示す CD63 陽性マスト細胞の割合が上昇していることが明らかとなった。マスト細胞を活性化する経路として、抗原と IgE 抗体による架橋反応があげられる。さらに免疫グロブリン遊離 L 鎖がマスト細胞を活性化させることが報告されており、クローン病患者においては血清中ならびに腸管組織内においても免疫グロブリン遊離 L 鎖の産生が亢進していることが示されている⁴⁾。これらのことから IgE や免疫グロブリン遊離 L 鎖といった抗体分子を介した活性化機構の存在が考えられたが、T 細胞や B 細胞が欠損したマウスにおいても、炎症性腸疾患が野生型マウスと同様に発症し、CD63 陽性活性化マスト細胞も同じ

ように大腸組織で観察されたことから、抗体分子に依存しないマスト細胞の活性化機序が存在していると考えられた。

上記の解析に併せ、その他の抗体の抗炎症活性を検証したところ、1F11 抗体が炎症性腸疾患モデルにおいて、活性化した腸管マスト細胞の数を減少させ、かつ炎症病態も改善することが判明した⁶⁾。免疫沈降法および質量分析法により 1F11 抗体の認識分子を探索したところ、細胞外のアデノシン三リン酸 (ATP) を認識する P2X7 受容体が同定された。この発見が、我々が細胞外核酸によるマスト細胞の機能調節の解析に取り組むきっかけとなった。

3. 細胞外核酸によるマスト細胞の活性化調節機構

ATP は細胞内において解糖系やクエン酸回路により産生されるエネルギー物質として機能する。一方で 60 年ほど前に Burnstock により ATP が細胞外において神経伝達物質として働き、細胞表面上に受容体があるという purinergic hypothesis が提唱された^{7,8)}。その後、細胞外 ATP の受容体群として、P2X 受容体や P2Y 受容体が次々とクローニングされ、生体内における細胞外 ATP の多彩な役割が示されている^{7,8)}。イオンチャネル型の P2X 受容体は、P2X1 から P2X7 までの七つのサブタイプが知られており、それぞれのサブタイプがホモ三量体もしくはヘテロ三量体を構成する (図 1)。P2X 受容体は、感覚機能、筋肉収縮、炎症反応に関与していることから神経疾患、心血管疾患、炎症性疾患などのさまざまな疾患に対する治療薬の標的として注目されている^{9,10)}。その一つである P2X7 受容体は、他の P2X 受容体に比べ、細胞内 C 末端が長く、ATP 刺激により細胞表面上に pore を形成し細胞死を誘導することが知られている^{7,8,10)}。この細胞内 C 末端の機能を抑制することで pore の形成阻害ならびに疼痛が抑制されることが報告されている^{7,8,10)}。また ATP 刺激により活性酸素の産生と K⁺ efflux 経路を介して NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こし最終的に IL-1β や IL-18 といったサイトカインの産生が導かれる^{7,8,10)}。

細胞外の ATP は、組織損傷を免疫系に警告する危険シグナルとしても働く。喘息を罹患しているヒトやマウスでは、気道内に ATP が蓄積されており、好酸球の集積の促進因子として働いていることが報告されている^{7,8)}。また移植片対宿主病 (GVHD) においても体腔内に細胞外 ATP の蓄積が検出されている^{7,8)}。我々の解析から、腸炎を発症したマウスにおいても、大腸組織における ATP の量が増加していることが示されている⁶⁾。腸管における細胞外 ATP については、T 細胞もしくは樹状細胞へ作用し、炎症性の Th17 細胞の誘導に働くことや腸管神経細胞死を導き蠕動運動の減弱に働くことが報告されている⁷⁾ (図 2)。ま

