

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0191

研究課題名（和文）組織酸素濃度から読み解く皮膚のストレス応答とアレルギー病態制御の新機軸

研究課題名（英文）New strategy for allergy control based on molecular analysis of skin stress responses modified by tissue oxygen concentrations

研究代表者

田中 あかね（Tanaka, Akane）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：80418673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎自然発症モデル・NC/Tndマウスを用いて皮膚炎発症と皮膚内環境の変化、特に酸素濃度との関連性について比較、解析を行った。SPF環境下で飼育した皮膚炎未発症のNC/Tndマウスを対照として、皮膚炎を発症しているマウスに酸素濃度インディケータであるpimonidazoleを注射したのち、それぞれのマウスの背部皮膚を採取して免疫組織化学染色を実施、発症初期の皮膚内酸素環境変化を解析したところ、とくに皮膚炎を発症したコンベンショナルマウスにおいて真皮層のpimonidazole陽性となる低酸素領域が検出できた。この時皮膚のマスト細胞が、血管内皮成長因子を放出することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素濃度の変化によってマスト細胞は脱顆粒を起こし、炎症性メディエーターを放出することを明らかにし、この研究成果をもとに、マウスの相対的低酸素暴露モデルを作出し、アナフィラキシー様の症状を誘導することに成功した。このモデルでは、相対的低酸素にさらされてすぐに、全身的なマスト細胞の脱顆粒が誘導され、血管透過性の亢進や、血圧の低下、体温低下など、マウスにおける典型的なアナフィラキシー症状が誘導されることを発見した。これは、抗原抗体反応によらない、新たなアナフィラキシー発症メカニズムの発見であり、高濃度の酸素を投与する治療からの脱却プロセスなどに、一石を投じる研究成果となった。

研究成果の概要（英文）：The relationship between the onset of dermatitis and changes in the intra-dermal environment, particularly oxygen concentration, was compared and analyzed using NC/Tnd mice, a spontaneous model of atopic dermatitis. The results showed that the hypoxic region in the dermis layer was positive for pimonidazole, especially in conventional mice that had developed dermatitis. The hypoxic region in the dermis layer was positive for pimonidazole. It was found that skin mast cells release vascular endothelial growth factor at this time.

研究分野：動物生命科学

キーワード：酸素濃度 皮膚 アレルギー マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

疾患の発症過程を有機的に捉えようとするとき、その発症する局所の細胞やそれを取り巻く微小環境の変化を切り離して解析することは有効ではない。生体を構成する細胞は常に動き、形態を変え、環境に応答する。一方で、細胞を取り巻く微小環境は常に外部あるいは内部の変動を反映、または呼応して、可塑的な恒常性維持機能を媒介している。酸素や栄養は、細胞が正常な機能を維持し、生体が恒常性を保つための極めて重要な要素である。そして、これらの要素が腫瘍性疾患などにおいて正常な状態とは異なっていることが近年注目を集めている (Nature Reviews Cancer 2016;16:663-673., Trends Cell Biol.2017;27:863-875.)。全身性硬化症における皮膚局所の酸素濃度低下していること (J. Rheumatol. 2010 ; 37:1968-1969.)、乾癬の皮膚において低酸素誘導因子の発現が亢進していること (J. Invest. Dermatol. 2007;127:2445-245) などが報告されているが、発症との関連や組織の低酸素応答など、メカニズムの解析は全く行われていない。また、リンパ球やマクロファージなど、代表的な免疫担当細胞が、低酸素培養を行うことでサイトカイン産生などの機能が変化することが調べられているが、そのことと疾患発症・増悪化との繋がりとは不明なまま残されている。申請者らの研究グループは、組織の酸素環境と免疫担当細胞のひとつであるマスト細胞の機能変化に早くから着目し、疾患モデルマウスを用いて研究を行っていたところ、高濃度酸素飼育から正常酸素環境に戻された幼若マウスにおいて、マスト細胞の過剰な脱顆粒や活性化が誘導され、網膜病態を形成する原因となるという知見を見だし、新たな新生児網膜症の病態機序を報告した (J. Clin. Invest. 2017;127:3987-4000) 。申請者らは、本研究でテーマとするアトピー性皮膚炎の病態解析にも多くの実績を有しているが、これまで組織酸素濃度に着目した解析研究は国内外でも行われていない。今回これまでの研究の中で発見した、疾患皮膚における組織酸素濃度の大きな変化とそれに呼応してプロファイルを変える表皮や免疫細胞の機能に関する解析を連動・深化させ、アトピー性皮膚炎の新たな病態解析と制御を展開する目的で本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、国際的な皮膚免疫・アレルギーの専門家である Dr. Arkwright との国際共同研究を展開することで、アトピー性皮膚炎の病態発生機構に新たな知見を提供することを目的とする。研究代表者らは、モデル動物を駆使して、in vitro から in vivo まで幅広い研究をオーガナイズしてきた実績を有する。今回の研究で焦点を当てる組織酸素濃度について、アトピー性皮膚炎での解析は全く行われておらず、疾患モデルを用いた研究とヒトサンプルでの解析を連動させトランスレーション研究を推進することにより新たな治療戦略の提案が期待できる。Dr. Arkwright はマンチェスター大学内で遺伝子解析や組織学的分析のエキスパートとチームを構成、疾患モデルを用いたトランスレーション研究の経験を積んだ代表者や若手研究者とタッグを組むことで、世界に先駆けて新奇性及び独創性の高い研究を進めることが可能となる。本研究では、皮膚の微小環境における組織酸素濃度の変化が、表皮や真皮におけるアレルギー性炎症の惹起や修飾、リモデリングに与える影響を詳細に解析することで、新たな病態発生メカニズムの解明や治療戦略の提案につながることを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

