

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860901

研究課題名(和文)皮膚炎症性疾患におけるマスト細胞L型カルシウムチャネルの働き

研究課題名(英文)The role of L type calcium channel on mast cell in inflammatory disease of skin

研究代表者

葉山 惟大 (HAYAMA, Koremasa)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：40647187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトにおけるマスト細胞L型カルシウムチャネルの機能の解析を行った。ヒト培養皮膚マスト細胞上にLTCCが発現していた。健常人、アトピー性皮膚炎患者、慢性蕁麻疹患者の皮膚を抗トリプターゼ抗体と抗LTCC抗体で蛍光二重染色を行った。その結果、何れの検体もマージされた蛍光が確認されなかった。

LTCCの機能を解析するために、培養皮膚マスト細胞を用いて脱顆粒実験を行った。しかしながら1 $\mu$ MのLTCC阻害薬であるニフェジピンは抗FceRI抗体による脱顆粒を阻害しなかった。以上のデータより培養ヒト皮膚マスト細胞にはLTCCが発現しているものの、生体内でのマスト細胞LTCCの機能は明らかにできなかった。

研究成果の概要(英文)：This study analyzed the function of L type calcium channel (LTCC) on human mast cell. LTCC expressed on mast cell which cultured from human skin. Immunofluorescence staining using anti-tryptase ab and anti-LTCC ab was performed to skin of normal subject, patients of atopic dermatitis and patients of chronic spontaneous urticaria. However, there was no significant difference in each group. Function of LTCC was analyzed by studying degranulation of cultured human skin mast cell. Nifedipine, an inhibitor of LTCC, did not affect degranulation of mast cell. Although LTCC express on human skin mast cell, the function of in vivo LTCC on mast cell is not able to make clear.

研究分野：dermatology

キーワード：マスト細胞 L型カルシウムチャネル 蕁麻疹

## 1. 研究開始当初の背景

慢性蕁麻疹は日常診療で最もよくみられる疾患の一つであるにも関わらず、いまだ病因に不明な点が多い。2005年に日本皮膚科学会より蕁麻疹診療ガイドラインが発表され、2011年6月に改訂がなされた(秀道広他、日皮会誌、121:1339-88, 2011)。痒痒とともに突然、限局性浮腫を伴う膨疹として現れ、数時間後には跡形もなく消退する一過性、表在性の限局浮腫を蕁麻疹という。日本ではこのうち症状が4週間以上にわたり再発を繰り返すものを慢性蕁麻疹としている。蕁麻疹の頻度は非常に多く、日本人の5人に1人が生涯に一度は罹患するといわれているが慢性蕁麻疹に移行するのは数%程度である抗原刺激などでマスト細胞が活性化されると脱顆粒や、ロイコトリエンなどの脂質代謝産物、サイトカインの産生が惹起される。これらの炎症性メディエーターにより蕁麻疹が引き起こされる。慢性蕁麻疹は直接マスト細胞を活性化する直接因子と活性化の閾値を下げる背景因子が存在し、これらの因子が複合的に関与して継続的な活性化を誘導していると考えられる。

一部の慢性蕁麻疹患者では高親和性 IgE 受容体(FcεRI)や IgE に対する自己抗体が証明され、自己免疫性蕁麻疹の原因と考えられている。しかしながらこれらの自己抗体は正常人や他の自己免疫疾患にも検出され、その病態生理はいまだ不明な点が多い。ほとんどの患者において原因は不明であり、抗ヒスタミン剤(主として H1 拮抗薬)が第1選択薬となる。しかしながら抗ヒスタミン剤が効きにくい症例も多い。これはマスト細胞に伴い放出される物質はヒスタミン以外の脂質代謝物質、サイトカインなども関与している。

