

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15977

研究課題名(和文)酸素起因性アナフィラキシー病態におけるマスト細胞の酸素受容機構

研究課題名(英文)Oxygen-mediated mast cell activation in oxygen-induced anaphylaxis

研究代表者

松田 研史郎(Matsuda, Kenshiro)

筑波大学・革新的創薬開発研究センター・研究員

研究者番号：70642619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：60%以上の高濃度酸素環境から通常酸素環境への劇的な酸素濃度変化(相対的低酸素刺激)により、成体マウスにおいて全身性アナフィラキシーが誘導される事を発見した。さらに、マスト細胞欠損マウスの血中ヒスタミン、トリプターゼ、ヘキソサミニダーゼ量が野生型マウスと比較して有意に減少した事からそのメディエーターがマスト細胞である事を見出した。また、TRPA1欠損マウス骨髄よりマスト細胞を培養し、相対的低酸素刺激を誘導した所、培養上清中のヒスタミン、トリプターゼ、ヘキソサミニダーゼ量が有意に減少した。以上の事からマスト細胞に発現するTRPA1の活性化により酸素センシングが行われていることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アナフィラキシーは、食物、医薬品や昆虫刺咬などのアレルゲン侵入の他、運動や温度などもトリガーとなる全身性アレルギー反応で、特に免疫学的機序を介さない、直接的にマスト細胞を活性化させるアナフィラキシーはその原因の特定が急務であった。本研究では、相対的低酸素刺激による非免疫学的機序に基づく新たなマスト細胞の活性化メカニズムを明らかにし、酸素が新たなアナフィラキシーの誘導因子である事を見出した。この事から相対的低酸素状況が想定される純酸素療法や急性高山病などの酸素起因性疾患は、アナフィラキシーを惹起するリスクがあり、その予防方法や治療方法提言のための基礎的知見として学術的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Rapid shift of chronic hyperoxia to normoxia (relative hypoxia) induced systemic anaphylaxis in adult mice, however, anaphylactic response was inhibited in mast cell-deficient mice after relative hypoxic stimulation. Moreover, plasma histamine, tryptase, and beta-hexosaminidase release were also reduced in mast cell-deficient mice. These findings demonstrated that mast cell was the main regulator of oxygen-induced anaphylaxis. To investigate how mast cell regulate oxygen-induced anaphylaxis, bone marrow-cultured mast cell (BMMC) was stimulated by relative hypoxia. After relative hypoxic stimulation, histamine, tryptase, and beta-hexosaminidase release were reduced in TRPA1-deficient BMMC as compared with wild type BMMC. These results suggested that mast cell is the main mediator of oxygen-induced anaphylaxis, and TRPA1 regulate mast cell activation through relative hypoxic stimulation.

研究分野：Immunology

キーワード：アナフィラキシー マスト細胞 TRPA1 酸素

1. 研究開始当初の背景

アレルギー反応はI型からIV型までに分類され、マスト細胞や各種T細胞、B細胞などの免疫担当細胞が関与するが、特にマスト細胞の活性化はアレルゲン刺激によりヒスタミンや tryptase など種々のケミカルメディエーターを即時放出することでI型アレルギー反応相や血管新生、細胞外マトリックスのリモデリングなどを亢進させることが知られている。アナフィラキシーはI型アレルギー反応として最も重篤な症状を示し、治療が遅れ血圧低下や意識障害を伴うショック状態になるとものの数時間で死に至るが、その発症起点および増悪化機構については未だ十分解明されていない。本病態は免疫学的機序に基づくIgE及び補体介在性アナフィラキシーとは別に、マスト細胞を直接的に活性化させる非免疫学的機序によるものが存在する。申請者は、未熟児網膜症の基本病態が異常血管新生によって惹起されることから、血管新生因子を産生放出するマスト細胞が本疾患発症に関与するのではとの独創的な発想をするに至った。この仮説のもとに相対的低酸素状態がマスト細胞を活性化させることに気づいた(*J. Clin. Invest.* 127:3987-4000, 2017)。このことから、急性高山病に代表される酸素起因性疾患や呼吸器系疾患における純酸素療法はアナフィラキシーを助長するとの推論に至った。

