

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17319

研究課題名(和文)汗アレルギーにおける抗原感作経路とIgE産生機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of antigen sensitization pathway and IgE production mechanism in sweat allergy

研究代表者

石井 香(Ishii, Kaori)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：90448267

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)：ADやコリン性蕁麻疹の皮膚内で起こる汗の漏出と同じ状況を再現し抗原特異的IgE産生の有無を検討した。実際にはヘアレスマウス(HR-1)を用いて、ストリッピングとマイクロニードルによる表皮と真皮へ、生食とヒト汗それぞれに溶解したOVA投与し感作を検討した。その結果このマウスでは系統的にIgE産生の検証は困難であったが、真皮感作に於いて汗に溶解したOVAで特異的IgE産生が増強されることが確認された。この結果から汗には抗原感作の際のアジュバント効果の可能性を見出し、次にヒトやマウスの表皮ケラチノサイト細胞株をヒト汗で刺激したところ、ある特異的なサイトカインの発現増強とERKのリン酸化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、汗刺激による真皮内感作での特異的抗体産生増強や、表皮ケラチノサイトの活性化や特異的サイトカイン増強を確認した。これらの結果は、ADやコリン性蕁麻疹では汗管より汗の漏出が確認されていることから、漏出した汗刺激による皮膚内のケラチノサイトや抗原提示細胞などの活性化が起こることで、抗原特異的感作が成立しうる可能性の発端を見出したことになる。

今後はこれらの結果を元にさらに抗体産生に関わる細胞を用いて、汗による汗抗原感作のメカニズムの詳細を検討し、疾患増悪に関係する状況を細胞レベルで追求する。

研究成果の概要(英文)：We reproduced the same situation as sweat leakage that occurs in the skin of atopic dermatitis and cholinergic urticaria, and examined the presence or absence of antigen-specific IgE production. In fact, using a hairless mouse (HR-1), OVA dissolved in saline and human sweat was administered to the epidermis and dermis by stripping and microneedles, and sensitization was examined. As a result, it was confirmed that it was difficult to systematically verify IgE production in this mouse, but in dermal sensitization, OVA dissolved in sweat enhanced specific IgE production. From this result, we found that sweat may have an adjuvant effect during antigen sensitization, and then stimulated human and mouse epidermal keratinocyte cell lines with human sweat to enhance the expression of certain specific cytokines and phosphorus in ERK.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 コリン性蕁麻疹 汗抗原感作 汗アジュバント効果 汗漏出 タイトジャンクシ

1. 研究開始当初の背景

汗は保湿や抗菌ペプチド、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ等の皮膚バリア機能を持ち、体温調節や細菌増殖抑制など恒常性の維持に貢献している。一方、汗はアトピー性皮膚炎(AD)などの増悪因子でもあり、多くのAD患者やコリン性蕁麻疹患者では、汗中に含まれるマラセチア由来抗原(汗の主要抗原)に対する特異的IgEが検出されており、この汗抗原特異的IgEを介してマスト細胞および好塩基球が活性化され、汗アレルギーが引き起こされる。汗中の主要抗原として同定されたMGL_1304は、皮膚の常在菌の一つの*Malassezia globosa*の分泌する蛋白で、ADおよびコリン性蕁麻疹患者の70~80%にこの蛋白に対する特異的IgEが検出されている。しかし、汗中に含まれるMGL_1304蛋白の濃度はAD患者と健常人の間で明らかな差はなく、MGL_1304に対するIgGは健常人においてもADおよびコリン性蕁麻疹患者でも同様に検出される。さらに、コリン性蕁麻疹ではADや喘息ほど顕著なタイプ2炎症は見られないことから、これらの疾患における汗アレルギーには、単なる皮膚バリア障害やTh2環境だけでは説明出来ない、皮膚固有の感作機序が関与すると考えられる。

角化細胞は、表層から2層目の細胞がClaudin-1より構成されるタイトジャンクションを形成し、皮膚バリアとして外界から異物の侵入を防御する。生理的環境では、タイトジャンクション接合部にランゲルハンス細胞(LC)が樹状突起を露出させ、皮膚表面から侵入した抗原を取り込んで獲得免疫系による感作を成立させる。表皮のClaudin-1に発現不全が生じると、そのタイトジャンクションが緩み、過剰な抗原がLC細胞に取り込まれるとともに真皮内の樹状細胞(Dermal DC)を巻き込みながら更なる免疫反応が引き起こされる。一方、AD、痒疹、コリン性蕁麻疹などの皮膚疾患では、真皮内の汗管から汗が漏出することが報告され、さらにその現象は汗管上皮細胞のタイトジャンクションを形成するClaudin-3のKOマウスによって再現できることが報告されている。汗管を通して真皮内に漏出した抗原は真皮樹状細胞(Dermal DC)に補足され、T細胞へ提示されると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではADやコリン性蕁麻疹の皮膚内で起こる汗の漏出と同じ状況を再現し、汗抗原を表皮または真皮に投与することでその際の抗原特異的IgE産生の有無を検討する。皮膚の抗原提示細胞として、表皮にはランゲルハンス細胞(LC)が、真皮にはDermal DCが存在しているが、IgE産生におけるこれらの抗原提示細胞の役割の違いは知られていない。そこで本研究では汗抗原が補足される提示細胞がIgE産生に及ぼす影響の差異を明らかにする。そのためマウス皮膚を用いて、ストリッピングまたはマイクロニードルを用いて抗原を表皮または真皮の位置に直接投与し、抗原特異的IgE産生の有無を検討する。また汗管を通して表皮を経ること無く直接真皮内に抗原が侵入する経路を再現するため、汗管上皮のタイトジャンクションを構成するClaudin-3のKOマウスを作製し、マウス皮膚に汗抗原を塗布し、IgE産生の誘導を検討する。

