

原 著

IgE 産生に与える好酸球上CD40リガンドの役割

獨協医科大学 内科学 (呼吸器・アレルギー)

岡田 壮令 相良 博典 太田 真弓 増田 浩之
眞塩 一樹 笛木 真 笛木 直人 福田 健

上武呼吸器科内科病院

笛木 真 笛木 直人

要 旨 気管支喘息は気道への好酸球を中心とする慢性アレルギー性炎症性疾患として認識され、その患者は各種IgE抗体を発現し、対応するアレルゲン暴露により気道にIgEを介するアレルギー性炎症が惹起される。一方、CD40LigandはTリンパ球、肥満細胞などに発現し、CD40との伝達を介してBリンパ球のIgE産生細胞への分化、増殖に働いており、IgE産生において重要な働きをしている。しかし好酸球におけるCD40Ligand発現とIgE産生へ役割は明確ではない。我々は気管支喘息患者末梢血好酸球のCD40Ligand発現とそれがBリンパ球IgE産生誘導に与える影響について検討した。

(方法) 気管支喘息患者末梢血より好酸球を分離精製し、各種サイトカインで刺激しCD40L発現を検討した。また精製Bリンパ球と混合培養し上清中のIgEを測定した。

(結果) 気管支喘息患者群の末梢血好酸球は健常者群に比較し優位にCD40Ligandを発現し、またBリンパ球は好酸球との混合培養によりIL-4、IL-13存在下にIgEを産生した。

(考案) 気管支喘息患者好酸球はTリンパ球とは別個に独立してBリンパ球のIgE産生に関与する可能性が示唆された。

Key Words : 検索用語, ヒト好酸球, 気管支喘息, CD40リガンド (CD154), IgE

緒 言

気管支喘息は気道過敏性と好酸球などを中心とする気道炎症細胞浸潤によって特徴づけられる慢性アレルギー性炎症性疾患として認識されている¹⁾。アレルギー性炎症では、IgE特異抗体の存在下に肥満細胞などが最初のeffectorとなり、次いでリンパ球、好酸球の局所への浸潤をもたらす^{2~4)}。中でも好酸球集積は特徴的とされ¹⁾、その機能は最終的に誘導されて強い細胞障害性蛋白を放出するなど直接的なeffectorとして認識されてきた。しかし、最近では炎症のプロモーター、サイトカイン、ケモカインを産生⁵⁾し、炎症増幅への関与も注目されている。この炎症の反応開始には抗原特異的IgE抗体が必要

で、それはTh2 typeサイトカインの存在下に、B cellのIgE産生細胞への機能分化が誘導され産生される。B cellの機能分化では、CD40/CD40Ligandを介する結合の重要性が各種の研究報告から示されている^{6~12)}。CD40Ligand (CD154) (以下CD40L) は、活性化Tcell表面に見られる39kDaの糖蛋白で261個のアミノ酸から成り、TNF (Tumor necrotizing Factor) との著明な相同性を認め¹³⁾、Bcell側のCD40に結合しTcell/Bcell間の情報伝達に関与する。最近、T cell以外の肥満細胞や好塩基球がCD40Lを発現し、B cellのIgE産生を誘導すること^{14,15)}や、好酸球系培養細胞に発現するCD40Lが、B cellの機能分化に関与する¹⁶⁾ことが報告された。しかし、喘息患者の好酸球上のCD40L発現については報告がなく、B cell分化やIgE産生への関与も不明である。我々は末梢血好酸球を用いてCD40Lの発現とサイトカインの関与、B cellのIgE産生能の変化について検討した。

平成17年10月26日受付, 平成17年12月8日受理
別刷請求先: 岡田壮令

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 内科学 (呼吸器・アレルギー)

方 法

1. 好酸球分離, 精製

好酸球は過去に示された方法に若干の修正を加えた方法¹⁷⁾を用いてアトピー型気管支喘息患者(血清IgE \geq 500 U/ml), 非アトピー型気管支喘息患者, 健常者の末梢血より分離, 精製した。分離はanti-CD16 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec, Germany) と Magnetic cell separation system (Miltenyi Biotec) を用いた negative selection 法で行った。精製した好酸球はRandolph染色の後, 血算盤にて計測した。得られた好酸球は純度 $98.5 \pm 0.5\%$ で主な混合細胞は好中球, 生存率は98%以上であった。

2. B cell分離, 精製

B cellはアトピー型気管支喘息患者の末梢血より分離, 精製した。分離はFicoll paque (Farmacia CO. LTD, Uppusala, Sweden) を用いた比重分離法の次にhuman B cell negative selection用抗体カクテル (Stem Sep Human B cell Enrichment Cocktail, Stemcell Technology Inc. Vancouver, British Columbia, Canada), 磁気コロイド (Stem Sep magnetic colloid, Stemcell Technology Inc.) とMACS (Miltenyi Biotec) によるnegative selection法でおこなった。精製したB cellはPE 標識モノクローナルマウス抗ヒトCD19/FITC標識モノクローナルマウス抗ヒトCD3混合抗体 (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) にて染色し, FACScan (Becton-Dickinson) にて計測した。得られたB cellの純度は95.0%で生存率は98%以上であった。

3. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Calcium ionophore (CI), 各種サイトカインによる好酸球刺激