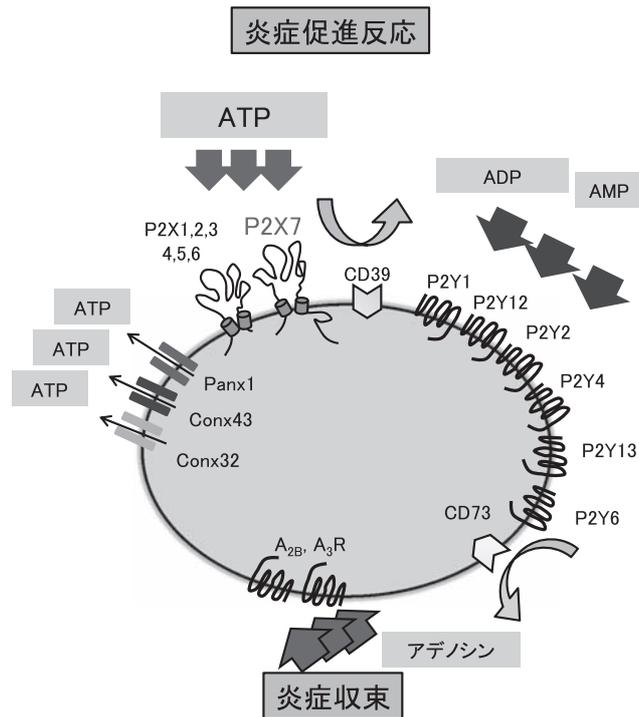


図1 細胞外核酸と受容体・代謝機序

Pannexin-1 (Panx1) や Connexin32, 43 (Conx32, 43) といったヘミチャネルを介して細胞外に放出された ATP は P2X 受容体ならびに P2Y 受容体に認識される。また、CD39, CD73 といった代謝酵素の作用を受け細胞外 ADP-P2Y 受容体ならびにアデノシン-アデノシン受容体を介した反応が導かれる。

た細胞外 ATP を加水分解する酵素群 (CD39, CD73) を欠損するマウスでは炎症が増悪化することが示されていることから、細胞外 ATP の腸炎への関与が深く示唆されている^{8,11)}。

P2X7 受容体を認識する 1F11 抗体を用いた解析から、大腸粘膜固有層に存在する免疫細胞のうちマスト細胞が最も高く P2X7 受容体を発現しており、ATP でマスト細胞を刺激すると細胞表面上の CD63 の発現の亢進、 β -ヘキソサミニダーゼの産生、ケモカイン (CCL2 や CXCL2)、サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF α)、脂質メディエーター (ロイコトリエン C4, D4) が P2X7 受容体依存的に産生される^{6,12)}(図2)。また細胞外 ATP によるこれらのメディエーターの産生が 1F11 抗体によって抑制されることも確認された。マスト細胞に発現する P2X7 受容体の腸炎発症に対する重要性を検討する目的で、マスト細胞欠損マウスに野生型もしくは P2X7 受容体を欠損したマスト細胞を再構築し腸炎の誘導を行ったところ、P2X7 受容体欠損マスト細胞を移入したマウスでは、腸管の肥厚に伴う短縮や好中球などの浸潤といった炎症反応が低レベルであった。マスト細胞の活性化についても、P2X7 受容体欠損マスト細胞で再構築した群では低レベルであることが確認された。以上

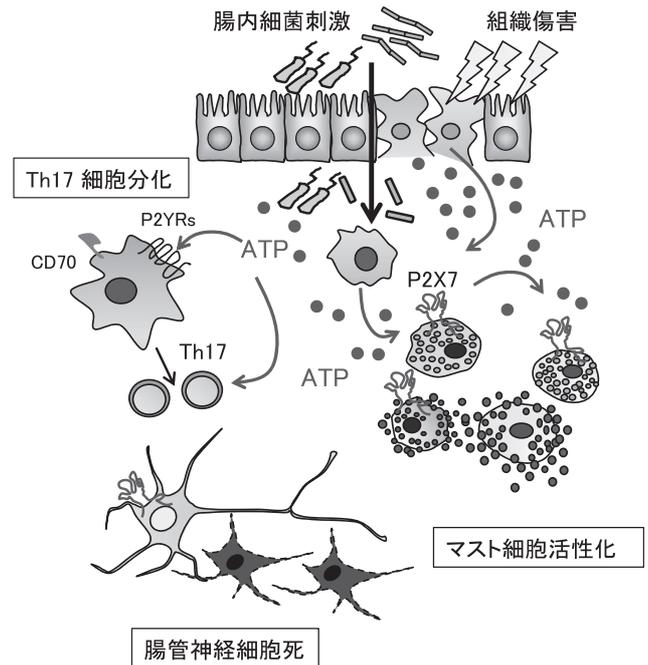


図2 炎症性腸疾患における細胞外 ATP の作用

組織傷害、腸内細菌、免疫細胞の活性化を介して細胞外に産生・放出された ATP は樹状細胞などの抗原提示細胞もしくは T 細胞に直接作用し、炎症性の Th17 細胞を誘導する。さらに、腸管神経細胞死を引き起こし蠕動運動の減弱に働く。また、マスト細胞の活性化も誘導し、さまざまな炎症性メディエーターの産生を促す。

のことから、マスト細胞が細胞外 ATP-P2X7 受容体経路を介して活性化し、炎症の増悪化を導くことが示され、細胞外核酸-受容体を標的とした疾患制御の可能性が示された(図3)。最近、本研究成果に関連し、腸炎発症時における P2X7 受容体の発現増強や腸炎における P2X7 阻害剤の有効性について相次いで報告がなされ、P2X7 受容体を標的とした新たな治療法の確立が期待されている^{13,14)}(図3)。

