I 型アレルギー反応と炎症

末 村 正 樹*

Immediate-type hypersensitivity and Fc receptor for immunoglobulin E Monoclonal antibodies, 1-7, 3-5 and 8-30, specific to Fc_ϵ receptor ($Fc_\epsilon R$) on human B cells were established. The two monoclonals (1-7 and 8-30) were directed to the IgE binding site of $Fc_\epsilon R$, and the other monoclonal (3-5) recognized the same molecules, but a different epitope. The molecules recognized by these monoclonals had M.W. of 46 Kd. as determined by SPS-PAGE analysis.

By employing these monoclonals, the distribution of $Fc_\epsilon R^+$ cells was studied in various lymphoid tissues, and the results showed that $Fc_\epsilon R$ is a B cell specific differentiation marker confined to mature $\mu^+\delta^+$ B cells and disappear after class-switching. The lymphokine responsible for $Fc_\epsilon R$ expression was BSF-1 (IL-4). It was also found that $Fc_\epsilon R$ expression on peripheral B cells was much augmented in atopic patients than normals.

We isolated and sequenced a cDNA clone encoding the $Fc_\epsilon R$. The deduced protein sequence revealed that $Fc_\epsilon R$ consists of 321 amino acids, and is oriented with its N-terminus on the cytoplasmic side and its c-terminus on the outside of the cell. This molecule showed striking sequence homology with chicken asialoglycoprotein receptor, suggesting a possible role for $Fc_\epsilon R$ in endocytosis.

Masaki Suemura*

*The Third Department of Internal Medicine, Osaka University Hospital

key words: immediate-type hypersensitivity, IgE, Fc_ϵ receptor, BSF-1/IL-4

I 型アレルギー反応は抗原(アレルゲン)による IgE 抗体の誘導にはじまる。産生された IgE 抗体はマスト細胞、好塩基球あるいは好酸球や血小板などの IgE に対するリセプター ($Fc_\epsilon R$) を有する細胞に結合し、それらの細胞を感作する。つぎに、再び生体がアレルゲンに暴露されると感作細胞の活性化が引き起こされ、ロイコトリエン(LT)、プロスタグランディン(PG)、血小板活性化因子(PAF)、ヒスタミンなど、多様な化学伝達物質の産生や遊離が起こり、多彩な臨床症状を呈するに至る(図 1)。

IgE 抗体はこの一連の反応の引き金と考えられるが、健康人では他のクラスの免疫グロブリンの $10^4 \sim 10^5$ 分の 1 と、きわめて低値に保たれており、アレルゲンによる刺激が加わってもほとんど IgE 抗体の産生は起こらない。どのような機構で IgE 抗体の産生は厳密にコントロールされているのか。その謎を解くことは、I 型アレルギーの予防や治療につながると考えられる。すでに明らかにされているマウスやヒトの c_ϵ 遺伝子の位置や構造からは、その発現頻度と関連づけるものは見出されなかった。一方、筆者らやいくつかの研究室から、IgE 抗体産生を選択的に増強あるいは抑制するリンフォカインの存在が明らかにされている。

このうち IgE 抗体産生を増強あるいは誘導するリン

フォカインとしてクローニングがなされた B 細胞刺激因子 1 (BSF-1/IL-4) がある。一方、IgE 抗体産生の負の方向への調節機構として、リンパ球に由来する IgE 結合因子による制御が示されている。すなわち、IgE 結合因子が IgE を産生する B 細胞膜面の IgE 分子に結合して、その増殖・分化さらに IgE 抗体の分泌を抑制するという機構である。

リンパ球膜面には IgE と結合する低親和性 $Fc_\epsilon R$ が存在する。このことは IgE 結合因子は $Fc_\epsilon R$ に由来する可能性を示唆する。そこで筆者らはリンパ球の $Fc_\epsilon R$ に対するモノクローナル抗体を作製し、リンパ球における $Fc_\epsilon R$ の発現を検討するとともに、 $Fc_\epsilon R$ を単離・精製し、 $Fc_\epsilon R$ をコードする遺伝子のクローニングを試みた。