精製好酸球は96-well tissue culture plates (Becton-Dickinson) に2% FBS加RPMI 1640 medium (R-8758, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 中に 2×10^5 /wellとなるよう調整し, PMA (1 ng/ml) (P-8139, SIGMA), CI (1×10^{-6} M) (SIGMA) とPMA/CI混合液にて5% CO₂ 37°Cにて24時間刺激した。また, IL-13 (0 - 100 ng/ml) (Pepro Tech EC LTD, London, UK), IL-3 (0 - 25 ng/ml) (Pepro Tech EC LTD), IL-4 (0 - 100 ng/ml) (Pepro Tech EC LTD), IL-5 (0 - 100 ng/ml) (Pepro Tech EC LTD), guranulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (0 - 25 ng/ml) (Pepro Tech EC LTD) で4, 6, 24時間刺激した。

4. 免疫蛍光抗体, フローサイトメトリー

免疫蛍光抗体法はJacksonらによる方法¹⁸⁾に若干の修正を加えた方法を用いた。洗浄後, 好酸球は 5×10^5 個となるように調整し, そこにPE標識モノクローナルマウス抗ヒトCD40Ligand抗体 (Becton-Dickinson) 4μ lを添加し4°C, 30分間incubateした。その後細胞はPBS (-) で洗浄後, PBS (-) 500 μ lに浮遊, 測定まで4°Cに保存した。細胞群の平均蛍光強度 (Mean fluorescence intensity : MFI) は, FACScan (Becton-Dickinson) にて5000個の蛍光を測定し認識した。非特異的蛍光は使用したモノクローナル抗体とisotypeをマッチングさせたマウスIgGにて測定し, 各細胞群のMFIは非特異的蛍光を引いた値を示した。なお, アトピー型, 非アトピー型喘息患者, 健常者間のCD40L増強効果の検討では結果は, 次式で示される非刺激, 刺激後のMFIの比で表した。

$$\text{Ratio} = \text{MFI (stimulated)} / \text{MFI (unstimulated)}$$

5. 好酸球, B cell混合培養によるIgE産生の検討

これはすでに公表されている方法¹⁵⁾に修正を加えた方法で行った。好酸球, B cellともアトピー型喘息患者末梢血より分離, 精製したものを使用し, 24-well tissue culture plates (Becton-Dickinson) にRPMI-1640 medium, IL-5 (10 ng/ml), IL-4 (100 ng/ml), IL-13 (100 ng/ml) を添加, 総量500 μ lとなるよう調整し, 8日間混合培養した。回収した培養上清は-80°Cで保存, 上清中IgEは高感度IgE測定用enzyme immunoassay kit (IMx IgE Dainapack, Dainabot Co. LTD., Tokyo, Japan), IMx analyzer system (Dainabot Co. LTD.) で測定した。

結 果

1. 喘息患者, 健常者間の好酸球上のCD40L発現。

PMA刺激の場合, 好酸球上のMFI ratioは喘息群 10.04 ± 7.76 , 健常者群 3.19 ± 2.65 , CI刺激の場合は喘息群 12.38 ± 9.16 , 健常者群 1.272 ± 1.63 , PMA/CI混合刺激の場合は喘息患者群 10.61 ± 8.98 , 健常者群 1.66 ± 1.38 であり, いずれも喘息患者群が, 有意に高かった。(Fig. 1a, Fig. 1b).

2. アトピー群と非アトピー群の好酸球上のCD40L発現。

両群間でMFI ratioに有意差はなかった (Fig. 2).