4. マスト細胞による細胞外 ATP の増幅および反応性亢進作用

前述のように、細胞外 ATP の加水分解酵素群 (CD39, CD73) を欠損するマウスでは炎症が増悪化することが報告されている (図1)。細胞外 ATP はこれらの代謝酵素の働きにより、速やかに ATP→ADP→AMP→アデノシンに代謝される^{8,11)}。細胞外 ATP のクリアランスは炎症の収束に重要であり、アデノシン受容体である A_{2B} や A₃ 受容体を欠損するマウスでは腸炎が増悪化することが示されている¹¹⁾。このように、生体において細胞外 ATP は ADP などに速やかに代謝されることから、我々は細胞外 ATP 代謝物に対するマスト細胞の反応性についても解析を試みた。

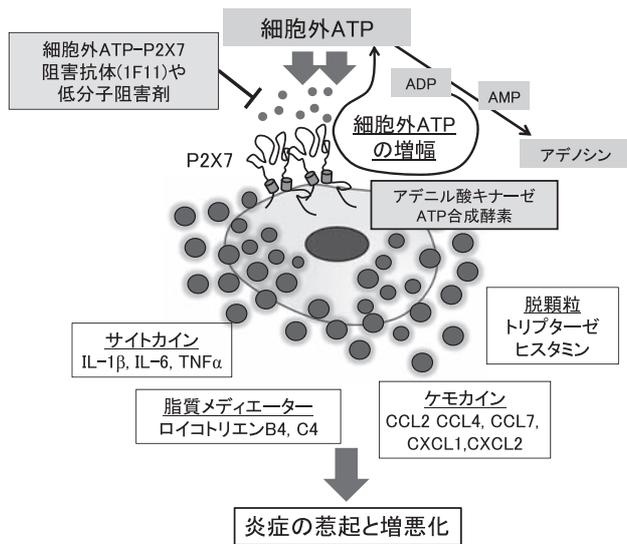


図3 細胞外核酸 ATP を介したマスト細胞の活性化

細胞外 ATP が産生・放出された後、P2X7 を介してマスト細胞が活性化される。脱顆粒に伴うトリプターゼなどのプロテアーゼやヒスタミンの放出、サイトカイン、ケモカイン、脂質メディエーターが産生される。細胞外 ATP は ADP、AMP、アデノシンへと代謝されるが、マスト細胞はアデニル酸キナーゼ、ATP 合成酵素を介して ATP を増幅する。

興味深いことに細胞外 ATP のみならず、細胞外 ADP によってもマスト細胞の活性化は誘導されることが示された⁶⁾。P2X7 受容体を欠損するマスト細胞では ATP のみならず ADP に対する活性化が起こらないことから、ADP のみの刺激においても P2X7 依存的にマスト細胞が活性化することが示された。そこで、ADP 刺激による ATP 放出の可能性について ATP 放出チャネルとして知られている Pannexin-1 や Connexin32, 43 ヘミチャネルの発現を解析したところ (図1)、マスト細胞ではほかの免疫細胞群に比べこれらのヘミチャネルの発現は低レベルであり、さらにヘミチャネルを阻害しても ADP によるマスト細胞活性化に変化はみられなかった⁶⁾。そこで、次に細胞外における ADP→ATP 変換の関与について検討した。ADP→ATP 変換に関与する酵素として細胞膜近傍などに存在するアデニル酸キナーゼや ATP 合成酵素、ヌクレオシドジホスホキナーゼが報告されており、これら酵素群の阻害剤として diadenosine pentaphosphate (AD2P5)、オリゴマイシン、UDP が用いられている⁶⁾。AD2P5 およびオリゴマイシン添加により ADP に対する反応性が低下したことから、さらにアデニル酸キナーゼのノックダウン細胞でも同様の反応性低下が確認されたことから、マスト細胞の細胞外もしくは細胞膜近傍に存在する ATP 変換酵素 (アデニル酸キナーゼと ATP 合成酵素) の働きにより細胞外 ADP が ATP へと変換され P2X7 受容体を介した活性化が行われていると考えられる (図3)。これは炎症の誘因物質である細胞外 ATP の細胞外増幅と、細胞外 ADP などの細胞外 ATP 代謝物に

