

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19373

研究課題名（和文）親和性アレルゲンのハイブリッド刺激による生体内アレルギー応答の『多様性』制御機構

研究課題名（英文）Complex regulatory mechanisms of allergic responses with mixed allergens with different affinities

研究代表者

鈴木 亮（Suzuki, Ryo）

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：00344458

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：アレルギー反応の決定において、IgE受容体の活性化状態は極めて重要な役割を担っている。アレルゲンの物理化学的特性（親和性やハプテン価数など）の違いが、アレルゲンによるIgE-IgE受容体複合体の活性化状態に多大な影響を与えることが明らかになっている。さらに、ヒト生体内ではポリクローナルIgE抗体であるためアレルゲンによるIgE受容体の活性化の調節が複雑であり、多くの部分が不明なままであった。本研究では、我々の異なる親和性アレルゲン及び混合アレルゲン、またハプテン価数の異なるアレルゲン等を用いて、複雑で多様なアレルギー疾患の制御メカニズムを追究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種アレルギー疾患（花粉症など）は、世界的患者数の増加や症状の複雑化・慢性化など社会問題化している。ヒト生体内ポリクローナルIgE抗体環境での個々のIgEの親和性やハプテン価数に起因する複合的刺激条件下でのアレルギー応答については未だ多くが不明なままである。また、親和性やハプテン価数とアレルギー応答の関係についても、十分明らかになっていない。本研究は、異なる親和性やハプテン価数によって誘導されるアレルギー応答を解明するものであり、得られる知見は、アレルギー研究分野にとどまらず、ヒト生体内環境でのリガンド-受容体研究に有意義な情報を提供すると思われる。

研究成果の概要（英文）：Mast cells play crucial roles in the development of allergic diseases. Activation of IgE receptors occurs when allergens cross-link with specific IgE-IgE receptor complex on the mast cell membrane. This activation enhances signaling pathways and leads to the secretion of inflammatory mediators. The affinity between allergen and IgE is known to regulate the cross-linking state of IgE receptor, influencing the secretory response. Thus, understanding the cross-link formation state of IgE receptor is pivotal in determining allergic responses. This study investigates mixed allergens with different affinities and allergens with varying hapten valency, focusing on the IgE-mediated cross-linking state of IgE receptor to elucidate the regulatory mechanism of allergic response.

研究分野：アレルギー・免疫学

キーワード：アレルギー マスト細胞 IgE受容体 アレルゲン 親和性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患(花粉症等)は、世界的患者数の増加や新型コロナワクチン摂取に伴う副反応(アナフィラキシー等)など、アレルギー疾患が重大な問題として注目されている。更に、アレルギー疾患症状(発症部位等)は、多様性に富むため、有効な治療方法の欠如や症状の複雑化・慢性化など、本国における重要な研究課題である。

アレルギー疾患の発症には、マスト細胞が重要な役割を担っており、外来アレルゲンと IgE が結合し、マスト細胞膜上の IgE 受容体を架橋(クラスター形成)すると、各種炎症性メディエータ(ヒスタミン等)が分泌され、アレルギー疾患が惹起される。そのため、アレルゲンとその情報を受容する IgE の相互作用が、アレルギー応答の決定に極めて重要である。また、ヒト生体内の抗体(IgE 等)は、異なる相互作用(親和性)や様々な価数が混在するポリクローナルな状態であり、この様に、個々の IgE とアレルゲンの親和性やハプテン価数に起因する複合的刺激条件下でのアレルギー応答については未だ多くが不明なままである。

2. 研究の目的

ヒト生体環境でのポリクローナル IgE 抗体によるアレルギー応答については、研究手段の欠如から、これまで研究が行われておらず、依然として不明なままであった。我々は独自に作製した親和性の異なるアレルゲンやハプテン価数の異なるアレルゲンを用いて、親和性やハプテン価数の異なる混合アレルゲンを作製し、個々の IgE とアレルゲンの親和性やハプテン価数に起因する複合的刺激条件下でのアレルギー応答を明らかにし、生体内ポリクローナル環境下でのアレルギー応答制御メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

