

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03369

研究課題名（和文）マスト細胞における分泌顆粒の『不均質性』とアレルギー応答の『多様性』に関する研究

研究課題名（英文）Research on the relationship for heterogeneity of secretory granules with diversity of allergic responses

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：現代日本においてアレルギー疾患は、大きな社会問題になっている。アレルギー疾患は、「多様性」に富んでいるため、対処療法が主な治療手段となっている。本研究は、このようなアレルギー疾患の「多様性」の原因について、アレルギー原因細胞の1つであるマスト細胞の分泌顆粒に存在する「不均質性」に着目し、アレルギー応答調節メカニズムの解析を行った。そして、アレルギー応答は、マスト細胞の不均質な分泌顆粒による個々の顆粒の分泌反応により複雑に調節されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患は、対処療法が中心となっている。その一因として、アレルギー疾患の多様な疾患症状が挙げられる。本研究は、アレルギー疾患の原因細胞あるマスト細胞での分泌顆粒における不均質性に着目し、アレルギー刺激応答に伴う多様な分泌メカニズムについて、分子・細胞・生体レベルで明らかにすることを試みた。そして多様なアレルギー疾患の原因を解明し、新たな治療戦略へ繋げることが可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Allergies are increasing in worldwide. There are many causes of allergy, and symptoms vary from mild to potentially life threatening. Mast cells (MCs) play an important role in allergic diseases. MCs contain many granules comprising various inflammatory mediators. However, the underlying mechanisms of the relationship between distinction of inflammatory mediator secretion in MCs and diversity of allergic reactions are still unknown. We observed the distribution of inflammatory mediators (e.g. TNF, CCL2, or histamine) in the granules and different VAMPs, which is involved in mediator release. We found that each mediator and VAMP was located in different granules. Using VAMPs knockdown MC, we identified specific VAMP for b-hexosaminidase (i.e. histamine) release. Our observations suggested that each single granule contain specific inflammatory mediators. Thus, this may cause the diversity of allergic responses.

研究分野：アレルギー学、免疫学、分子細胞生物学

キーワード：アレルギー マスト細胞 開口放出 分泌顆粒 多様性

### 1. 研究開始当初の背景

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患は、世界的にもその患者数は増加の一途をたどっている。日本においても半数以上の国民が、何らかのアレルギー症状を示すと考えられている。アレルギー疾患は、発症部位、病態、重症度など様々な疾患症状を示し、成長・加齢に伴い症状が変化することも特徴である。この様にアレルギー疾患は、「多様性」に富んでいるため、根治療法が存在せず対処療法にとどまっているのが現状である。

アレルギー疾患の原因細胞の一つであるマスト細胞は、各組織で性質の異なる組織特異的マスト細胞へ分化し、分化後も性質が変化する「可塑性」を有することも明らかになっている。このような性質を有するマスト細胞が全身の様々な組織に分布し、アレルギー疾患の「多様性」に関与していることが示唆されている。

アレルギー疾患の発症には、マスト細胞から分泌される様々な炎症性メディエータが重要な役割を果たしており、アレルゲンがアレルゲン特異的 IgE を介して IgE 受容体を活性化すると、シグナル経路の活性化と炎症性メディエータの分泌反応が誘導され、アレルギー疾患が惹起される(図1)。

我々は、マスト細胞によるアレルゲン情報の認識メカニズムを追究する過程で、アレルゲンと IgE の親和性が、IgE 受容体の活性化状態をはじめ、親和性依存的シグナル伝達経路の活性化を誘導することを明らかにした。さらに、アレルゲン親和性は分泌するサイトカインやケモカインの種類を厳密に制御し、炎症組織に浸潤する炎症細胞の種類にまで影響を及ぼすことによって、アレルギー応答の「多様性」に大きく関与していることを明らかにした。また、マスト細胞に含まれる個々の分泌顆粒には、異なる含有メディエータや分泌機能蛋白質が局在しているなど、「不均質性」が存在していることも明らかになっている。そこで本研究では、マスト細胞の分泌顆粒に存在する顆粒の「不均質性」に着目し、アレルギー応答の「多様性」の制御機構を明らかにすることを試みた。