1) 皮膚の免疫組織学的解析

8週齢の C57BL/6J マウス、15週齢のコンベンショナルおよび SPF NC/Tnd マウスから組織学的サンプルを採取し、ホルマリン固定、パラフィン包埋を経て、薄切標本を作成した。低酸素領域の可視化のため、マウスにはサンプリング前に pimonidazole hydrochloride を静脈内投与した。免疫組織化学的解析は、組織を一次抗体でインキュベートした後、Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体または Alexa Fluor 647 標識抗マウス IgG 抗体でインキュベートした。マウス肥満細胞の検出には、組織をアビジン-Texas Red で共染色し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む Prolong Gold antifading reagent 中でマウントした。写真は BZ-9000 蛍光顕微鏡を用いて撮影した。また免疫組織学的解析に際して、一次抗体として、抗ヒドロキシプロープ-1、抗 HIF1、抗 VEGF、抗マスト細胞トリプターゼを用いた。

2) 培養細胞を用いた試験

骨髓由来培養マスト細胞 (BMCMCs) は、雄の NC/Tnd および C57BL/6J マウスの骨髓細胞から作成した。これらは定法に則り、10% FBS および 10% pokeweed mitogen-stimulated spleen cell-conditioned medium を含む -minimum essential medium (-MEM) で培養し、マスト細胞への分化を誘導した。LAD2 細胞は、10% FBS、抗生物質、および 100 ng/mL ヒト幹細胞因子を添加した -MEM で維持した。臍帯血由来培養マスト細胞 (CBMCs) は、CD34 陽性臍帯血細胞を利権バイオリソースセンターから入手し、10%FBS、およびヒト幹細胞因子とヒトインターロイ

キン6を含むAIM-V培地内で6週間にわたり培養し誘導した。

表皮細胞としてPAM212、HaCaT、HEKa、線維芽細胞としてNIH/3T3についても定法に則って培養し、インキュベータの酸素濃度を変化させた。これらの細胞を用いて、インキュベータ内の酸素濃度を変化させ、酸素応答性をqPCRやウエスタンブロット法、免疫染色法、ELISA法などで解析した。

3) 全身性アナフィラキシーモデル

致死的な経過をたどることもあるI型アレルギー病態であるアナフィラキシーショックにおいて中心的役割を果たすマスト細胞に着目し、*in vivo*モデルを用いた酸素濃度応答性を解析した。C57BL/6Jマウスを用いて、マウスを高酸素環境飼育から正常酸素環境飼育に移し替えることで、相対的低酸素暴露モデルを作出し、アナフィラキシー様の症状を誘導した。またこの時に酸素センサーをして働く分子について、阻害剤のやK0マウスを用いて解析した。