2. 研究の目的

マスト細胞の脱顆粒応答は、PKC経路やIP3による小胞体ストレス応答が有名で脱顆粒機構の詳細は古くより研究されている(*Nature Rev. Immunol.* 6:218 - 230, 2006)。他方、酸素ストレスに対するTRPA1チャネルを介した細胞内シグナル経路は、活性酸素種ROSに基づくERK及びPI3K/AKTシグナル経路が報告されているが(*Cancer Cell.* 33:985 - 1003, 2018)、相対的低酸素環境下におけるシグナル伝達の詳細は一切明らかとなっていない。本研究では、相対的低酸素刺激に対してマスト細胞が活性化する分子機構を特定し酸素によるマスト細胞の脱顆粒応答機序を明らかにした。

3. 研究の方法

*In vivo*および*in vitro*の試験から構成され、前者では相対的低酸素刺激に対するマスト細胞(*Cpa3^{Cre}*)欠損マウス、TRPA1(*Trpa1^{-/-}*)遺伝子欠損マウス及びマスト細胞とTRPA1ダブルノックアウト(*Cpa3^{Cre};Trpa1^{-/-}*)マウスにおけるアナフィラキシーの重症度を体温低下率やエバンスブルー透過性、血中ヒスタミン、トリプターゼ、 β ヘキソサミニダーゼ量の解析によって評価した。また、後者では、各種遺伝子改変マウスより作出した骨髄由来マスト細胞を対象に、相対的低酸素刺激に対する活性化機構の解析を実施した。

- (1) 相対的低酸素刺激に対するアナフィラキシー重症度の解析
成体マウスを75%、60%、50%酸素環境で4、8、16、24、120時間飼育し、通常酸素濃度に戻した直後の直腸温度及びエバンスブルー漏出量をアナフィラキシーの重症度として評価した。
- (2) マスト細胞のTRPA1受容体を介したアナフィラキシー病態の解析
*Cpa3^{Cre}*マウス、*Trpa1^{-/-}*マウス及び*Cpa3^{Cre};Trpa1^{-/-}*マウスを作出し、75%、60%、50%高酸素環境から相対的低酸素刺激を誘導し、アナフィラキシーの重症度を体温低下率及びエバンスブルー漏出量で評価した。
- (3) 培養マスト細胞の活性化機構の解析
野生型マウス、TRPA1欠損マウス骨髄より作出した培養マスト細胞に対して、相対的低酸素刺激を誘導し、膜タンパク質におけるTRPA1発現量をウェスタンブロット法により解析した。また、同刺激後の培養上清中のヒスタミン、トリプターゼ、 β ヘキソサミニダーゼ量をELISA法により解析した。
- (4) マスト細胞欠損マウスに対するマスト細胞移入後のアナフィラキシー病態の解析
野生型及びTRPA1欠損マウス骨髄を4週間Pokeweed-mitogen spleen conditioned medium (PWM-SCM)を添加して培養し、分化・増殖させた培養マスト細胞を*Cpa3^{Cre}*マウスに腹腔内投与し、相対的低酸素刺激を誘導後の直腸温度、エバンスブルー漏出量及び血中ヒスタミン及びトリプターゼ濃度を解析した。

