

令和元年5月7日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05082

研究課題名(和文) アレルゲン親和性によるIgE受容体動的多様性とシグナルエディティングの分子基盤

研究課題名(英文) The allergen affinity-based molecular editing of the high-affinity receptor for IgE on 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) 13,700,000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。国民の半数近くが何らかのアレルギー症状を示すと考えられており、その割合は増加の一途をたどっている。本研究は、このようなアレルギー疾患の原因について、アレルゲンとIgEの親和性に着目しマスト細胞の活性化調節機構や細胞間相互作用を介したアレルギー応答調節メカニズムの解析を通して明らかにすることを試みた。そしてアレルゲン親和性による、開口放出、転写制御、細胞間相互作用などに関して新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患は、国民の半数近くが何らかのアレルギー症状を示すと考えられているにもかかわらず、根治療法が存在しないため、未だ対処療法に留まっているのが現状であり、大きな社会問題になっている。本研究は、アレルゲンとIgEの親和性に着目することによって、アレルギー疾患に重要な役割を担うマスト細胞の活性化メカニズムやアレルギー応答調節機構について分子・細胞・生体レベルで明らかにすることを試みた。そしてアレルギー疾患発症におけるアレルゲン親和性の意義を明らかにすることによって、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)：Mast cells (MCs) initiate allergic reactions. These cells express an antigen-specific IgE-bound high-affinity receptor for IgE (Fc RI) that binds to IgE. The interaction of an allergen with IgE-Fc RI is an essential step in MCs activation as well as subsequent allergic responses. It has long been recognized that antigens bind to IgE antibodies with variable affinities. When allergen binds to IgE with different affinities, a wide range of allergic responses is triggered. Here we unravel how a difference in the affinity of antigen regulates intracellular signaling pathways and intercellular communication with other immune cells. The mechanisms of allergen affinities on allergic responses is the important factor to develop new therapeutic tools with increased efficacy.

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：マスト細胞 アレルゲン 親和性 IgE アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。国民の半数近くが何らかのアレルギー症状を示すと考えられており、その割合は増加の一途をたどっている。これらアレルギー疾患には、マスト細胞が中心的な役割を担っており、その細胞内には様々な炎症性メディエータ(ヒスタミンなど)を含む分泌顆粒を数多く持っている。マスト細胞膜上の IgE 受容体 (Fc RI) には、抗原特異的 IgE が結合し、そこにアレルギーが結合することによって IgE 受容体が架橋(クラスター形成)されるとマスト細胞が活性化され、その結果、分泌反応が促進し様々なアレルギー反応が惹起される。

細胞は細胞外環境の変化を受容し、細胞内シグナリングプロセスを経て、多岐にわたる外来環境の変化に応じた細胞応答を行っている。このように細胞外情報を細胞内に伝達するためには、受容体が重要な役割を担っている。アレルギー疾患の発症に關与するマスト細胞では、細胞外アレルギー情報を受容・認識する過程、すなわちアレルギー、抗原特異的 IgE、そして IgE 受容体 (Fc RI) の3者の関係が、マスト細胞の活性化状態やアレルギー炎症の発症に重要なインパクトをもたらすことが示唆されている。

そのため我々は、先述した3者の関係を制御する因子として、アレルギーと抗原特異的 IgE のアフィニティー(親和性)という物理特性が、IgE 受容体クラスターの活性化状態(数、サイズ、動態)を制御し、親和性特異的な細胞内シグナルを調節を行うことによって、疾患症状の決定に多大な影響を及ぼしていると考えた。

2. 研究の目的

アレルギー疾患は、患者数が多いにもかかわらず根治療法が存在しないため、大きな社会問題になっている。アレルギー疾患の発症に重要な役割を担うマスト細胞は、その細胞内に炎症性メディエータを含む分泌顆粒が数多く含まれ、アレルギーによってマスト細胞が活性化されると、細胞内顆粒の分泌反応が促進されアレルギー反応が惹起される。これまでの我々の研究成果から、アレルギー、アレルギー特異的 IgE、そして IgE 受容体の3者の関係が、マスト細胞活性化状態やアレルギー炎症症状に重大な影響を与えていることが明らかになっている(図1)。

そのため本研究では、アレルギーとアレルギー特異的 IgE の親和性に着目することによって、アレルギー親和性がどのように IgE 受容体の活性化を制御し、細胞内シグナル伝達や分泌反応、そしてアレルギー反応が調節されているのか、また分泌反応によって浸潤する他の免疫細胞とマスト細胞との相互作用によってアレルギー応答が影響をうけているのかなど、アレルギーと IgE の親和性に起因するマスト細胞の活性化やアレルギー応答の調節に関するメカニズムを分子・細胞・生体レベルで明らかにすることを目的とした。