L型カルシウムチャネル(L type calcium channel:以下 LTCC)は神経細胞や筋細胞のような興奮性細胞の主なカルシウムチャネルとして機能しているカルシウムチャネルである。 $\alpha_1$ 、 $\beta$ 、 $\alpha_2$ 、 $\delta$  からなるサブユニットで構成された複数のサブユニット蛋白質複合体からなる。 $\alpha_1$  サブユニットはイオンの通るポアや電位センサー、開閉(gate)装置、 $Ca^{2+}$  拮抗薬分子に対する薬物結合部位をもち、細胞内シグナリング経路の標的でもある。このチャネルはストア非依存性(小胞体)に、細胞膜の脱分極で活性化され、興奮性細胞に特有であると考えられてきた。しかし近年、薬理学的および分子生物学的アプローチによってマスト細胞、T細胞など種々の免疫細胞において、機能的な LTCC または LTCC 様のカルシウムチャネルの存在が明らかにされてきた。マスト細胞における LTCC の役割はいまだ不明な点が多いが、共同研究者の鈴木らは、マスト細胞の抗原刺激によって LTCC のサブタイプの一つである Cav1.2 が細胞膜の脱分極により活性化され、細胞質やミトコンドリアへのカルシウムの流入に関与することを示している(Suzuki et al. J. Leukoc. Biol.

79:508-518; 2006, Suzuki, Y. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1803:372-385; 2010.)。

私は LTCC が金イオンによるマスト細胞の活性化に重要な役割を果たしていることを見出した(Hayama K et al, Free Radic Biol Med. 50: 1417-28)。さらにこの研究では LTCC がマスト細胞のカルシウム流入経路として機能するという更なる証拠を示している。マスト細胞の活性化には細胞内へのカルシウムが必須であり、活性化にも LTCC が関与していると考えられる。実際に LTCC は抗原刺激によるマスト細胞のロイコトリエン産生、サイトカイン産生を正に制御することが報告されている(Yoshimaru T et al, Mol. Immunol. 46:1267-1277; 2009)。また金イオンがマスト細胞の脱顆粒を惹起することから金による接触皮膚炎や金ピアスによる皮膚炎などにマスト細胞が関与していることが示唆される。(図1参照)

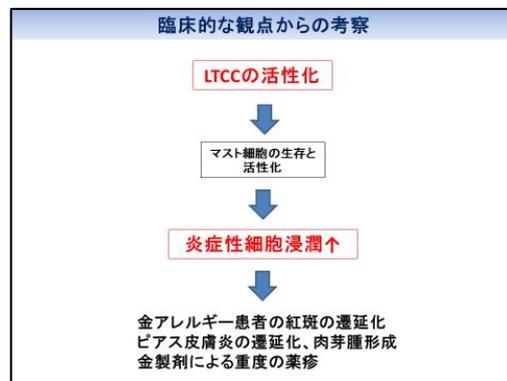


図1

LTCC 阻害剤であるニフェジピンは特発性慢性蕁麻疹に有効であるとの報告がある(Bressler RB et al, J Allergy Clin Immunol. 83(4):756-63; 1989)。この研究は症例数は少ないものの二重盲検、無作為割り付けで行われており、比較的エビデンスレベルが高いとされている。英国の蕁麻疹診療ガイドラインでは蕁麻疹に対するニフェジピンの投与は Quality of evidence II-i, Strength of recommendation C とされている。日本のガイドラインでは記載されていない。

近年、マスト細胞は蕁麻疹以外にも接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、悪性黒色腫皮膚リンパ腫など様々な皮膚疾患に関与することが報告されている。LTCC はマスト細胞のアポトーシスを回避する作用があり(Suzuki Y et al, Mol. Immunol. 46:2370-80; 2009)、これらの疾患で LTCCs の発現が亢進しマスト細胞の生存延長が惹起されている可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

前述のごとくマウスのマスト細胞に LTCC が発現していることは報告されている。本研究ではまず正常人より培養したヒト皮膚マスト細胞に LTCC が発現していることを証明する。また皮膚以外のマスト細胞の LTCC の発現も同時に調べ、蕁麻疹への関与を検討す

る。

マスト細胞の活性化に LTCC が関与しているかをニフェジピンなどの LTCC 特異的阻害薬を用いて、脱顆粒実験などを通じて、脱顆粒への影響やサイトカインの産生への影響を調べる。

また特発性慢性蕁麻疹やアトピー性皮膚炎などマスト細胞の関与する皮膚疾患の患者の皮膚の生検を行い、確定診断を行うとともに皮膚マスト細胞の LTCC の免疫染色を行い、疾患ごとの発現の差や正常人との違いを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究の生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会、臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、委員会の承認を得た。ヒト皮膚由来培養マスト細胞の使用に際して、承認番号 RK-120210-03 として承認を得た。すべての被験者は、ヘルシンキ宣言に従い、インフォームドコンセントを得た。