ヒスタミン/サイトカインなど

図1 マスト細胞の活性化とアレルギー疾患

### 2. 研究の目的

分泌反応は、免疫、神経、内分泌細胞など様々な生命機能を担っている。本研究で着目するアレルギー応答では、様々な炎症性メディエータを含む分泌顆粒を持つマスト細胞が、外来刺激情報を受容し、炎症性メディエータの分泌や浸潤細胞によってアレルギー疾患症状を決定していると考えられている。本研究は、ヒスタミン、サイトカイン、ケモカインをはじめとする様々な炎症性メディエータを含む個々の分泌顆粒の分泌において「不均質性」を有するマスト細胞の分泌メカニズムについて、単一分子・生細胞・生体内マスト細胞の研究を通して明らかにし、さらに様々なアレルギー疾患(急性・慢性疾患)モデルについて解析し、アレルギー応答の「多様性」の分子機構を解明するものである。

### 3. 研究の方法

マスト細胞によるアレルギー制御機構について、シグナル伝達、分泌反応、アレルギー疾患モデルなど、独自の研究システムを駆使して追究した。

#### (1) 細胞の調整方法

骨髓由来マスト細胞はマウス大腿骨から骨髓細胞を採取し Interleukin-3、stem cell factor の存在下で1ヶ月間培養しマスト細胞に分化させた。好中球は骨髓細胞を密度勾配遠心分画法により単離・精製した。骨髓由来マスト細胞や骨髓好中球の確認には、フローサイトメータ (FACSVerse) を用い、マーカー蛋白質の発現解析により行った。遺伝子改変細胞の作成には、shRNA を用いた。

#### (2) シグナル伝達機構の解析

リン酸化の解析には、Phos-tag 法またはウエスタンブロッティング法を用いた。また、各種サイトカイン・ケモカインの解析には、定量的 PCR や ELISA 法を用いた。

#### (3) 分泌顆粒の開口放出メカニズムの解析

単一分泌顆粒レベルでの分泌メカニズムの解析には、骨髓由来マスト細胞及びマウス耳介組織を用いた。骨髓由来マスト細胞及びマウス耳介組織での蛋白質の局在解析には、免疫染色法を用いた。また、ホールマウント法を用いた三次元組織イメージング解析では血管をはじめとして目的蛋白質を特異的抗体により染色した。全てのサンプルの解析には共焦点レーザ顕微鏡 (Carl Zeiss LSM-710) を用い、画像解析法を用いて検出・解析した。

#### (4) アレルギー疾患モデルの解析

アレルギー疾患モデルとして、受動的局所性 (PCA) 及び全身性 (PSA) アナフィラキシーマウスモデルを作製し実験に用いた。アレルギー応答の評価には、Evans Blue による血管透過性、直腸体温測定、各組織でのマスト細胞の形態学的変化の観察を行った。

#### 4. 研究成果

アレルギー疾患は、発症部位、病態、重症度など様々な疾患症状を示す上に、症状が変化することも特徴である。このように「多様性」に富むアレルギー疾患の要因として、外来刺激(アレルゲン)情報によるマスト細胞応答の違いが重要な役割を担っている。これまでの研究成果から、マスト細胞の分泌顆粒には「不均質性」が存在し、アレルギー応答の「多様性」を制御していることが示唆されており、本研究では、マスト細胞の分泌顆粒の顆粒内炎症性メディエータ(ヒスタミン、サイトカイン TNF、ケモカイン CCL2 等)の分泌反応とアレルギー応答調節機構について追究した。各炎症性メディエータは異なる分泌顆粒に局在し、分泌顆粒のサイズ(TNF 陽性 > CCL2 陽性 > Histamine 陽性)は有意に異なっていた。また、分泌顆粒膜上に発現する SNAREs の一種である Vesicle-associated membrane proteins (VAMPs) の局在解析の結果から、VAMP3 と VAMP7 は異なる分泌顆粒に局在しており、各 VAMP を発現する分泌顆粒のサイズ(VAMP3 陽性 > VAMP7 陽性)も有意に異なっていた。さらに、マスト細胞の分泌顆粒の「不均質性」をさらに追究するため、分泌顆粒に存在する各種分泌制御タンパク質 VAMPs について分泌顆粒の密度勾配遠心法による単離と分画を行なった。その結果、各種 SNARE タンパク質は顆粒分画によって、発現パターンに違いがあることが明らかになった。この様な、マスト細胞の分泌顆粒での VAMP サブファミリーの局在の違いは、マウス耳介組織のマスト細胞においても異なっており、生体内マスト細胞においても分泌顆粒の「不均質性」の存在が明らかになった。