マスト細胞には、骨髄細胞から分化誘導した骨髄由来マスト細胞を用いた。2種類の親和性の異なるアレルゲン(高親和性 DNP: Dinitrophenol、低親和性 2NP: 2-nitrophenol)を作製し、混合アレルゲンには、(高親和性抗原: 低親和性抗原) = (100:0)、(75:25)、(50:50)、(25:75)、(0:100)の比率で混合した5種類を用いた。また、ハプテン(DNP: Dinitrophenol)価数の異なるアレルゲン(DNP1.8 価/HSA、DNP4.7 価/HSA、DNP13.4 価/HSA)を作製し、キャリアタンパク質(HSA)濃度やハプテン濃度(DNP)を揃えた条件下で実験を行った。各種アレルゲンの刺激応答に伴う脱顆粒反応は顆粒内酵素(-hexosaminidase)を指標に用い、炎症性サイトカインは、定量的 PCR や ELISA 法により測定した。また、IgE 受容体の取り込みの解析はフローサイトメータや共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法により観察した。

4. 研究成果

2種類の親和性の異なるアレルゲン(高親和性、低親和性)及び親和性の異なるアレルゲンを異なる比で混合させた混合アレルゲンを用いて、アレルゲン刺激応答に伴うマスト細胞の分泌反応を測定した。その結果、高親和性アレルゲンの割合依存的に脱顆粒反応(ヒスタミン等の即時相の分泌反応)が増加していた。次に、各種炎症性メディエータ(IL-6、IL-13等の遅発相の分泌反応)について、混合アレルゲンで刺激した際の mRNA 発現変化を追究したところ、混合アレルゲンでは、単一親和性アレルゲン(100:0、0:100)の場合と比較し mRNA 発現量が上昇しており、特に混合抗原(50:50)においてその傾向が強く観られた。また、混合アレルゲンを用いてシグナル伝達機構を解析した結果、IgE 受容体の鎖に存在する4つのチロシン残基のリン酸化パターンに違いが観察された。これらのことから、混合アレルゲンによる IgE 受容体の活性状態が、炎症性メディエータの発現調節に関与するのではないかと考えられた。更に、IgE 受容体のクラスター形成、及び細胞内への取り込みについて追究した。その結果、混合アレルゲンにおいて、高親和性アレルゲンの割合が高い場合には大きなクラスターを形成し、低親和性アレルゲンの割合が高い場合には小さなクラスターを形成していた。炎症性メディエータの産生を増強していた混合アレルゲン(50:50)の場合には、クラスターは小さいものの、他のアレルゲンと比較して IgE 受容体の細胞内への取り込みが抑制されている傾向があった。以上の結果から、混合アレルゲンは、IgE 受容体のクラスター形成状態や細胞内への取り込みを調節することによって、シグナル伝達経路の活性化と炎症性メディエータの転写制御などを調節している可能性が示唆された。

次にハプテン価数の異なるアレルゲンを作製し、これらアレルゲンの刺激応答に伴うマスト細胞の活性化状態について追究した。はじめに、キャリアタンパク質濃度を揃えた際の即時相

(ヒスタミン等の分泌反応)の分泌反応について追究したところ、ハプテン価数依存的に誘導されることが分かった。また、炎症性サイトカインの mRNA 発現量及び分泌反応に関して追究したところ、mRNA 発現量はハプテン価数が少ないアレルゲン (DNP4.7 価/HSA) においても、ハプテン価数が多いアレルゲン (DNP13.4 価/HSA) と同程度の発現の上昇がみられた。炎症性メディエータの分泌 (遅発相) に関しては、観察した炎症性メディエータの種類によって、至適のハプテン価数に違いが生じていることも明らかになった。次に、IgE 受容体の内在化 (インターナライズ) の量をフローサイトメータ及び共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、ハプテン価数依存的に大きい IgE 受容体クラスターを形成し、速くインターナライズが誘導されていることが分かった。これらのことから、ハプテン価数の違いが IgE 受容体のクラスター形成及びインターナライズの速度に影響を与え、即時相と遅発相のマスト細胞応答をそれぞれ調節していると考えられた。更に、シグナル伝達機構に及ぼす影響についてウエスタンブロッティング法を用いて追究した。その結果、ハプテン価数が多いアレルゲン (DNP13.4 価/HSA) では、アレルギー応答を抑制するホスファターゼ (SHP2 : Src-homology-2-containing protein tyrosine phosphatase 2) のリン酸化が亢進しており、ハプテン価数の少ないアレルゲン (DNP4.7 価/HSA) で観察された IgE 受容体活性化キナーゼ (Lyn 等) の持続的な活性化が抑制されていた。このことから、ハプテン価数の多いアレルゲンは、IgE 受容体の大きなクラスター形成することで脱顆粒反応 (即時相) の応答を誘導し、それに伴い抑制シグナル分子の活性も誘導することで、一過的に強いマスト細胞の活性化が誘導されている可能性が示唆された。