4. 研究成果

- (1) 相対的低酸素刺激に対するアナフィラキシー重症度の解析

直腸温度は、60%及び75%高酸素環境からの相対的低酸素刺激によって有意に減少し、エバンスブルーのOD値は、有意に増加した(図1A、B)。他方、50%の高酸素環境からの相対的低酸素刺激は、直腸温度及びエバンスブルーの透過性に変化を与えなかった(図1A、B)。また、16時間以上の高酸素曝露によって、直腸温度は有意に減少し、血中のエバンスブルーのOD値は増加した(図1C、D)。加えて、アナフィラキシー病態の重症度は24時間以上の高酸素曝露でさらに増悪化した(図1C、D)。他方、4時間及び8時間の高酸素曝露では、直腸温度及びエバンスブルー透過性に有意な変化は見られなかった。以上のことから、16時間以上、60%以上の高酸素環境からの相対的低酸素刺激が、アナフィラキシー病態を誘導する酸素閾値と考えられた。続いて、*Cpa3^{Cre}*マウス、*Trpa1^{-/-}*マウス及び*Cpa3^{Cre};Trpa1^{-/-}*マウスを作成し、75%、60%、50%高酸素濃度からの相対的低酸素刺激を誘導し、アナフィラキシーの重症度を体温低下率及びエバンスブルー漏出量を測定したところ、60%及び75%酸素濃度から相対的低酸素刺激を誘導した際に野生型マウスでは、直腸温度が1℃以上減少し、エバンスブルーの透過性が有意に増加した。一方で、*Cpa3^{Cre}*マウス、*Trpa1^{-/-}*マウス、*Cpa3^{Cre};Trpa1^{-/-}*マウスでは、直腸温度及びエバンスブルー透過性に変化はなかった(図2A、B)。

培養マスト細胞の活性化機構の解析

(1)の結果をもとに、TRPA1を介してマスト細胞が、相対的低酸素刺激に対して活性化すると推論した。そこで、野生型マウス及び*Trpa1^{-/-}*マウス骨髄を α -MEM+10% FCS + 10% PWM-SCMで4週間培養し、骨髄由来マスト細胞(BMMC)を作製した。BMMCを、75%高酸素環境で24時間培養し、さらに24時間20%の通常酸素環境で培養後、BMMCの膜タンパク質を抽出し、TRPA1発現を解析した。野生型マウス由来BMMCでは、相対的低酸素刺激後、TRPA1発現が通常酸素環境下で培養したBMMCと比較して増加した(図3A)。一方、*Trpa1^{-/-}*マウス由来BMMCでは、TRPA1発現が確認できなかった(図3A)。また、同細胞の培養上清を回収し、相対的低酸素刺激後のTryptase、histamine、 β -hexosaminidase濃度を測定した。野生型マウス由来BMMC培養上清中のTryptase、histamine、 β -hexosaminidase濃度は、*Trpa1^{-/-}*マウス由来BMMC培養上清と比較して有意に増加した(図3B、C、D)。以上のことから、TRPA1を介してマスト細胞が活性化し、アナフィラキシーの病態発現に寄与している事が示唆された。最後に、マスト細胞欠損*Cpa3^{Cre}*マウスに対して野生型及びTRPA1欠損BMMCを移入し、アナフィラキシーの重症度及び血中tryptase、histamine濃度を測定した。図4に示すように、野生型マウス由来BMMC移入後に相対的低酸素刺激を誘導した結果、対照群と比較して、直腸温度は有意に低下した。またエバンスブルー漏出量は有意に増加した(図4A、B)。一方、TRPA1欠損マウス由来BMMCを移入しても直腸温度及びエバンスブルー漏出量に変化は見られなかった(図4A、B)。また、相対的低酸素刺激後の血中tryptase及びhistamine濃度は、野生型マウス由来BMMCを移入した*Cpa3^{Cre}*マウスと比較して、TRPA1欠損マウス由来BMMC移入後に有意に減少した(図4C、D)。これらのことから、相対的低酸素刺激によるアナフィラキシーの発症は、TRPA1を