3. 各種サイトカイン刺激での好酸球上のCD40L発現。

アトピー型喘息患者好酸球を以下のサイトカインで

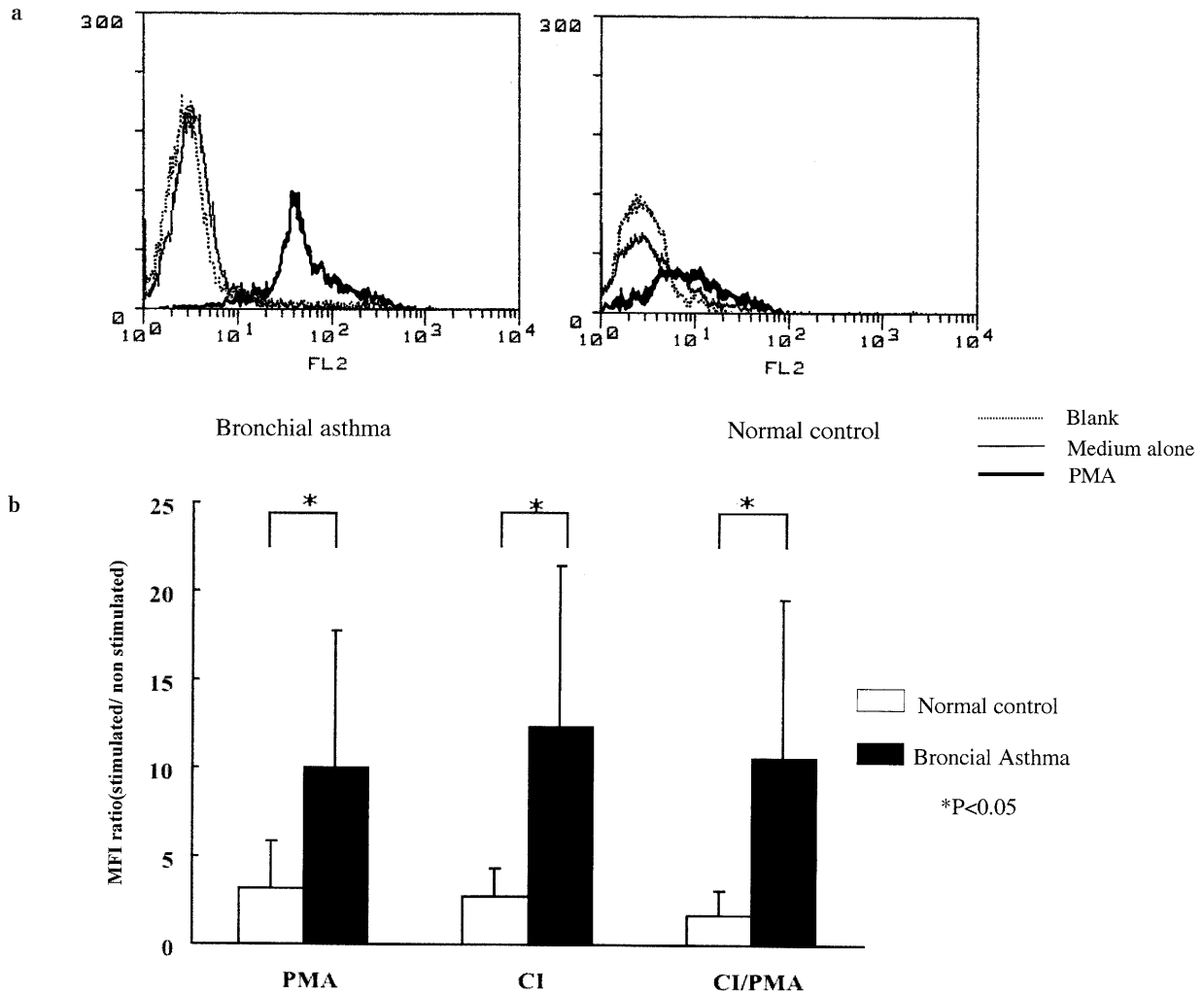


Fig. 1 Comparison between CD40 Ligand expression on eosinophils from asthmatic patients and normal controls. Purified eosinophils were stimulated with PMA, CI, PMA + CI or medium alone for 24 hours. Cells were stained with anti-CD40 Ligand antibody and described with mean fluorescence intensity (MFI).

a. Figure 1a showed the histograms of fluorescence intensity of asthmatic patients (left panel) and normal controls (right panel).

b. Results were expressed as MFI-ratio divided by stimulated eosinophils and non-stimulated eosinophils. Asthmatic patients (closed bar, $n = 21$) were significantly increased CD40 Ligand expression compared with normal subjects (open bar, $n = 6$). Data are expressed as mean \pm SEM. *: $P < 0.05$.

4, 6, 24時間刺激したときのCD40L発現ではIL-3 (Fig. 3 a), IL-4 (Fig. 3 b), IL-5 (Fig. 3 c), GM-CSF (Fig. 3 d) は, CD40L発現を増強させなかった.

4. IL-13刺激によるCD40L発現のTime course.

IL-13では24時間で発現が増強された。(MFI, 24 hours: normal; 1.89 ± 1.57 and asthma; 27.41 ± 5.94) (Fig. 4).

5. IL-13のCD40Lの発現に与える影響.

IL-13は喘息群好酸球のCD40L発現を増強させたが, 健常者群では増強させなかった. 喘息群では濃度100 ng/mlのIL-13が最も発現を増強した。(MFI, asthma; 30.99 ± 6.76 and normal; 2.67 ± 5.68) (Fig. 5).

6. 好酸球とB cell混合培養でのIgE産生の検討.

IL-4, IL-13存在下でもBcellのみ (IgE; 0.30 ± 0.17 IU/ml), 好酸球のみ (0.16 ± 0.01 IU/ml), または好酸球, B cell混合培養下でIL-4, IL-13の存在を欠く場合 (0.31

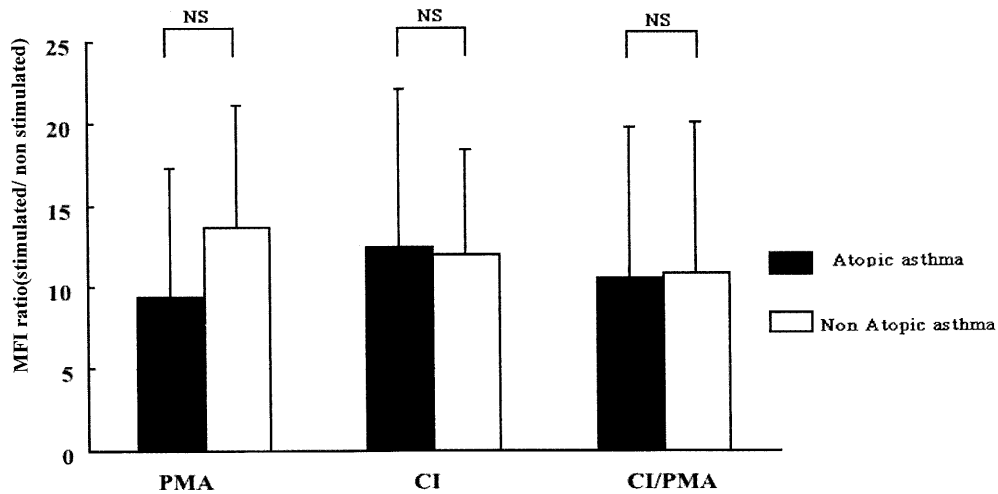


Fig. 2 Comparison between CD40 Ligand expression on eosinophils from atopic and non-atopic asthma. Purified eosinophils were stimulated with PMA, CI, PMA + CI or medium alone for 24 hours. Cells were stained with anti-CD40 Ligand antibody and described with mean fluorescence intensity (MFI). Results were expressed as MFI-ratio divided by stimulated eosinophils and non-stimulated eosinophils. CD40 Ligand was expressed on both atopic (closed bar, $n = 18$) and non-atopic (open bar, $n = 3$) asthmatic eosinophils. However, there was no significant difference between atopic and non-atopic asthmatics. Data are expressed as mean \pm SEM.