4. 研究成果

1) 平成30年度

皮膚炎発症に伴う皮膚内環境変化の解析：アトピー性皮膚炎自然発症モデルであるNC/Tndマウスを用いて皮膚炎発症と皮膚内環境の変化、特に酸素濃度との関連性について比較、解析を行った。SPF環境下で飼育した皮膚炎未発症のNC/Tndマウスを対照として、皮膚炎を発症しているマウスに酸素濃度インディケーターであるpimonidazoleを注射したのち、それぞれのマウスの背部皮膚を採取して免疫組織化学染色を実施、発症初期の皮膚内酸素環境変化を解析したところ、とくに皮膚炎を発症したコンベンショナルマウスにおいて真皮層のpimonidazole陽性となる低酸素領域が検出できた

低酸素環境における炎症性細胞の応答解析：表皮や真皮を構成する各細胞群の低酸素環境における炎症性応答を*in vitro*にて解析した。具体的にはPAM212、HaCaT、HEKa(いずれもケラチノサイト)、NIH/3T3(線維芽細胞)、LAD2、RBL-2H3(いずれもマスト細胞)、骨髓由来培養マスト細胞、血管内皮細胞初代培養細胞などの培養細胞株および初代培養細胞を通常酸素条件下および低酸素条件下で培養、経時的にサンプルを回収、細胞におけるTSLP、TNF- α 、IL-1、IL-6など、炎症性サイトカイン発現を中心にmRNAおよびタンパク質レベルで解析するとともに、とくにマスト細胞の脱顆粒や血管申請促進因子に関する検出を実施した。これらの解析により、低酸素環境下での培養によって、炎症性サイトカインや血管誘導因子の産生が増強されることが明らかとなった。

マンチェスター大学における研究の実施：2018年度は研究代表者がマンチェスター大学を訪問し、共同研究ミーティングを実施、とくにヒトサンプルでの解析について技術的な擦り合わせを行なった。

2) 令和元年度

低酸素環境における炎症性細胞の応答解析として、表皮や真皮を構成する各細胞群の低酸素環境における炎症性応答を*in vitro*にて解析した。具体的にはPAM212、HaCaT、HEKa(いずれもケラチノサイト)、NIH/3T3(線維芽細胞)、LAD2(ヒトマスト細胞)、マウス骨髓由来培養マスト細胞、血管内皮細胞初代培養細胞などの培養細胞株および初代培養細胞を通常酸素条件下および低酸素条件下で培養、経時的にサンプリングを実施した。これら細胞における炎症性サイトカインおよび血管新生因子の発現を中心にmRNAおよびタンパク質レベルで解析した。

酸素濃度の変化によるマスト細胞の脱顆粒や血管内皮細胞の管腔形成など、炎症促進的にはたらく各細胞の機能面での差異が通常酸素・低酸素条件で変化するかについてもbeta-hexosaminidase試験やtube formation試験により解析し、マスト細胞が低酸素に反応してVEGFを産生すること、それが血管内皮細胞に対して管腔形成を誘導できることを明らかにした。

若手研究者の派遣として、2019年度は2020年1月に1名を英国マンチェスター大学へ派遣し、ヒト皮膚サンプルの解析に当たらせる予定であったが、新型コロナウイルス感染症の拡大により派遣ができなかった。この間、オンラインによって研究情報交換を継続し、学術論文の作成と投稿を行った。

3) 令和2年度

低酸素環境における炎症性細胞の応答解析として、表皮や真皮を構成する各細胞群の低酸素環境における炎症性応答を、引き続き*in vitro*にて解析した。今年度は特に、致死的な経過をたどることもあるI型アレルギー病態であるアナフィラキシーショックにおいて中心的役割を果たすマスト細胞に着目し、*in vitro*及び*in vivo*モデルを用いた酸素濃度応答性を解析した。これまでの研究から、酸素濃度の変化によってマスト細胞は脱顆粒を起こし、炎症時における組織の低酸素状況において血管内皮成長因子などの炎症性メディエーターを放出することを明らかにしてきた。これらの研究成果をもとに、マウスを高酸素環境飼育から正常酸素環境飼育に移し替えることで、相対的低酸素暴露モデルを作出し、アナフィラキシー様の症状を誘導することに成功した。このモデルでは、相対的低酸素にさらされてすぐに、全身的なマスト細胞の脱顆粒が誘導され、血管透過性の亢進や、血圧の低下、体温低下など、マウスにおける典型的なアナフィラキシー症状が誘導されることを発見した(Figure 1)。