モノクローナル抗 $Fc_\epsilon R$ 抗体の作製

$Fc_\epsilon R^+$ B 細胞株 RPMI 8866 細胞を用いてマウスを免疫し、脾細胞を P_3U_1 ミエローマ細胞と細胞融合を行った。得られた B ハイブリドマクローンについて、種々の B 細胞株や T 細胞株を用いた蛍光抗体法、さらには IgE ロゼット形成阻害活性で選別し、リンパ球の $Fc_\epsilon R$ と反応するいくつかのモノクローナル抗体を得た。このうち抗体 1-7(γ_{2b})、8-30(μ)は $Fc_\epsilon R$ の IgE 結合部位に向けられているが、抗体 3-5(γ_1)は IgE 結合部位以外のリセプター部分を認識していることが明らかとなっ

* 大阪大学医学部第三内科学教室

図1 I型アレルギー反応の概要

図2 モノクローナル抗FcεR抗体によるRPMI 8866細胞を用いたIgEロゼット形成の阻害(a), および末梢B細胞へのビオチン化IgE結合の抑制(c). IgGロゼット形成(b)やビオチン化IgGの結合(d)は阻害されなかった。

た(図2)。

つぎに、これらモノクローナル抗FcεR抗体により認識される細胞膜抗原の解析を、免疫沈降V法により行ったところ、FcεR⁺B細胞株から46 Kd分子およびその分解産物と考えられる25-30 Kdの分子が同定された(図3)。正常B細胞からも同様に46 Kdが主要な抗原として同定された。この結果は、従来IgEをリガンドとして用いることにより明らかにされているFcεRの分子量とも一致するものであり、46 Kd分子がFcεRの基本構造をなすものであろうと考えられた。

FcεRの発現分布とその誘導因子

つぎにモノクローナル抗体を用い、末梢血やその他のリンパ組織におけるFcεRの発現を蛍光抗体法による染

図3 モノクローナル抗体を用いたFcεRのSDS-PAGEによる解析

RPMI 8866(a-c), Daudi(d) および CEM(e) 細胞の¹²⁵I 標識膜画分を1-7, 3-5抗体あるいは正常マウスIgG(NMIg)で免疫沈降後、SDS-PAGEを行った。

色ののちFACSにより解析した。末梢血リンパ球では、正常人の場合B1⁺B細胞の80%以上がFcεRを発現しており、アレルギー患者ではほとんどすべてのB細胞がFcεR陽性であり、また細胞当りの発現量も著増していた(図4)。しかしT細胞におけるFcεRの有意な発現は、いずれの例においても認められなかった。さらに、扁桃や骨髄においてもFcεRの発現はB1⁺B細胞に認

図4 正常人およびアレルギー患者末梢リンパ球における $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の発現

(a) は抗 B1 抗体および抗 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ 抗体による二次元 FACS 解析の一例を、(b) は B1^+ 細胞における $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ 発現のヒストグラムを示す。

められたが、扁桃ではその半数が、骨髄ではきわめて少数が陽性であった(表1)。この結果は、つぎに述べるように、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ はB細胞の分化に伴って発現することを示唆している。

筆者らはさらにB細胞の各分化段階における $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の発現について検討するため、各種リンパ組織よりリンパ球を得、各 Ig アイソタイプと $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の発現を二重染色と FACS により解析した。その結果、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ は未熟なB細胞では発現しておらず、分化するに伴い成熟 $\mu^+\delta^+$ B細胞のすべてに発現するようになるが、さらにその後クラス・スイッチが起こり、 γ^+ 、 α^+ あるいは ϵ^+ B細胞となると消失する分化抗原としての側面を持つことが明らかとなった(図5)。このことは、RPMI 8866 細胞の DNA でトランスフェクションした $\text{Fc}_\epsilon\text{R}^+$ L細胞トランスフォーマントを用いた解析から、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ はB細胞の分化抗原とされる CD 23 に相当することからも確認された。

