

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16204

研究課題名（和文）マスト細胞と発汗の相互作用の研究

研究課題名（英文）Study of the interaction between mast cells and sweating

研究代表者

飯田 忠恒（Iida, Tadatsune）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80844381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、発汗障害を伴うコリン性蕁麻疹において、蕁麻疹の原因と考えられるマスト細胞の活性化と、発汗障害との関連について調べた。結果として、マウスを用いたマスト細胞の活性化や除去は、発汗に明らかな影響を及ぼさないことを確認した。その一方で、マクロファージを活性化させると、発汗低下が見られるのと同時に、マスト細胞の活性化に関わる遺伝子の発現が上昇することがわかった。このことから、マスト細胞の発汗障害への影響は限定的である可能性と、マスト細胞が他の免疫細胞の影響を受けて活性化している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コリン性蕁麻疹に対する標準的治療薬である抗ヒスタミン薬は、活性化したマスト細胞の放出するヒスタミンの作用を抑えるものであるが、従来より発汗障害を伴うコリン性蕁麻疹には臨床的に効果が十分でないことが指摘されてきた。本研究により、その理論的裏付けが成され、マスト細胞活性化よりも上流のメカニズムを抑えることが、発汗障害およびコリン性蕁麻疹の治療につながることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the relationship between activation of mast cells, which are thought to cause urticaria, and dyshidrosis in cholinergic urticaria. We found that activation or elimination of mast cells in mice had no apparent effect on sweating. On the other hand, activation of macrophages resulted in decreased sweating and increased expression of genes involved in mast cell activation, suggesting that mast cells may be activated under the influence of other immune cells.

研究分野：皮膚科学分野

キーワード：発汗 マスト細胞 自律神経 神経免疫 蕁麻疹

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は皮膚や粘膜に分布し、IgE を介してアレルギー反応を引き起こすが、IgE を介さない活性化経路も知られている。特にマスト細胞受容体 MRGPRX2 を介した経路は、感染制御や創傷治癒、神経性疼痛など多彩な機能に関わることが近年明らかとなっている。皮膚のマスト細胞活性化は蕁麻疹を引き起こすが、蕁麻疹の病型の一つに発汗刺激が誘因となるコリン性蕁麻疹がある。コリン性蕁麻疹はさらに汗アレルギーを有する型と有さない型に分類されるが、特にアレルギーを有さない型では、発汗刺激が IgE を介さずにマスト細胞を活性化していることが想定される。しかしその経路は特定されていない。また、コリン性蕁麻疹には発汗障害を合併する場合があります。減汗性コリン性蕁麻疹、あるいは特発性後天性全身性無汗症（蕁麻疹のない無汗症も含む疾患概念）と呼ばれている。コリン性蕁麻疹や減汗性コリン性蕁麻疹では、マスト細胞が増えていることが報告されているが、申請者らはコリン性蕁麻疹のない無汗症でも顕著なマスト細胞増加があることを見出した（図1）。このことから、マスト細胞は蕁麻疹症状だけでなく、発汗自体にも関与している可能性が考えられた。コリン性蕁麻疹は一般的な蕁麻疹治療（抗ヒスタミン薬等）に抵抗例が多い。さらに発汗障害を合併すると、その半数近くが全身的ステロイド投与にも抵抗性であることを申請者らは示しており、病態に基づいた新たな治療法開発が必要な状況である。そこで本研究では、マスト細胞の活性化の経路と、発汗障害との関連に着目し、病態解明を行うこととした。

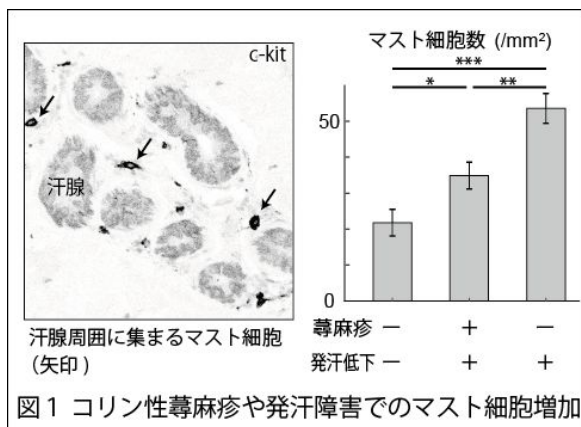


図1 コリン性蕁麻疹や発汗障害でのマスト細胞増加

2. 研究の目的

本研究では、コリン性蕁麻疹や発汗障害におけるマスト細胞の増加・活性化の機序や、マスト細胞の活性化が発汗に及ぼす影響について調べることで、新たな治療ターゲットを見つけ出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 汗腺周囲のマスト細胞の3次元イメージング