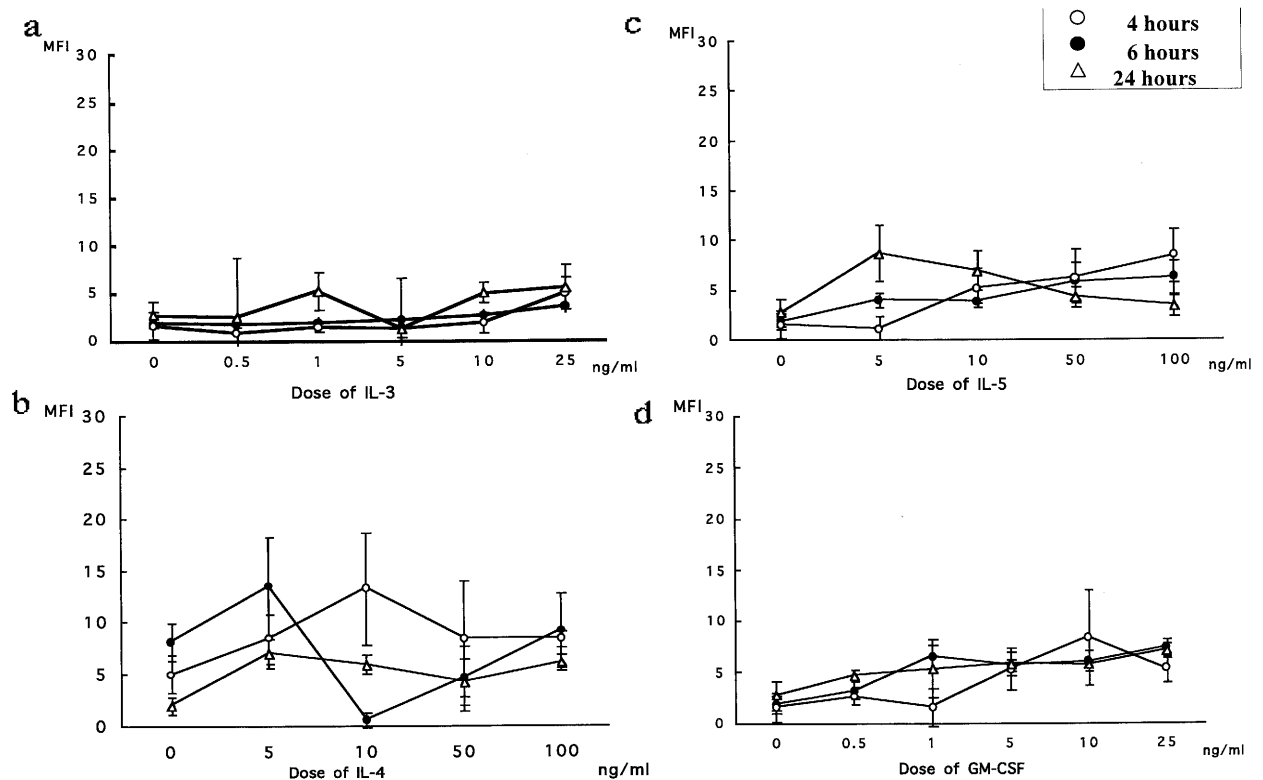


Fig. 3 CD40 Ligand expression on eosinophils stimulated with IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF. Eosinophils stimulated with varying concentration of IL-3 (Figure 3a), IL-4 (Figure 3b), IL-5 (Figure 3c) or GM-CSF (Figure 3d). Each figure showed the time point at 4 (open circle), 6 (closed circle) and 24 hours (open triangle). Cells were stained with anti-CD40 Ligand antibody and described with mean fluorescence intensity (MFI). Each cytokine did not increase CD40 Ligand expression on eosinophils from asthmatic patients. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4$).