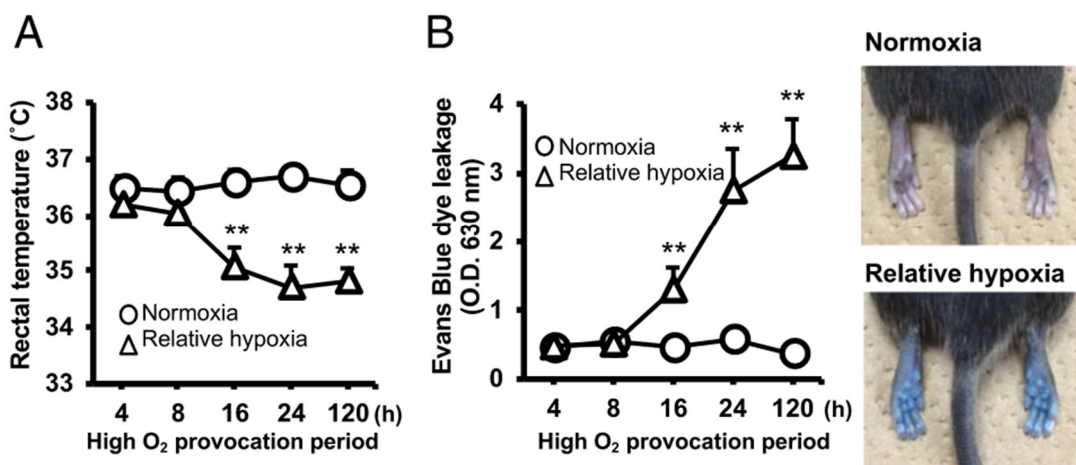
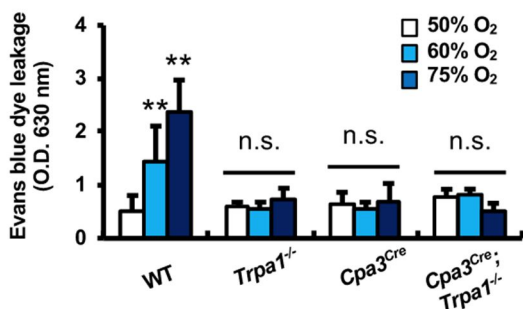
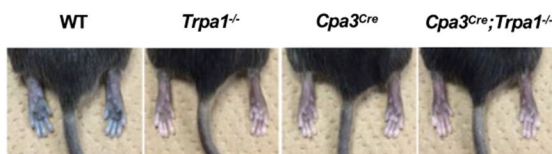


Figure 1 相対的低酸素状態に置いたマウスにおいて、体温低下およびエバンスブルーの血管外漏出を伴うアナフィラキシー用症状を発現

ノックアウトマウスやインヒビターを用いた解析から、マスト細胞の酸素応答性には transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)チャネルが強く関与していることを明らかにすることができた。この現象はマウスのみならず、ヒトマスト細胞を用いた *in vitro* の実験系でも確認した。このことから、マスト細胞は生体内においても酸素濃度の急激な変化を TRPA1チャネルで探知し、様々な炎症性メディエーターを放出、アナフィラキシー様症状の発現に關与することが明らかとなった。これは、抗原抗体反応によらない、新たなアナフィラキシー発症メカニズムの発見であり、高濃度の酸素を投与する治療からの脱却プロセスなどに、一石を投じる研究成果となった (Figure 2)。



前年度から続く新型コロナウイルス感染症の拡大により、若手研究者の派遣はできなかったが、この間、オンラインによって研究情報交換を継続し、定期的(毎月1回)なオンラインセミナーを行った研究成果発表を行うなど、両国研究者の研究交流や討論の機会確保に努めた。

Figure 2 マスト細胞欠失マウス (Cpa3^{Cre}) および TRPA1 欠失マウスにおける相対的低酸素アナフィラキシーの非誘導

4) 令和位3年度

皮膚炎発症に伴う皮膚内環境変化の解析: アトピー性皮膚炎自然発症モデルである NC/Tnd マウスを用いて皮膚炎発症と皮膚内環境の変化、特に酸素濃度との関連性について比較、解析を行った。SPF 環境下で飼育した皮膚炎未発症の NC/Tnd マウスにダニ抗原クリームを塗布することで皮膚炎症状を誘導し、クリーム塗布後経時的に酸素濃度インディケータである pimonidazole を注射したマウス皮膚を採取して免疫組織化学染色を実施、発症初期の皮膚内酸素環境変化を解析したところ、皮膚炎の発症に伴い、円詳細細胞の浸潤が増加するのと同様のタイミングで、Pimonidazole 陽性領域が広がっていくことが明らかとなった。とくに真皮層の pimonidazole 陽性となる低酸素領域には、樹状細胞、マスト細胞、リンパ球など各種免疫担当細胞が多く認められた。