このB細胞分化に伴う $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の発現に、いかなるT細胞因子が関与しているのかを明らかにするため、骨髄 B1^+ B細胞を種々のリコンビナントあるいは精製リンフォカインの存在下に培養し、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の誘導を試みた。その結果、BSF-1(IL-4)がその誘導因子であることが明らかとなった(図6)。また BSF-1 の作用は IgE の添加により増強されたが、IgE 単独ではまったく $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の誘

表1 各リンパ組織における $\text{Fc}_\epsilon\text{R}^+$ 細胞の分布

リンパ組織	$\text{Fc}_\epsilon\text{R}^+$ 細胞(%)		
	全体での陽性率	B1^+ 細胞での陽性率	B1^- 細胞での陽性率
末梢血(n=8)	11.6	84.4	<0.1
扁桃 (n=5)	28.4	51.0	<0.1
骨髄 (n=3)	0.5	3.0	<0.1

導は認められなかった。

以上述べた結果から、B細胞の分化は $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の発現という観点から3つの段階にわけられる(図7)。すなわち、① $\mu^+\delta^+\text{Fc}_\epsilon\text{R}^-$ 未熟B細胞、② $\mu^+\delta^+\text{Fc}_\epsilon\text{R}^+$ 成熟B細胞、および③ γ^+ 、 α^+ あるいは $\epsilon^+\text{Fc}_\epsilon\text{R}^-$ B細胞であり、①の段階のB細胞は BSF-1 の作用により $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ 陽性細胞となるが、③の段階に至ったB細胞ではもはや誘導し得ない。BSF-1 が $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ を誘導し、IgE がその作用を高めることは、アレルギー患者におけるリンパ球 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ 発現の増強要因として、BSF-1 の過剰産生を疑わせる。このことは、マウスにおける BSF-1 による IgE 抗体産生の増強ということとも関連して興味深い。

$\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の単離・精製およびその遺伝子のクローニング

つぎに筆者らは、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の cDNA の同定を目的として $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の精製を試みた。すでに RPMI 8866 細胞の培養上清中には、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の分解産物あるいは可溶性 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ と考えられる、IgE に対する親和性を有する分子の存在が明らかとなっている。そこで RPMI 8866 細胞を無血清培地で大量培養し、培養上清を得た。その後種々のカラムで上清を前吸収し、抗 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ 抗体カラムで精製物を得、さらに逆相 HPLC カラムで分画することにより、モノクローナル抗体と反応する 25 Kd の単一物質を得た(図8)。このものは $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の部分分解産物と考えられたが、さらにリジルエンドペプチダーゼで分解し、その部分アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを作製した。一方で筆者らは、さきに述べた $\text{Fc}_\epsilon\text{R}^+$ L細胞トランスフォーマントの mRNA より cDNA を合成し、さらにこれより正常L細胞の mRNA とハイブリダイズするものを差し引き、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}^+$ L細胞特異的 cDNA とした。

以上述べた2種類のプローブを用い、RPMI 8866 細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の cDNA クローンを得た(図9)。この cDNA クローンは oocyte を用いた発現系、さらには SV 40 初期プロモーターと COS 細胞を用いた発現系においても、 $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ の全アミノ酸配列をコードする遺伝子を含んでいることが明らかとなった。このようにしてクローニングされた $\text{Fc}_\epsilon\text{R}$ cDNA について、その全塩基配列の決定を行った。図10にその塩基配列お

図5 末梢血各アイソタイプ陽性Bリンパ球における $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の発現
細胞表面 IgD^+ (a), IgM^+ (b), IgG^+ (c), IgA^+ (d) および IgE^+ (e) 細胞における
 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の発現のヒストグラムを異なるドナー(実線および破線)について示す。

図6 ヒトリコンビナント BSF-1 による骨髓B細胞
(a) および扁桃 $\mu^+\delta^+\text{Fc}\epsilon\text{R}^-$ B細胞(b) における
 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の誘導