更に、ハプテン濃度を揃えた条件下で実験を行った。脱顆粒反応はキャリアタンパク質濃度を揃えた時と同様にハプテン価数が多くなるほど有意に上昇していた。しかし、炎症性メディエータの mRNA 発現量を解析したところ、ケモカイン (CCL2 等) はハプテン価数が少ないほど発現量が増加していた。炎症性メディエータの分泌は、サイトカイン (IL-6 等) やケモカイン (CCL2 等) で、ハプテン価数が少ないほど放出が亢進している様子が観察された。また、IgE 受容体のクラスター形成及びインターナライズに関しては、ハプテン価数が多いアレルゲン (DNP13.4 価/HSA) で、大きいクラスターが形成され、急速にインターナライズしている様子が観察された。ところが、ハプテン価数が少ないアレルゲン (DNP1.8 価/HSA) においても、緩やかではあるがインターナライズが亢進している様子が観察された。

親和性の異なるアレルゲンを用いた混合アレルゲンやハプテン価数の異なるアレルゲンを用いた研究から、即時相の反応である脱顆粒反応には、アレルゲンの高い親和性やハプテン価数が多いなど、IgE 受容体の大きなクラスター形成によって制御されている可能性が示唆された。また、サイトカインやケモカインを介した遅発相の炎症反応は、IgE 受容体の小さいクラスター形成条件かにおいても、誘導されている可能性があることが分かった。このことから、アレルギー応答は IgE 受容体のクラスター形成状態によって異なる炎症応答が誘導されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nagata Yuka, Suzuki Ryo	4. 巻 11
2. 論文標題 Fc RI: A Master Regulator of Mast Cell Functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 622 ~ 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11040622	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 Fujisawa Sakura, Nagata Yuka, Suzuki Ryo	4. 巻 382
2. 論文標題 Leukotriene D4 accelerates antigen-mediated mast cell responses via the cysteinyl leukotriene 1 receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104632 ~ 104632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2022.104632	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 Mishima Satomi, Sakamoto Marin, Kioka Hikaru, Nagata Yuka, Suzuki Ryo	4. 巻 13
2. 論文標題 Multifunctional regulation of VAMP3 in exocytic and endocytic pathways of RBL-2H3 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 885868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.885868	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 Sakamoto M, Nagata Y, Furukawa A, Kusada T, Inamoto S, Senda T, Hirashima N, Suzuki R.	4. 巻 8
2. 論文標題 VAMP7 knockdown in secretory granules impairs CCL2 secretion in mast cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.149258.	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 Nagata Y, Sasaki Y, Suzuki R.	4. 巻 46
2. 論文標題 Ephedrine Alkaloid-Independent High-Affinity Immunoglobulin-E Receptor (Fc RI) Internalization Results in CCL2 Production without Inducing Mast Cell Degranulation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 811-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00006	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 Amma C, Inomata Y, Kohno R, Satake M, Furukawa A, Nagata Y, Sugiyama H, Seto T, Suzuki R.	4. 巻 45
2. 論文標題 Copper in airborne fine particulate matter (PM2.5) from urban sites causes the upregulation of pro-inflammatory cytokine IL-8 in human lung epithelial A549 cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environ. Geochem. Health.	6. 最初と最後の頁 5879-5891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10653-023-01599-4.	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 Kohno R, Nagata Y, Ishihara T, Amma C, Inomata Y, Seto T, Suzuki R.	4. 巻 14