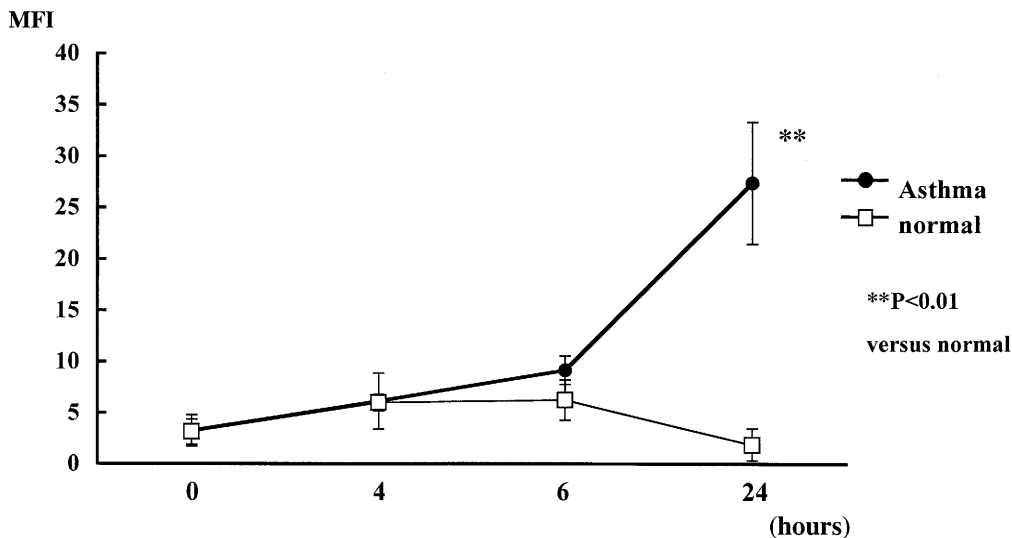


Fig. 4 Time course study of CD40 Ligand expression stimulated by IL-13.

This figure showed that the time points of 100 ng/ml of IL-13 stimulation at 4, 6 and 24 hours compared with asthmatic patients and normal controls. Cells were stained with anti-CD40 Ligand antibody and described with mean fluorescence intensity (MFI). CD40 Ligand expression on eosinophils for 24 hours stimulation were significantly increased in asthmatic patients (closed circle, n = 6) compared with normal controls (open square, n = 4). Data are expressed as mean ± SEM. ** : P < 0.01.

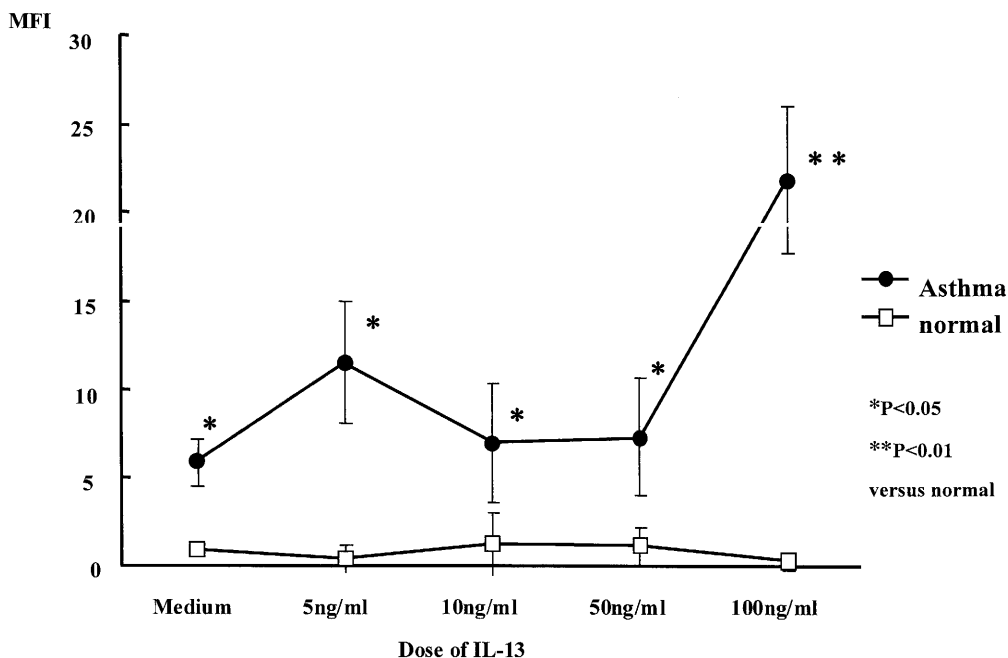


Fig. 5 Dose-response study of CD40 Ligand expression on eosinophils stimulated by IL-13

This figure showed that the concentration of 5, 10, 50 and 100 ng/ml of IL-13 or medium alone stimulation for 24 hours compared with asthmatic patients and normal controls. Cells were stained with anti-CD40 Ligand antibody and described with mean fluorescence intensity (MFI). CD40 Ligand expression on eosinophils stimulated with each concentration of IL-13 were significantly increased in asthmatic patients (closed circle, n = 4) compared with normal controls (open square, n = 4). Data are expressed as mean ± SEM. * : P < 0.05. ** : P < 0.01.