図7 B細胞の分化に伴う $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の発現

およびアミノ酸配列を示すが、321個のアミノ酸からなり、N端を細胞内にC端を細胞外に出すユニークなオリエンテーションを示し、Ig gene super-family と基本的に異なるものであった。 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と同様の構造は、トランスフェリンリセプターやアシアロ糖蛋白リセプターにおいて認められている。ちなみに、ニワトリのアシアロ糖蛋白リセプターは、 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ とそれらのC末端側において強い相同性を示した。また RPMI 8866 細胞の上清中の可溶性 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ は、150番目のアミノ酸からのC端側に相当することが明らかとなった。

まとめ

以上、リンパ球の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ に対するモノクローナル抗体

図8 C4HPLC カラムによる $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の精製
斜線カラムは ELISA による $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の定量を示し、
左にはそのフラクションの SDS-PAGE 後の銀染色
を示す。

図9 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ 遺伝子クローニングのストラテジー

を作製し、 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ はB細胞の分化抗原であり CD 23 に相当すること、またその誘導因子は BSF-1/IL-4 であること、さらに $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の精製と遺伝子クローニングにつ

図 10 $Fc\epsilon R$ 遺伝子の制限酵素地図(A)およびその塩基配列とアミノ酸配列(B)

図Bのオーバーラインはリセプターの細胞膜通過部分、アンダーラインは poly(A) シグナルシーケンス、四角で囲んだ部分は合成オリゴヌクレオチド相当部分、また↓は RPMI 8866 細胞上清中の可溶性 $Fc\epsilon R$ の切断部位を示す。

いて述べた。

最近T細胞腫瘍株のなかに $Fc\epsilon R$ を有するものが見出され、それはB細胞の $Fc\epsilon R$ と同一遺伝子にコードされていることが明らかとなっており、今後B細胞の $Fc\epsilon R$ とともに、これら $Fc\epsilon R$ がいかなる機能を有するのかが明らかにされる必要がある。これに関連して、血清中には可溶性 $Fc\epsilon R$ が見出され、その大部分は IgE と複合体を形成していることが明らかとなっている。 $Fc\epsilon R$ がエ

ンドサイトーシスに関連したリセプターと似た構造をもつことから、 $Fc\epsilon R$ の一つの機能として IgE の代謝やその機能の阻害が推定される。さらにB細胞の増殖やクラス・スイッチといった観点からの解析も、今後の課題の一つである。

また、可溶性 $Fc\epsilon R$ が IgE 抗体産生に果たす役割についても、リコンビナント分子を用いることにより明らかにされるであろう。

文献

- 1) Suemura, M., Kishimoto, T.: Regulation of human IgE response by T cells and their products. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 7: 26, 1985.
- 2) Suemura, M. et al.: Isolation, characterization and regulation of the expression of Fc_ϵ receptors ($Fc_\epsilon R$) by utilising monoclonal anti- $Fc_\epsilon R$ antibodies. The proceedings of the XII International Congress of Allergology and Clin. Immunol. 1986, p 16-22.
- 3) Suemura, M. et al.: Monoclonal anti- Fc_ϵ receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fc_ϵ receptors on human B and T cells. *J. Immunol.* 137: 1214, 1986.
- 4) Kikutani, H. et al.: Fc_ϵ receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. *J. Exp. Med.* 164: 1455, 1986.
- 5) Kikutani, H. et al.: Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell* 47: 657, 1986.
- 6) Suemura, M., Kishimoto, T.: IgE class-specific regulatory factor(s) and Fc_ϵ receptors on lymphocytes. *International Reviews of Immunol.* 2: 27, 1987.
- 7) Yukawa, K. et al.: A B cell-specific differentiation antigen, CD 23, is a receptor for IgE($Fc_\epsilon R$) on lymphocytes. *J. Immunol.* 138: 2576, 1987.