慢性特発性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎ともに日本皮膚科学会のガイドラインに従い診断した。患者はいずれも日本大学板橋病院皮膚科を受診した患者である。

現在までにマウス培養マスト細胞における LTCC の発現は証明されている。同様にヒトマスト細胞においても LTCC が発現されているかを確認する。まずはヒトマストセルラインである LAD2 を用いて、表面上の LTCC に対する抗体を反応させ、蛍光二次抗体で標識し、フローサイトメトリーで測定する。

皮膚マスト細胞でも同様の実験を行う。皮膚科において悪性腫瘍摘出術後に全層植皮術を行った患者で残余した植皮片を正常皮膚として提供いただき培養皮膚マスト細胞を作製する。具体的にはヒト皮膚組織から細胞を分離し、SCF 存在下にメチルセルロースを用いて約 10 週～12 週培養し培養皮膚マスト細胞を作製した。この培養マスト細胞を用いて LTCC の発現を調べる。

また生体内における皮膚マスト細胞の LTCC の発現を調べる。特発性慢性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎などの皮膚炎症性疾患の患者より提供いただいた皮膚切片を蛍光標識した抗 LTCC 抗体、マスト細胞特異的に発現しているトリプターゼに対する抗体を用いて二重染色を行い蛍光顕微鏡で染色を調べる。上記以外の皮膚マスト細胞が関与していると思われる疾患に関しても同様の実験を行い、LTCC の発現が高い疾患を調べる。

LTCC の機能を調べるため、前述の培養皮膚マスト細胞を用いてニフェジピンなどの LTCC 特異的阻害薬を用いて活性化の阻害実験を行う。活性化の指標としてヒスタミン、やサイトカイン、ロイコトリエンなどを ELISA で測定する。

また健常人、慢性特発性蕁麻疹患者の血液を採取し、好塩基球を分離し、活性化を CD63

の発現を指標に測定する。この実験でもニフェジピンを阻害薬として用いた。

### 4. 研究成果

(1)まずヒトマスト細胞に LTCC が発現しているかを、LTCC の機能ユニットである  $\alpha 2\delta$  サブユニットに対する抗体を用いて調べた。皮膚マスト細胞は皮膚移植術を行った患者の過剰検体より培養した。その結果、フローサイトメトリーでヒト培養皮膚マスト細胞上に LTCC が発現していることが分かった。(図 2)

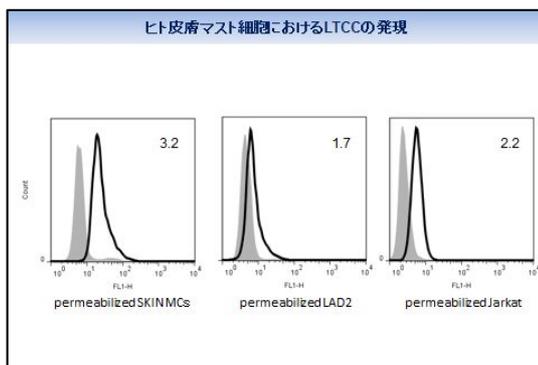
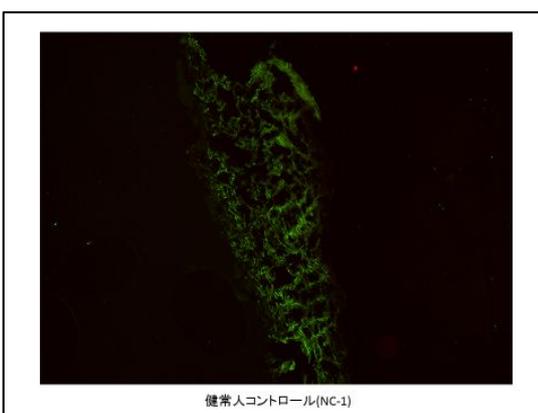