マスト細胞の汗腺および発汗神経との位置関係を解析することで、その相互作用を推測した。マウスの足底にある汗腺を用いて、マスト細胞を含めた3次元イメージングを行うための条件検討を行ったのち、組織学的な解析を行った。

(2) マウスを用いた発汗試験

マウスにアセチルコリン受容体拮抗薬を投与した際の、足底での発汗量を観察した。この発汗が、マスト細胞を薬理的に活性化させた場合や除去した場合、他の免疫細胞を活性化および除去した場合に影響を受けるかを観察した。

(3) マスト細胞の遺伝子発現量解析

マウス足底の汗腺および周囲組織から単一細胞懸濁液を作成し、フローサイトメトリーでのマスト細胞の分離を行い、RNAを抽出することで遺伝子発現量解析を行うことを試みた。また、BD Rhapsodyのシステムを用いたシングルセル RNA-seq によりマスト細胞のクラスターを抽出し、その発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) 汗腺周囲のマスト細胞の3次元イメージング

マウスの汗腺を摘出して固定したのち、汗腺を蛍光標識した phalloidin、マスト細胞を蛍光標識した avidin で染色し、さらに神経線維を Tuj1 に対する抗体を用いて免疫染色を行うことで、マスト細胞、汗

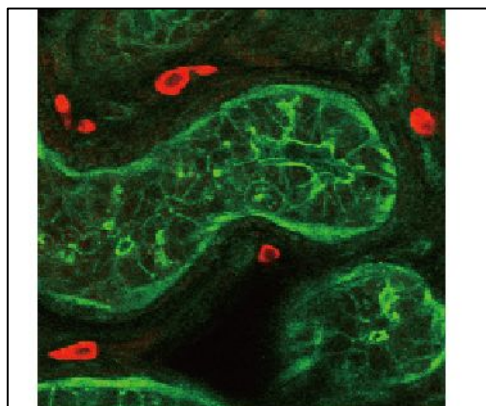


図2 マウス汗腺（緑）とマスト細胞（赤）

腺、神経線維の蛍光多重染色を行った。このサンプルを、屈折率調整液に浸漬することで組織透明化を行い、共焦点顕微鏡で撮影することで、3次元像を取得した(図2)。マスト細胞は汗腺周囲に散在するが、神経線維に近接するような分布は観察した範囲では認められなかった。その一方で、同様に免疫染色(抗Iba1抗体)で染色したマクロファージの一部では、神経線維との近接が認められ、汗腺周囲におけるマクロファージと神経線維の何らかの相互作用の存在が示唆された(図3)。

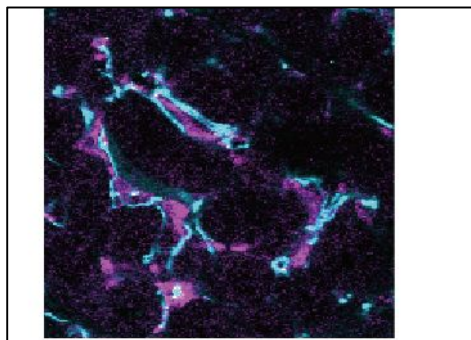


図3 マウス汗腺の発汗神経(シアン)とマクロファージ(マゼンタ)