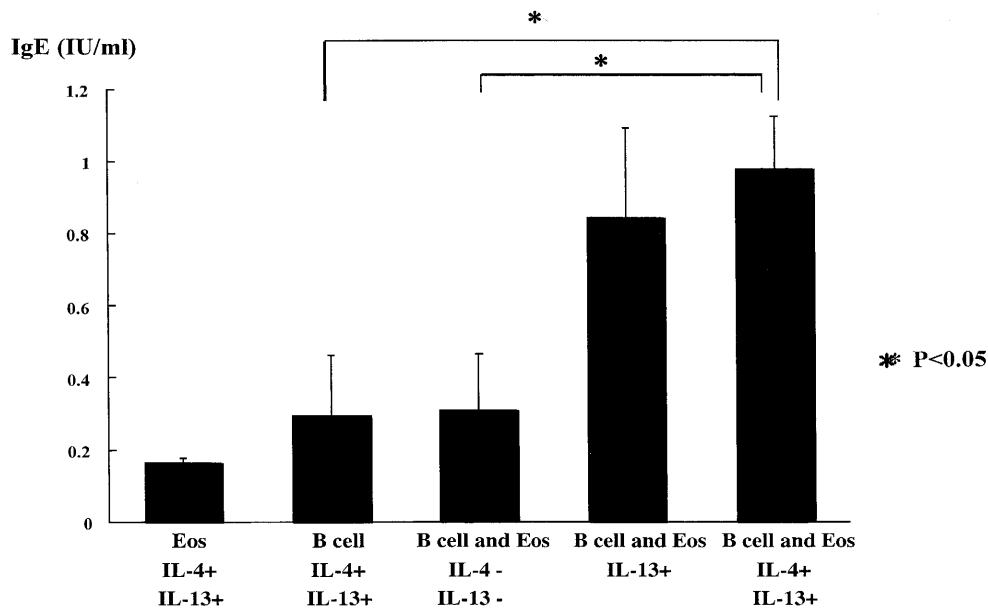


Fig. 6 Induction of IgE synthesis from B cells on asthmatic subjects

IgE synthesis from B cells stimulated in the presence or absence of IL-13 and IL-4 for 8 days. Secretory IgE within supernatant were measured by ELISA. IgE synthesis from B cells co-cultured with eosinophils stimulated with IL-13 and IL-4 was significantly increased, compared with B cell alone or absence of IL-13 and IL-4. Data are expressed as mean \pm SEM. * : $P < 0.05$.

± 0.16 IU/ml) に比較し, IL-13存在下で混合培養した場合 (0.85 ± 0.24 IU/ml) と IL-4, IL-13存在下で混合培養した場合 (0.98 ± 0.15 IU/ml) の方が有意に高値であった (Fig. 6).

考 察

B cellのIgE産生における機能分化では, CD40に対するモノクローナル抗体はin vitroでB cellをIL-4作働性のIgE産生性に変化させること⁷⁾, soluble human CD40はin vitroでT cell作働性のIL-4依存的なIgE産生を抑制すること⁸⁾, また, X-linked hyper IgM血症の患者ではCD40L不全と機能分化を欠き, IgG, IgA, IgEを欠如すること⁹⁾, CD40LもしくはCD40の遺伝子部分欠損マウスでは血清IgEを欠き, T cell依存性の抗原曝露後も機能分化不全となる¹⁰⁻¹²⁾ ことなどからCD40/CD40Lを介する情報伝達の重要性が指摘されている。その過程でIL-4, IL-13といったTh2 typeのサイトカインの関与が必要で¹⁹⁻²¹⁾, IL-4とIL-13はB cellのレセプターに結合し, C ϵ heavy chainの遺伝子部分の転写を誘導する^{22, 23)}。これらにより, B cellのIgE産生が誘導されると考えられている。一方, アレルギー性炎症で集積が特徴的とされる好酸球は炎症のプロモーターの機能が注目されるようになった。最近, 肥満細胞や好塩基球がCD40Lを発現し, IgE産生を増強させるとの報

告^{14, 15)} や, 好酸球系細胞でもCD40Lが発現し, IL-4存在下にB cellの分化, 成熟を誘導するとの報告¹⁶⁾ もなされるようになった。本報告では活性化好酸球において喘息患者と健常者間でCD40Lの発現の差を検討し, 喘息患者群の発現が有意に高かった (Fig. 1) ことから喘息患者好酸球はCD40Lを発現するポテンシャルが健常者群のそれに比較して高いと考えられた。これは肥満細胞のCD40L発現において, アレルギー性鼻炎患者の方が, 慢性感染性鼻炎患者のそれに比較し有意に発現が高いとの報告¹⁵⁾ と同様の傾向であろう。好酸球はこれまでアレルギー疾患における最終的なeffectorとして認識されていた^{1, 24)} が, CD40Lを発現することから, リンパ球などと同様に炎症のinducerとしての機能も持ち, 炎症誘導, 遷延化に関与する可能性が考えられた。一方, 喘息患者群ではアトピー, 非アトピー群間にはCD40L発現に有意な差は無く (Fig. 2), 患者血清IgE値とCD40L発現には相関はみられなかった (データ示さず)。最近, bronchus associated lymphoid tissue (BALT) が気道局所での免疫反応, 分泌型IgAの産生に関わっており²⁵⁾, T cell, B cellのinteractionもBALTで生じている可能性が指摘されている²⁶⁾。さらにin vivoにおいて抗CD40L抗体を投与すると経口卵白アルブミン投与によるcytotoxic Tcellの活性化が抑制され, またCD40欠損マウスは同刺激に対する抗原受容性を持つと