対する P2X7 の反応性の亢進といったマスト細胞による新たな炎症促進反応であると考えられる (図3)。

5. おわりに

本稿ではマスト細胞の P2X7 を介した細胞外 ATP の認識と活性化、さらには炎症性腸疾患との関連について概説した。マスト細胞は古くから組織特有の性質を示すことが知られており (粘膜型・結合組織型)、それが組織内在性の線維芽細胞などによって調整されていることが明らかとなっている¹⁵⁾。これに関連し、筆者らは最近、マスト細胞に発現する P2X7 受容体の発現も組織間で異なり、皮膚のマスト細胞では、皮膚線維芽細胞との相互作用により、P2X7 受容体が低く保たれているのを見いだした¹⁵⁾。これは、細胞外核酸受容体の発現に組織選択性が存在することを示す結果であり、P2X7 受容体の発現調節機構の理解が再燃や寛解を繰り返す慢性的な炎症疾患の発症機序を明らかにするきっかけとなると期待される。今後、細胞外 ATP をはじめとした細胞外核酸によるマスト細胞の活性化・抑制シグナルの理解が深まり、より優れたアレルギー・炎症性疾患の予防・改善・治療法が開発されることを期待する。

- 1) Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R.S. (2010) *Annu. Rev. Immunol.*, 28, 573-621.
- 2) Kurashima, Y., Goto, Y., & Kiyono, H. (2013) *Eur. J. Immunol.*, 43, 3108-3115.
- 3) Hamilton, M.J., Sinnamon, M.J., Lyng, G.D., Glickman, J.N., Wang, X., Xing, W., Krilis, S.A., Blumberg, R.S., Adachi, R., Lee, D.M., & Stevens, R.L. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 290-295.
- 4) Rijniere, A., Redegeld, F.A., Blokhuis, B.R., Van der Heijden, M.W., Te Velde, A.A., Pronk, I., Hommes, D.W., Nijkamp, F. P., Koster, A.S., & Kraneveld, A.D. (2010) *J. Immunol.*, 185, 653-659.
- 5) Reber, L.L., Marichal, T., & Galli, S.J. (2012) *Trends Immunol.*, 33, 613-625.
- 6) Kurashima, Y., Amiya, T., Nochi, T., Fujisawa, K., Haraguchi, T., Iba, H., Tsutsui, H., Sato, S., Nakajima, S., Iijima, H., Kubo, M., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2012) *Nat. Commun.*, 3, 1034. doi: 10.1038/ncomms2023.
- 7) Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H.K. (2014) *Nature.*, 509, 310-317.
- 8) Junger, W.G. (2011) *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 201-212.
- 9) Ochoa-Cortes, F., Liñán-Rico, A., Jacobson, K.A., & Christofi, F.L. (2014) *Inflamm. Bowel Dis.*, 20, 1259-1287.
- 10) Burnstock, G. (2013) *Eur. J. Pharmacol.*, 716, 24-40.
- 11) Colgan, S.P. & Eltzschig, H.K. (2012) *Annu. Rev. Physiol.*, 74, 153-175.
- 12) Kurashima, Y. & Kiyono, H. (2014) *Exp. Mol. Med.*, 46, e83. doi: 10.1038/emmm.2014.7
- 13) Marques, C.C., Castelo-Branco, M.T., Pacheco, R.G., Buongusto, F., do Rosário, A. Jr., Schanaider, A., Coutinho-Silva, R., & de Souza, H.S. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, 1842,

- 65-78.
- 14) Neves, A.R., Castelo-Branco, M.T., Figliuolo, V.R., Bernardazzi, C., Buongusto, F., Yoshimoto, A., Nanini, H.F., Coutinho, C.M., Carneiro, A.J., Coutinho-Silva, R., de Souza, H.S. (2014) *Inflamm. Bowel Dis.*, 20, 444-457.
- 15) Kurashima, Y., Amiya, T., Fujisawa, K., Shibata, N., Suzuki, Y., Kogure, Y., Hashimoto, E., Otsuka, A., Kabashima, K., Sato, S., Sato, T., Kubo, M., Akira, S., Miyake, K., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2014) *Immunity*, 40, 530-541.

著者寸描

●倉島洋介 (くらしま ようすけ)



東京大学医科学研究所炎症免疫学分野・助教，独立行政法人医薬基盤研究所ワクチンマテリアルプロジェクト・協力研究員，広島大学歯学部非常勤講師。医学博士。

■略歴 1980年フランスパリに生る。
2005年明治大学農学部農学科卒業，東京大学大学院医学系研究科修士，博士課程修了，日本学術振興会特別研究員 DC1，PDを経て13年11月より現職。

■研究テーマ 粘膜免疫。マスト細胞。

■抱負 初志貫徹。

■ウェブサイト http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/EnMen/index_j.html

■趣味 空手道。