(2) マスト細胞活性化の発汗への影響

マウス足底のマスト細胞を薬理的に活性化させた状態で、アセチルコリン受容体拮抗薬を投与した際の、足底での発汗量を観察した。マスト細胞活性化薬剤の投与15分後、12時間後、1日後に観察を行ったが、明らかな発汗減少は認められなかった。その一方で、マクロファージを薬理的に活性化させた状態で、アセチルコリン受容体拮抗薬を投与した際の足底での発汗量を同様に観察したところ、徐々に発汗低下が生じることを見出した。そこで、マスト細胞を欠損したマウスを用いて、マクロファージを薬理的に活性化させ、足底での発汗量を観察したが、マスト細胞非欠損マウスと同様に発汗低下が見られた(図4)。

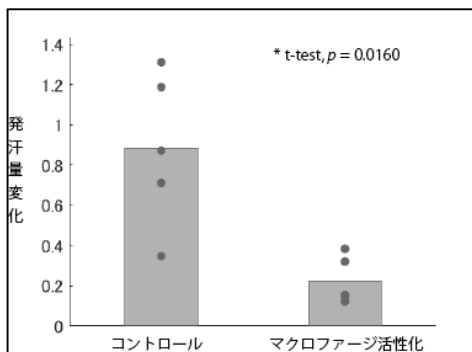


図4 マスト細胞欠損マウスでのマクロファージ活性化による発汗低下

このことから、マスト細胞の活性化は直接的には発汗に影響しないこと、およびマクロファージ活性化による発汗低下はマスト細胞を介さない機序で生じることが示唆された。

(3) マスト細胞の遺伝子発現量解析

マウス足底の汗腺周囲のマスト細胞を選別して採取し、遺伝子発現量解析を行うことを試みた。まず、汗腺および周囲組織を採取し、酵素処理により単一細胞懸濁液を作成し、表面抗原であるc-kitに対する抗体等を用いてセルソーターによる分取を試みた。しかし、マスト細胞の分画を同定できず、分取はうまく行かなかった。これは、c-kitの抗体染色によるシグナルが弱いことが原因と考えられたため、次に遺伝子改変マウスを用いてマスト細胞を蛍光標識することを試みた。具体的にはCpa3-Creマウス(主にマスト細胞で発現するCpa3分子のプロモーター下にCreリコンビナーゼを産生する)にCAG-tdTomatoマウス(Cre存在下に赤色蛍光分子tdTomatoを産生する)を交配した。このマウスにおいて実際にマスト細胞にtdTomatoが発現するのかを確かめるため、組織切片を作成し、マスト細胞の染色(avidin)を加えて観察を行った。しかし、tdTomatoはマスト細胞以外の細胞にも広く発現が認められ、マスト細胞に対する特異性が十分でないと判断し、中止とした。

そこで、汗腺および周囲組織から作成した単一細胞懸濁液をそのままシングルセルRNA-seqにかけ、その中から遺伝子発現パターンをもとにマスト細胞を同定することを試みた。その結果、Tpsab1, Cpa3, Tpsab2等のマスト細胞マーカー分子を発現するクラスターを見出すことができた(図5)。マスト細胞のクラスターでの遺伝子発現量について、発汗低下を生じたマクロファージ活性化マウスとコントロールマウスで比較したところ、マクロファージ活性化マウスのマ