2. 論文標題 Benzo[a]pyrene induces NLRP1 expression and promotes prolonged inflammasome signaling in lung epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front. Immunol.,	6. 最初と最後の頁 1154857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1154857.	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19件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 五十嵐杏実、長田夕佳、古川 敦、鈴木 亮
2. 発表標題 好中球由来タンパク質Ly6Gによるアレルギー応答制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉坪眞千、中矢姫菜子、古川 敦、長田夕佳、鈴木 亮
2. 発表標題 親和性の異なる混合アレルギーを用いたIgE受容体活性化調節機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原萌宏、古川 敦、長田夕佳、鈴木 亮
2. 発表標題 大気環境中微粒子による肺胞マクロファージへの毒性発現機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安間千智、長田夕佳、古川 敦、瀬戸章文、鈴木 亮
2. 発表標題 カーボンブラックナノ粒子による肺胞上皮細胞での毒性発現機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Sakura Fujisawa, Ryo Suzuki
2. 発表標題 ロイコトリエン受容体を介したアレルギー応答におけるフィードバック調節機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川 敦、安間千智、長田夕佳、瀬戸章文、鈴木 亮
2. 発表標題 肺胞上皮細胞のカーボンブラックナノ粒子の取り込みおよび毒性発現機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本真凜、長田夕佳、古川 敦、草田智之、稲本奨平、千田知美、平嶋 尚英、鈴木 亮
2. 発表標題 マスト細胞の分泌顆粒の不均質性と 分泌メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 亮
2. 発表標題 マスト細胞と好中球の相互作用によるアレルギー応答制御機構
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石原 萌宏、古川 敦、長田 夕佳、鈴木 亮
2. 発表標題 大気環境中微粒子カーボンブラックによる肺胞マクロファージでの毒性誘導機構
3. 学会等名 フォーラム2023衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本真凜、長田夕佳、古川敦、草田智之、稲本奨平、千田知美、平嶋尚英、鈴木亮
2. 発表標題 マスト細胞における分泌顆粒の不均質性と VAMP7によるCCL2分泌制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第135 回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十嵐杏実、長田夕佳、古川 敦、鈴木 亮
2. 発表標題 好中球蛋白質Ly6Gによるマスト細胞の活性化調節機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本真凜、長田夕佳、古川敦、草田智之、稲本奨平、千田知美、平嶋尚英、鈴木亮
2. 発表標題 マスト細胞のケモカイン分泌におけるVAMP7の機能解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉坪 真千, 長田 夕佳, 古川 敦, 鈴木 亮
2. 発表標題 ハプテン価数の異なるアレルゲンが調節するマスト細胞応答の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川敦, 安間千智, 長田夕佳, 瀬戸章文, 鈴木亮
2. 発表標題 大気汚染物質カーボンブラックナノ粒子の肺胞上皮細胞での毒性発現機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Miyu Kimura, Atsushi Furukawa, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Antigen-IgE affinity is an important factor influencing Fc RI desensitization without mast cell activation
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Risa Kohno, Tomohiro Ishihara, Chisato Amma, Yayoi Inomata, Takafumi Seto and Ryo Suzuki
2. 発表標題 Benzo[a]pyrene induces NLRP1 expression and promotes prolonged inflammasome signaling in lung epithelial cells
3. 学会等名 第30回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 亮
2. 発表標題 IgE受容体ダイナミクスが制御する多様なアレルギー応答
3. 学会等名 第24回日本ヒスタミン学会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 守田 汐里、古川 敦、長田 夕佳、鈴木 亮
2. 発表標題 ケミカルライブラリースクリーニングによるマスト細胞活性制御分子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長田 夕佳、村上 栞、栗田 紗希、田村 真美、古川 敦、鈴木 亮
2. 発表標題 マスト細胞 - 単球相互作用によるマクロファージ分化を介したアレルギー調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
---------	---------