以上の実験を行うことで、ADやコリン性蕁麻疹で見られる汗抗原に対するIgE産生における抗原侵入経路の意義を明らかにすることが期待できる。

3. 研究の方法

抗原をマウス表皮または真皮の狙った場所へ直接投与するためのマイクロニードルの長さや形状を検討する。使用するマウスは脱毛の必要のないヘアレスマウス(HR-1)を用いて、ストリッピングとマイクロニードルにより表皮と真皮へそれぞれ抗原投与する系を確立し、その際に生食とヒト汗それぞれに溶解したOVAまたは汗抗原を6回/2週で投与し、血清中に誘導された特異的IgGおよび特異的IgEをELISAで測定する。

ゲノム編集技術を使って作製されたClaudin-3 KOマウスを用いて、汗管からの真皮内への汗漏れを確認後、足裏フットパッドにOVAや汗抗原を塗布し、マイクロニードルの系と同様に、感作後の血清中の特異的IgGおよび特異的IgEをELISAで測定する。

また上記のマウス皮膚での抗原感作の際に溶媒として使用する汗は、フィルター濾過した複数名の健常人汗mixを用い、アジュバントとして投与し抗体産生の比較検討を行う。

4. 研究成果

当初は長さの違うマイクロニードルをメーカーに外注して作製する予定だったが、メーカーが作製困難とのことで、急遽インシュリン投与用の 34G ニードルに真皮到達できる深度のアダプターを調整作製し真皮投与を行った。表皮投与にはストリッピング用のテープで角層を除去して抗原を染み込ませた絆創膏を貼り付けて行った。

抗原投与に用いた HR-1 マウスは、系統的に IgE 産生の検証は困難であったが、真皮感作に於いて、汗に溶解した OVA で特異的 IgG 産生が増強されていることが確認された(Fig.1)。この結果から汗漏出における真皮内での抗原感作の表皮内感作と違うメカニズムの可能性を示唆し、また真皮内感作に於ける汗には抗原感作の際のアジュバント効果の可能性が推測された。この結果を元に、さらにヒトやマウスの表皮ケラチノサイト細胞株をヒト汗で刺激したところ、ある特異的なサイトカインの発現増強と ERK のリン酸化を確認した(Fig.2)。既知の論文では汗中には IL-1 α 、IL-1 β 、IL-31 が検出されることが確認されており、これらのサイトカインがアジュバント効果に関与している可能性が示唆された。

AD やコリン性蕁麻疹では汗管より汗の漏出が確認されていることから、漏出した汗刺激による皮膚内のケラチノサイトや抗原提示細胞などの活性化が起こることで、疾患特異的な抗原感作が成立しうる可能性の発端を見出したことになる。

AD やコリン性蕁麻疹の皮膚内で起こる汗の漏出と同じ状況を再現した Claudin-3 KO マウスは本研究の終了間際(2022年3月)に作製できたので抗原感作が間に合わなかったが、予定した研究は2022年度からの科研(課題番号 22K16281)に引き継ぐ。

今後はさらにヒトやマウスの系で、ケラチノサイトで増強されたサイトカインと汗に溶解した抗原を用いて、抗原提示細胞を刺激することで特異的抗体産生の増強の検討や、汗管バリアのタイトジャンクションに関与する Claudin-3 KO マウスを用いた抗原感作実験で、汗漏出と特異的抗原感作の関連を検討していく予定である。

Fig.1

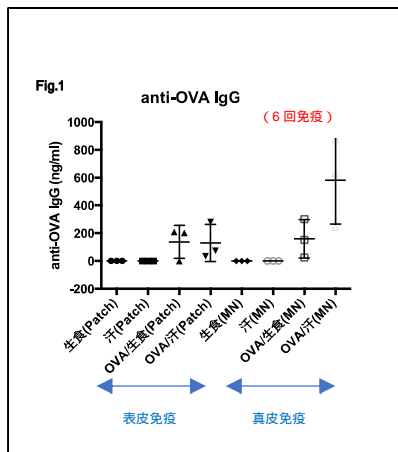
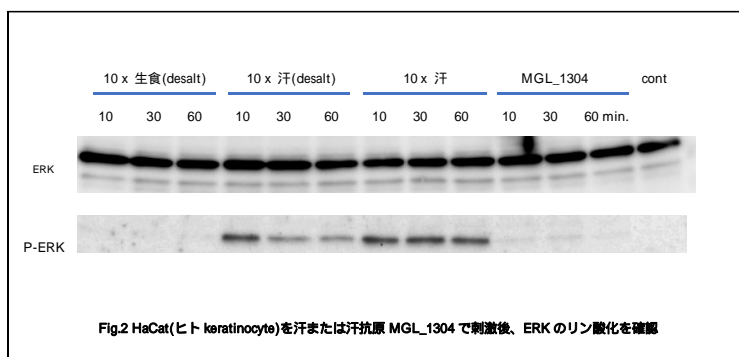


Fig.2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------