いう報告²⁷⁾から、CD40L、CD40の分子が局所粘膜で機能することを示唆している。以上よりIgE産生の誘導における好酸球のCD40L発現の意味は全身的な反応よりも、炎症局所での免疫反応に関与している可能性が示唆される。一般に、好酸球はIL-3、IL-5、GM-CSFなど²⁸⁻³⁰⁾により機能が規定されるとされている。アレルギー性炎症局所で発現がみられるIL-4¹⁵⁾とIL-13^{15, 31)}はB cellのIgE産生誘導も関与する。我々の検討ではこれらのサイトカインのうち好酸球においてはIL-13以外は直接的なCD40L発現増強を示さなかった(Fig. 3)。IL-4、IL-13で刺激しても肥満細胞はCD40L発現増強がなかった場合¹⁵⁾と異なり、好酸球ではIL-13はCD40L発現増強をもたらす、それ自体のB cellへの作用とともに、CD40/CD40Lを介するIgE産生への機能分化を誘導している可能性がある。この点、IL-13により活性化されたT cellがTh2型細胞へ分化、CD40L発現増強をきたす点³²⁾と同様な機構が働いている可能性がある。本報告では好酸球におけるこの機構には特にIL-13が重要な働きを持つことが示されたが、IL-13の好酸球に対する作用はまだ未知の部分が多い。一般にIL-4とIL-13はレセプターを共有しており、同様のIL-4R α chainからSTAT (Signal transducer and activator of transcription) 6を介するリン酸化経路を経て転写因子を活性化、生じる作用もほぼ同様とされる³³⁾。このため、IL-4もIL-3とほぼ同様な結果が生じる事が予測されたにもかかわらず我々の実験はIL-4とIL-13は異なる結果を示した。IL-13の好酸球に対する作用を検討した他の報告では、気道好酸球浸潤のin vivoでの観察で、IL-13がIL-4R α chain、STAT6を介し、IL-5やeotaxinの作用とは独立した直接的作用を持つ³⁴⁾という報告がある一方、in vitroでの検討ではIL-13は好酸球生存延長、遊走増強を誘導したが、IL-4ではその作用が無いとの報告³⁵⁾もあり、IL-13とIL-4が異なる作用点を持つ可能性もある。好酸球においてはそのレセプターなのか、それ以降のJAK (Janus-associated kinase)/STAT系の違いなのか不明だが、あるいは最終的にSTAT6を介するものの、IL-13がIL-13R α 1に結合しシグナルが入った段階では、JAK familyのうち、TYK2が活性化されることがIL-4と異なる部分であることや³³⁾、同様にIL-13が結合するが、STAT6には抑制的に働くIL-13R α 2³⁶⁾などが関与する可能性もある。いずれにしても好酸球ではIL-13とIL-4は異なる作用を示す可能性があり、今後さらに検討を加える必要がある。さらに、好酸球系の細胞はB cellの分化に影響を与える⁵⁾が、直接B cellからのIgE産生の誘導については不明なため、我々はそれも検討した。その結果、B cell単独ではIL-

13、IL-4存在下でもIgE産生量はわずかだが、B cellと好酸球をIL-13、IL-4存在下に混合培養すると著明にIgE産生が亢進した。一方、両者を混合培養したのみではIgE産生はわずかな増加にとどまった(Fig. 8)。好酸球はB cellをIgE産生系に機能分化させる能力を持つが、B cellが実際にIgEを産生するには肥満細胞の場合¹⁵⁾と同様、IL-13ならびにIL-4の共同作用が必要なことが示唆された。気管支喘息患者好酸球は炎症局所でIL-13存在下にCD40Ligandを発現し、Tリンパ球とは別個に独立してBリンパ球のIgE産生に関与する可能性が示唆された

文 献

- 1) Makino S, Fukuda T, Motojima S, et al: Eosinophils in asthma, part 2. In "Eosinophils, Biological and clinical Aspects". ed by Makino S and Fukuda T. CRC Press, Boca Raton, pp. 329-346, 1992.
- 2) Holgate ST, Robinson C. and Church MK. : Mediators of immediate hypersensitivity. In "Allergy : Principles and Practice" ed. by Middleton Jr. E, Reed CE, Ellis EF, et al. Mosby, St. Louis, MO, pp. 135-163, 1988.
- 3) Ishizaka T. : Mechanisms of IgE-mediated hypersensitivity. In "Allergy : Principles and Practice" ed. by Middleton Jr. E, Reed CE, Ellis EF, et al. Mosby, St. Louis, MO, pp. 71-93, 1988.
- 4) Galli SJ. and Lichtenstein LM. : Biology of mast cell and basophils. In "Allergy : Principles and Practice" ed. by Middleton Jr. E, Reed CE, Ellis EF, et al. Mosby, St. Louis, MO. pp. 106-134, 1988.
- 5) Capron M, Woerly G, Kayaba H, et al. : Invited lecture, Role of membrane receptors in the release of T helper 1 and 2 cytokines by eosinophils. Int. Arch. Allergy Immunol., **124** : 223-226, 2001.
- 6) Gaucht JF, Aubry JP, Mazzei G, et al. : Human CD40-ligand : molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. FEBS letters, **315** : 259-266, 1993.
- 7) Jabara H, Fu S, Geha R et al. : CD40 and IgE : synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin-4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. J. Exp. Med., **172** : 1861-1864, 1990.
- 8) Fanslow W. : Soluble forms of CD40 inhibit biological responses of human B cells. J. Immunol., **149** : 655-660, 1992.
- 9) Fuleihan R, Ramesh N and Geha RS. : X-linked