低酸素環境における炎症性細胞の応答解析: 骨髄由来培養マスト細胞、血管内皮細胞初代培養細胞などの培養細胞株および初代培養細胞を通常酸素条件下および低酸素条件下で培養し、経時的に低酸素下における反応性の変化を確認したところ、マスト細胞の脱顆粒応答や血管内皮細胞のチューブ形成能は低酸素環境で亢進した。マスト細胞においては特に、相対的低酸素(高酸素下から平常酸素への変化)により、強く脱顆粒が誘導されることが明らかとなった。

ヒトサンプルにおける解析: マンチェスター大学において、アトピー性皮膚炎患者を中心と

した皮膚生検サンプルの ex vivo 培養系の確立により、低酸素培養下における HIF-1 の発現や炎症誘導性サイトカイン産生が亢進することを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsuda Kenshiro, Arkwright Peter D., Mori Yasuo, Oikawa Masa-aki, Muko Ryo, Tanaka Akane, Matsuda Hiroshi	4. 巻 205
2. 論文標題 A Rapid Shift from Chronic Hyperoxia to Normoxia Induces Systemic Anaphylaxis via Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channels on Mast Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2959 ~ 2967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Al Kindi Arwa, Williams Helen, Matsuda Kenshiro, Alkahtani Abdullah M., Saville Charis, Bennett Hayley, Alshammari Yasmine, Tan Soo Y., O'Neill Catherine, Tanaka Akane, Matsuda Hiroshi, Arkwright Peter D., Pennock Joanne L.	4. 巻 147
2. 論文標題 Staphylococcus aureus second immunoglobulin-binding protein drives atopic dermatitis via IL-33	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1354 ~ 1368.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2020.09.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ando Izumi, Karasawa Kaoru, Shioya Takao, Matsuda Hiroshi, Tanaka Akane	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of stress status using the stress map for guide dog candidates in the training stage using variations in the serum cortisol with nerve growth factor and magnesium ions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary and Animal Science	6. 最初と最後の頁 100129 ~ 100129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vas.2020.100129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kim Jeongtae, Wie Myung-Bok, Ahn Meejung, Tanaka Akane, Matsuda Hiroshi, Shin Taekyun	4. 巻 52
2. 論文標題 Benefits of hesperidin in central nervous system disorders: a review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anatomy & Cell Biology	6. 最初と最後の頁 369 ~ 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5115/acb.19.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda Kenshiro, Makita Yuka, Nagaoka Takanori, Sasaki Yuko, Maruyama Naoki, Tanaka Akane, Matsuda Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Improved effect of ultra-pure soft water on skin water content in older adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 364 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 向 亮、松田 浩珍、田中 あかね	4. 巻 14
2. 論文標題 皮膚アレルギーの動物モデル-機能性物質のスクリーニングと評価-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Functional Food Research	6. 最初と最後の頁 23 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32153/ffr.14.0_23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Muko R, Amagai Y, Matsuda H, Tanaka A
2. 発表標題 Effects of calcium and magnesium ions on AQP3 expression in keratinocytes
3. 学会等名 欧州アレルギー・免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuda K, Karasawa K, Arkwright PD, Kondo M, Tanaka A, Matsuda H
2. 発表標題 Mouse mast cell protease-6 induced aberrant vascular remodeling via monocyte chemotactic protein-1 in oxygen-induced retinopathy
3. 学会等名 欧州アレルギー・免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

比較動物学研究室HP
http://web.tuat.ac.jp/~mol_path/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	雨貝 陽介 (Amagai Yosuke) (50733143)	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員 (82609)	
研究分担者	松田 研史郎 (Matsuda Kenshiro) (70642619)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・産学官連携研究員 (12605)	
研究分担者	松田 彬 (Matsuda Akira) (90613969)	岡山理科大学・獣医学部・講師 (35302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	マンチェスター大学		