次に、各炎症性メディエータおよび分泌顆粒膜 VAMPs の共局在解析の結果から、VAMP3 は TNF、VAMP7 は CCL2 と同一の顆粒に存在する傾向が観察されたが、Histamine については、これらの VAMPs と共局在する様子は観察されなかった。このことから、Histamine の分泌には異なる VAMP のサブファミリーが関与していることが示唆された。さらに、分泌顆粒に発現している VAMP3、VAMP7 および VAMP8 に対して、shRNA を用いて発現抑制(KD: knockdown)マスト細胞の樹立を行い、その確立に成功した。これら樹立した細胞を用いた分泌実験から、VAMP8 KD マスト細胞では、脱顆粒反応(Histamine)が有意に抑制されていた。この様な抑制は、VAMP3 KD および VAMP7 KD マスト細胞では観察されなかった。さらに、脱顆粒反応には他の SNARE タンパク質である SNAP23 (synaptosome associated protein 23) も寄与することも明らかになった。

さらに、親和性の異なるアレルゲンを用いて刺激応答に伴う分泌機能蛋白質(VAMPs)サブファミリーの活性化(リン酸化)状態を解析したところ、VAMP サブファミリー間で刺激の種類によって異なるリン酸化状態が誘導されていることも明らかになった。これらの結果から、マスト細胞の分泌顆粒の炎症性メディエータ(ヒスタミン、サイトカイン、ケモカイン等)や発現する分泌機能蛋白質 SNAREs (VAMPs、SNAPs 等)は、個々の分泌顆粒において異なっており、特異的な組み合わせが存在しており、不均質な分泌顆粒が、アレルゲンの情報(親和性等)によって単一顆粒レベルで分泌反応が制御されている可能性が示唆された。

また、分泌機能蛋白質蛋白質 SNARE (VAMP3)のマスト細胞の分泌制御機構を解析する過程で、VAMP3 が TNF の分泌を調節していることが明らかになった。ところが、VAMP3 KD マスト細胞では、炎症性サイトカインである IL-6 転写を増強していることが分かった。そこで、VAMP3 によるマスト細胞の機能調節メカニズムを追究した。その結果、VAMP3 はマスト細胞の分泌顆粒-細胞膜の膜融合だけでなく、細胞膜のリサイクリング(エンドサイトーシス)にも寄与していることが明らかになった。さらに、マスト細胞のアレルゲン認識に重要な IgE 受容体の細胞膜発現量やシグナル伝達の間として重要な脂質ラフトなど、VAMP3 がマスト細胞の IgE 受容体環境を調節し、アレルゲン刺激による活性化シグナルを増強し、IL-6 の転写を亢進している可能性が示唆された(図2)。さらに、画像解析から TNF と IL-6 は、別々の分泌顆粒に存在しており、アレルゲン刺激によって個々の分泌顆粒レベルで分泌反応が制御されていることも明らかになった。