- agammaglobulinemia and immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM : immunodeficiencies of B cell development and differentiation. *Adv. Immunol.*, **60** : 37-56, 1995.
- 10) Xu J, Foy TM, Laman JD, et al. : Mice deficient for CD40 ligand. *Immunity*, **1** : 423-431, 1994.
 - 11) Castigli E, Alt FW, Davidson L, et al. : CD40 deficient mice generated by recombination-activating gene - 2 -deficient blastocyte complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** : 12135-12139, 1994.
 - 12) Kawabe T, Naka T, Yoshida K, et al. : The immune responses in CD40-deficient mice : impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, **1** : 167-178, 1994.
 - 13) Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, et al. : The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor : expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J.*, **11** : 4313-4321, 1992.
 - 14) Gaucht JF, Henchoz G, Mazzei G, et al. : Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature*, **365** : 340-343, 1993.
 - 15) Pawankar R, Okuda M, Yssel H, et al. : Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the FcεRI, CD40L, IL-4, and can induce IgE synthesis in B cells. *J. Clin. Invest.*, **99** : 1492-1499, 1997.
 - 16) Gaucht JF, Henchoz S, Fattah D, et al. : CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.*, **25** : 863-865, 1995.
 - 17) Nakajima H, Gleich GJ, and Kita H. : Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *J. Immunol.*, **156** : 4859-4866, 1996.
 - 18) Jackson AL and Warner NL. : Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology (3rd edition)" ed. by Rose NR, Friedman M and Fahey HL. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 226-235, 1986.
 - 19) Coffman RL, Ohara J, Bond MW, et al. : B cell stimulatory factor enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.*, **136** : 4538-4541, 1986.
 - 20) Pene J, Rousset F, Briere F, et al. : IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85** : 6880-6884, 1988.
 - 21) Punnonen J, Aversa G, Cooks BG, et al. : Interleukin-13 induces Interleukin-4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90** : 3730-3734, 1993.
 - 22) Zurawski SM, Chomarat P, Djossou, O, et al. : The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. *J. Biol. Chem.*, **270** : 13869-13878, 1995.
 - 23) Defrance T, Carayon P, Billian G, et al. : Interleukin-13 is a B cell stimulating factor. *J. Exp. Med.*, **179** : 135-143, 1994.
 - 24) Ohashi Y, Motojima S, Fukuda T et al. : Airway hyperresponsiveness, increased intracellular spaces of bronchial epithelium, and increased infiltration of eosinophils and lymphocytes in bronchial mucosa in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145** : 1469-1476, 1992.
 - 25) 佐藤篤彦 : BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) の基礎的, 臨床的展望. *日本呼吸器学会雑誌*, **38** : 3-11, 2000.
 - 26) Toyoshima M, Chida K. and Sato A. : Antigen uptake and subsequent cell kinetics in bronchus-associated lymphoid tissue. *Respirology*, **5** : 141-145, 2000.
 - 27) Hanninen A, Martinez NR, Davey GM, et al. : Transient blockade of CD40 ligand dissociates pathogenic from protective mucosal immunity. *J. Clin. Invest.*, **109** : 171-173, 2002.
 - 28) Makino S : Bronchial asthma. In "Eosinophils." ed. by Makino S and Ishikawa K. International Medical Publishers LTD., Tokyo, pp.182-194, 1991.
 - 29) Chihara J, Gruart V, Plumas J, et al. : Induction of CD23, CD25 and CD4 expression on an eosinophilic cell line (EoL-3) by interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-5 (IL-5). *Eur. Cytokine Netw.*, **3** : 53-61, 1992.
 - 30) Chihara J, Plumas J, Tavanier J, et al. : Characterization of a receptor for interleukin-5 (IL-5) on human eosinophils : variable expression and induction by granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J. Exp. Med.*, **172** : 1347-1351, 1990.
 - 31) Humbert M, Durham SR, Kimmitt, et al. : Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic

- subjects with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99** : 657-665, 1997.
- 32) Yssel H, Abbal C, Pene J et al. : The role of IgE in asthma. *Clin. Exp. Allergy.*, **28** : (suppl 5), 104-109, 1998.
- 33) Jiang H, Harris MB and Rothman P. : IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105** : 1063-1070, 2000.
- 34) Yang M, Hogan SP, Henry PJ, et al. : Interleukin-13 mediates airways hyperreactivity through the IL-4-receptor-alpha chain and STAT6 independently of IL-5 and eotaxin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **25** : 522-530, 2001.
- 35) Horie S, Okubo Y, Hossain M, et al. : Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Internal Medicine*, **36** : 179-185, 1997.
- 36) Mullings RE, Wilson SJ, Puddicombe SM, et al. : Signal transducer and activator of transcription6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108** : 832-838, 2001.

The Role of CD40Ligand Expression on Eosinophil for IgE Production

Takenori Okada¹, Hironori Sagara¹, Mayumi Ota¹, Hiroyuki Masuda¹,
Kazuki Mashio¹, Makoto Fueki^{1,2}, Naoto Fueki^{1,2} and Takeshi Fukuda¹

¹*Department of Pulmonary medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine*

²*Jobu Hospital for Respiratory Disease*

Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease of the airway. The accumulation of eosinophils in the airway is one of characteristic seen in patients with bronchial asthma. Asthmatic patients have a large number of IgE antibodies to environmental allergens. The exposure of these allergens induces IgE mediated allergic inflammation in the airway. Allergic reaction is a most important aspect of airway inflammation of the bronchial asthma. It is well known that CD40/CD40-Ligand interaction is a key factor for IgE production. CD40-Ligand, a surface molecule which can be expressed by T cells, mast cells and basophils has been shown to be involved in the control of B cell proliferation.

We have observed following in vitro study. It have been shown that freshly isolated eosinophils from asthmatic subjects can be induced to express CD40-Ligand but not from normal controls. IgE synthesis can be induced by the interaction of B cells with eosinophils in the presence of exogenous IL-13.

These result suggest that eosinophils can induce the production of IgE, independently of T cells.

Key Word : Human eosinophil, Bronchial asthma, CD40ligand (CD154), IgE