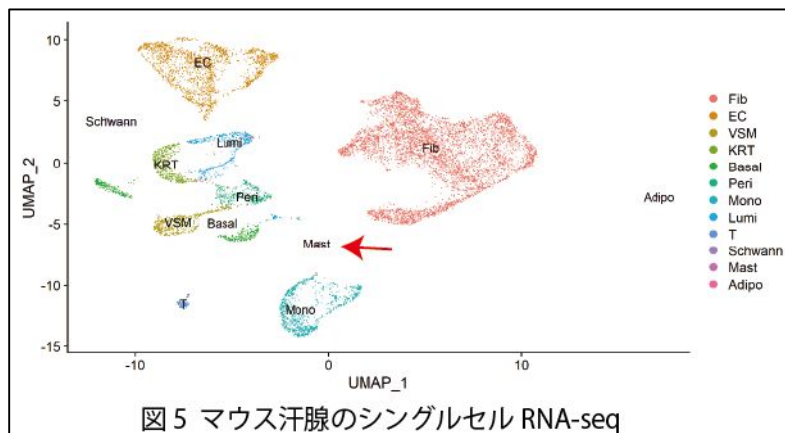


図5 マウス汗腺のシングルセルRNA-seq

スト細胞において脱顆粒のしやすさに関する遺伝子群 (Fcer1a, Gata2) の増加傾向が認められた。

これらの結果から、発汗障害を伴うコリン性蕁麻疹におけるマスト細胞の活性化は、マクロファージなど他の免疫細胞の活性化に引き続いて生じている可能性と、マスト細胞の活性化自体の発汗への影響は限定的である可能性が考えられた。マスト細胞を脱顆粒させる直接の刺激については依然不明であるものの、他の免疫細胞や放出するサイトカイン等によりマスト細胞が脱顆粒しやすい状態になっていると考えられ、発汗障害を伴うコリン性蕁麻疹の治療ターゲットとしては、マスト細胞活性化のより上流に位置する免疫細胞やサイトカインが候補となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 飯田忠恒、沖山奈緒子	4. 巻 335
2. 論文標題 特発性後天性全身性無汗症に対するステロイドパルス療法	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Monthly Book Derma	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 飯田忠恒、小笹静佳、和田昇悟、生田目拓、若佐卓矢、片桐正博、稲澤美奈子、藤本智子、並木剛、横関博雄、沖山奈緒子	4. 巻 65
2. 論文標題 アナフィラキシーに至るコリン性蕁麻疹を合併した特発性後天性全身性無汗症の1例	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 皮膚科の臨床	6. 最初と最後の頁 2062-2065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 8件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 飯田忠恒、沖山奈緒子
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症の病態解析 無汗症になぜステロイドが効くのか
3. 学会等名 第122回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田忠恒
2. 発表標題 発汗異常症の病態と治療について
3. 学会等名 第114回日本皮膚科学会茨城地方会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯田忠恒
2. 発表標題 病態から考える特発性後天性全身性無汗症の診療
3. 学会等名 第123回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯田忠恒、内田千恵、藤田真依子、稲澤美奈子、藤本智子、並木剛、沖山奈緒子
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症の治療戦略と今後の展望
3. 学会等名 第32回日本発汗学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯田忠恒
2. 発表標題 無汗症から知る汗と免疫の関係
3. 学会等名 第42回日本美容皮膚科学会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Chie Uchida, Tadatsune Iida, Takeshi Namiki, Naoko Okiyama
2. 発表標題 Involvement of Macrophage in the Pathogenesis of Acquired Idiopathic Generalized Anhidrosis (AIGA)
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第49回年次学術大会・総会（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯田忠恒、沖山奈緒子
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症の病態解析 - 無汗症になぜステロイドが効くのか -
3. 学会等名 第122回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田忠恒
2. 発表標題 発汗異常症の病態と治療について
3. 学会等名 第114回日本皮膚科学会茨城地方会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯田忠恒、小林大輔、藤本智子、並木剛、横関博雄
2. 発表標題 3次元イメージングとRNA-seqで紐解く汗腺の機能とその障害
3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田真依子、飯田忠恒、竹下八菜、藤本智子、沖山奈緒子
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症において血清CEA低値とIgE高値はステロイド治療抵抗性のマーカーとなる
3. 学会等名 第30回日本発汗学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadatsune Iida, Takeshi Namiki, Daisuke Kobayashi, Hiroo Yokozeke, Naoko Okiyama
2. 発表標題 Macrophage activation promotes hypohidrosis
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第47回年次学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田忠恒、深江大毅、宗次太吉、小林大輔、横関博雄
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症の病態解析 -汗腺の形態変化と炎症細胞浸潤について
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田忠恒、小林大輔、田村友樹、並木剛、横関博雄
2. 発表標題 特発性後天性全身性無汗症における免疫系の異常
3. 学会等名 第29回日本発汗学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadatsune Iida, Daisuke Kobayashi, Tomoki Tamura, Hiroo Yokozeke, Takeshi Namiki
2. 発表標題 Monocytic lineage cells distributed along sweat glands modulate sweat function
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第46回年次学術大会・総会（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------