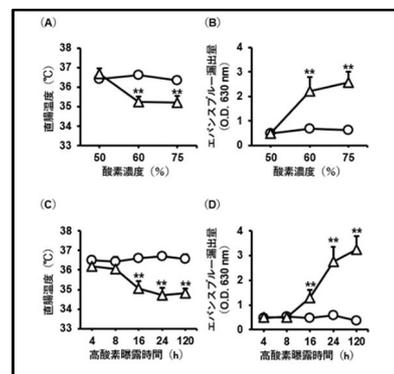


図1. 相対的低酸素刺激に対する濃度依存的、曝露時間依存的アナフィラキシー病態 (A) 50%、60%、75%酸素濃度からの相対的低酸素刺激に対する直腸温度 (B) 及びエバンスブルー透過性。4、8、16、24、120時間高酸素曝露後の相対的低酸素刺激に対する直腸温度 (C) 及びエバンスブルー透過性 (D)。

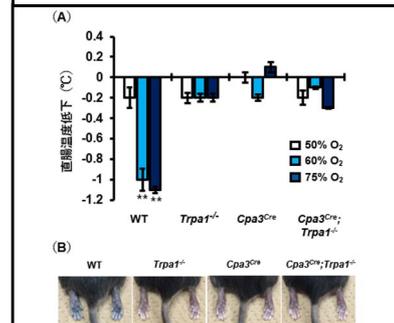


図2. マスト細胞欠損 (*Cpa3^{Cre}*) マウス、TRPA1 (*Trpa1^{-/-}*) 欠損マウス及び高遠山雲子 (*Cpa3^{Cre};Trpa1^{-/-}*) 欠損マウスに対する相対的低酸素刺激後のアナフィラキシー病態 (A) 50%、60%、75%酸素濃度からの相対的低酸素刺激に対する直腸温度 (B) 及びエバンスブルー透過性。

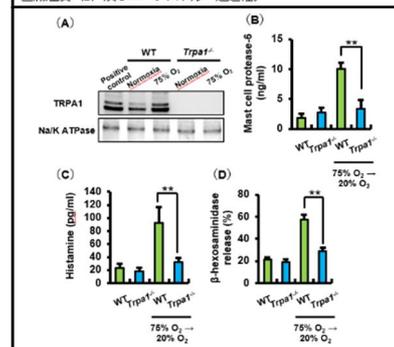


図3. 骨髄由来マスト細胞における相対的低酸素刺激後のTRPA1発現とマスト細胞の活性化 (A) マスト細胞欠損 (*Cpa3^{Cre}*) マウス、TRPA1 (*Trpa1^{-/-}*) 欠損マウス由来培養マスト細胞における相対的低酸素刺激後のTRPA1発現量と相対的低酸素刺激後の培養上清中の (B) β -hexosaminidase、(C) mast cell protease-6 (Tryptase)、(D) histamine量。

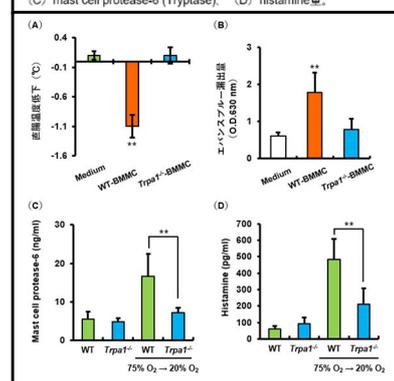


図4. マスト細胞欠損 (*Cpa3^{Cre}*) マウスに対する野生型及び*Trpa1^{-/-}*マウス由来BMMC移入後のアナフィラキシー病態 (A) 直腸温度低下及び (B) エバンスブルー漏出量、培養上清中の (C) Mouse mast cell protease-6 (Tryptase)、(D) histamine量。

介したマスト細胞がトリガーであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田研史郎、田中あかね、松田浩珍
2. 発表標題 未熟児網膜症モデルマウスにおけるトリプターゼを介した網膜異常血管のリモデリング
3. 学会等名 Tokyo Biomarker Innovation Research Association Forum
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenshiro Matsuda, Kaoru Karasawa, Peter D Arkwright, Masatoshi Kondo, Akane Tanaka, Hiroshi Matsuda
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 European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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	The University of Manchester			