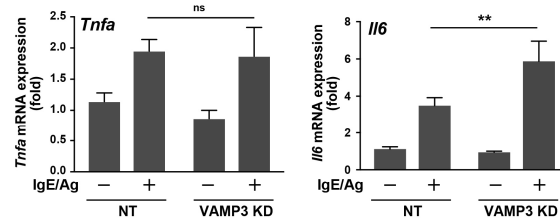


図2 VAMP3 による炎症性メディエータ発現調節

次に、アレルギー疾患モデルを用いた解析を行った。本研究では、アレルギー疾患モデルとして急性(アナフィラキシー等)や慢性(アトピー等)疾患モデルを用いた。これらの異なるアレルギー疾患モデルを用いて疾患の応答性(感作、発症)変化を解析したところ、アナフィラキシーモデルマウスについては、加齢に伴い週齢依存的に疾患症状が悪化するのに対して、アトピー疾患モデルの場合には、若年マウスの方がより疾患症状が悪化する傾向が観られた。この様に、加齢に伴いアレルギー疾患の種類によって感作状態や疾患発症が異なるなど、多様なアレルギー応答の一端が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuka Nagata, Hirokazu Ando, Yohei Sasaki, Ryo Suzuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Ephedra herb, Mao, inhibits antigen-induced mast cell degranulation by induction of the affinity receptor for IgE internalization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Res	6. 最初と最後の頁 569-581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-021-03020-0	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 -

1. 著者名 長田夕佳、安藤広和、佐々木陽平、鈴木 亮	4. 巻 40
2. 論文標題 漢方生薬「麻黄」によるIgE/IgE受容体を介したアレルギー応答制御の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 74-77
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 Suzuki R, Inoh Y, Yokawa S, Suzuki R, Furuno T, Hirashima N	4. 巻 49
2. 論文標題 Monomer hapten and hapten-specific IgG inhibit mast cell activation evoked by multivalent hapten with different mechanisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Immunol	6. 最初と最後の頁 2172-2183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/eji.201847973.	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 -

1. 著者名 鈴木 亮	4. 巻 39
2. 論文標題 アレルギー応答の『多様性』メカニズムに関する基礎研究的アプローチ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 57-61
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 Nagata Y, Suzuki R	4. 巻 30
2. 論文標題 Fc RI cluster size determines effective mast cell desensitization without effector responses in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Arch Allergy Immunol	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520132	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, Suzuki R	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
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 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yuka Nagata, Hirokazu Ando, Yohei Sasaki, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Ephedra Herb, Mao, Inhibits Antigen-Induced Mast Cell Degranulation by the Induction of the Affinity Receptor for IgE Internalization
3. 学会等名 2021 AAAAI Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Hirokazu Ando, Yohei Sasaki, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Ephedra herb, Mao, inhibits allergen-induced mast cell degranulation by inducing IgE-Fc RI internalization
3. 学会等名 第69回日本アレルギー学会学術大会・世界アレルギー機構合同カンファレンス (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 亮
2. 発表標題 IgE受容体研究から考える多様なアレルギー応答調節メカニズム
3. 学会等名 第24回愛知免疫アレルギーを語る会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田隼佑, 橋本侑昇, 川合皓征, 平嶋尚英, 鈴木 亮
2. 発表標題 アレルギー疾患モデルを用いた加齢におけるアレルギー応答調節メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Marin Sakamoto, Tomoyuki Kusada, Shohei Inamoto, Tomomi Senda, Naohide Hirashima, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Heterogeneity of secretory granules in mast cells.
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Komomo Ito, Sari Mizohata, Naohide Hirashima, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Mast cell-neutrophil communication dampens allergic diseases.
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古澤 遥, 平嶋尚英, 鈴木 亮
2. 発表標題 マスト細胞と好中球の相互作用に寄与する機能分子の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本 真凜, 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が有する不均質性の研究
3. 学会等名 日本薬学会 第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 萌里, 平嶋 尚英, 鈴木 亮
2. 発表標題 マスト細胞と好中球の相互作用を介したアレルギー反応調節機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Successful IgE Receptor Desensitization on Mast Cells using Heated and Digested Allergen.
3. 学会等名 2020 AAAAI Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤胡桃, 溝端沙莉, 平嶋尚英, 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の研究
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Suzuki
2. 発表標題 The Mast Cell: A Multi-functional Master Regulator
3. 学会等名 2019 Fall International Convention of PSK (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アレルギー抑制剤及び脱顆粒抑制剤	発明者 鈴木亮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-060117	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	平嶋 尚英  (Hirashima Naohide)  (10192296)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授   (23903)	人工膜リポソームを用いた解析

#### 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
---------	---------