図 2

(2)次に皮膚におけるマスト細胞の LTCC の発現を確認するために健常人(2 例)、アトピー性皮膚炎患者(2 例)、慢性蕁麻疹患者(2 例)の皮膚をマスト細胞に特異的に発現するトリプターゼに対する抗体と前述の  $\alpha 2\delta$  サブユニットに対する抗体で蛍光二重染色を行った。その結果、LTCC に対する蛍光は皮膚の血管に確認されるも、何れの検体もマージされた蛍光(黄色)が確認されなかった(図 3-5)。

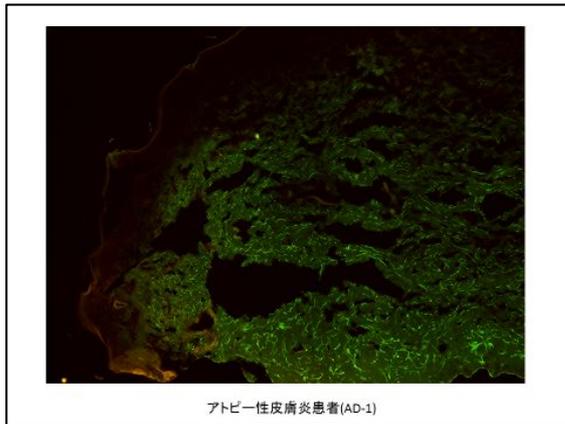
図 3 正常人コントロール



また正常人では多くの検体にトリプターゼの蛍光が見られなかった。この違いは正常皮膚は植皮片から取ったため、菲薄化しており、真皮(特に血管周囲)に存在するマスト細胞を十分に集められなかったものと考えられる。今後、検体の厚さを考慮して再検討したい。



慢性特発性蕁麻疹患者(CU-1)  
図4 慢性特発性蕁麻疹患者



アトピー性皮膚炎患者(AD-1)  
図5 アトピー性皮膚炎患者

(3)ヒト皮膚マスト細胞におけるLTCCの機能を解析するために、培養皮膚マスト細胞を用いて脱顆粒実験を行った。しかしながら1 $\mu$ MのLTCC阻害薬であるニフェジピンは抗FceRI抗体による脱顆粒を阻害しなかった。また塩基球活性化試験を健常人(7例)と慢性蕁麻疹患者(3例)で行った。慢性蕁麻疹患者では健常人と比べると好塩基球の活性化は少なかった(健常人;35.9 $\pm$ 9.74%、慢性蕁麻疹;7.02 $\pm$ 4.77%)がニフェジピン1 $\mu$ Mの添加でも同様のデータ(健常人;37.1 $\pm$ 9.88%、慢性蕁麻疹患者;7.22 $\pm$ 5.00%)であり、有意差は生じなかった。

以上のデータより培養ヒト皮膚マスト細胞にはLTCCが発現しているを確かめることはできたが、生体内でのマスト細胞LTCCの機能は明らかにできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

葉山 惟大, 照井 正; 【皮膚アレルギーの診断と治療】 蕁麻疹. 医学と薬学 72(10): 1667-1673, 2015 査読なし

〔学会発表〕(計1件)

Hayama Koremasa, Izaki Satoshi, Nunomura Satoshi, Fujisawa Daisuke, Hatada Yuko,

Fujita Hideki, Chisei Ra, Okayama Yoshimichi, Terui Tadashi : Usefulness of flow cytometry measurement of reactivity between FcεRIα on gene-transfected CHO cells and its autoantibody in chronic spontaneous urticaria. 23<sup>rd</sup> World Congress of Dermatology (バンクーバー, カナダ) 2015.6

〔図書〕(計3件)

葉山 惟大, 照井 正 : 28. 蕁麻疹診療ガイドライン 今日の治療指針(2016年版)(山口 徹、北原光男監修)、pp2010-2014, 医学書院, 東京, 2016

葉山 惟大, 照井 正 : 27. 蕁麻疹診療ガイドライン 今日の治療指針(2015年版)(山口 徹、北原光男監修)、pp1902-1906, 医学書院, 東京, 2015

葉山 惟大, 照井 正 : 27. 蕁麻疹診療ガイドライン 今日の治療指針(2014年版)(山口 徹、北原光男監修)、pp1916-1920, 医学書院, 東京, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葉山 惟大 (HAYAMA, Koremasa)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号 : 40647187

(2) 研究分担者

なし