図1 アレルギーによるマスト細胞の活性化と分泌反応

3. 研究の方法

アレルギー親和性による IgE 受容体を介したマスト細胞のシグナル伝達機構やアレルギー応答制御メカニズムに関して、独自の親和性アレルギー、*in vitro* 共存培養システム、顕微光学技術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。

(2) シグナル伝達機構の解析

アレルギー親和性による転写調節機構の解析では、RS-ATL8 細胞による IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) 法を用いた。本細胞が有する転写調節因子である NFAT の活性化レベルをルシフェラーゼを用いて定量することによって、転写因子によるアレルギー親和性の感受性に関してその分子メカニズムを解析した。

(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。マスト細胞はパラホルムアルデヒドで固定後、標的蛋白質に対する特異的抗体を用いて染色した。また、マウス耳介組織は固定後包埋し凍結ミクロトームを用いて凍結切片を作製しスライドガラスに固定し染色を行った。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ー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM-710、LSM-800) を用い、画像解析法を用いて検出・解析した。

(4) 細胞間相互作用によるアレルギー応答制御機構の解析

骨髓由来マスト細胞と骨髓から単離培養した好中球を共存培養し実験に用いた。共存培養した骨髓由来マスト細胞を抗 DNP (Dinitrophenyl) -IgE 抗体で感作し、抗原 (DNP-HSA) で特異的に刺激し、マスト細胞の特異的刺激性応答に伴う細胞間相互作用を追究した。解析には、共焦点レーザー顕微鏡、走査型 (HITACHI、S-4300) 及び透過型電子顕微鏡 (HITACHI、H-7600)、フローサイトメータを用いた。

4. 研究成果

本研究は、アレルゲン親和性によるマスト細胞におけるシグナル伝達の調節制御機構を明らかにし、多様なアレルギー応答の実体を解明しようとするものである。

はじめにRS-ATL8細胞を用いて、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) 法を用いたアレルゲン親和性による転写調節機構の解析を行った。様々な条件検討の結果、十分なシグナル検出に成功し、転写因子 (NFAT) の活性化におけるアレルゲン濃度及び親和性の関係とその分子メカニズムの一端について明らかにした。我々の研究からNFATの活性化状態は、低親和性アレルゲンの場合においても、高親和性アレルゲンと比較して高い状態を維持していた。アレルゲンの親和性の違いにより、NFATは異なるスレッショールド (閾値) で活性化していることが明らかになった。

また、アレルゲン親和性が分泌するサイトカイン (高親和性アレルゲン) やケモカイン (低親和性アレルゲン) の種類を厳密に制御していることが明らかになっている。このことから、外来アレルゲン情報によって複雑な分泌反応が誘導されており、その結果として多様なアレルギー反応が惹起されている可能性が示唆された。これら多様な分泌反応の一因として、個々の分泌顆粒に含まれるケミカルメディエータに違いが生じているのではないかと考えた。そこで TNF や CCL2

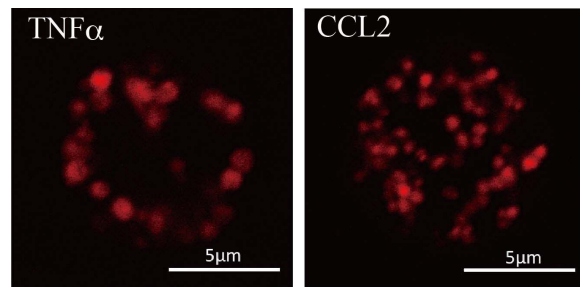


図2 マスト細胞における分泌顆粒の不均質性

と各種蛍光蛋白質のキメラ蛋白質や特異的抗体を用いた免疫染色法による画像解析を行った結果、TNF と CCL2 は細胞内で異なる分泌顆粒に存在している様子が観察された (図2)。また、TNF を含む分泌顆粒は、CCL2 が含まれる分泌顆粒と比較して、顆粒サイズが有意に大きいことが明らかになった。さらに、マスト細胞の開口放出に関与すると考えられている分泌機能蛋白質 SNARE の一種である VAMP (Vesicle Associated Membrane Protein) の異なるサブタイプについて、個々の分泌顆粒における VAMP の局在解析を行った。その結果、TNF や CCL2 を含む分泌顆粒では、それぞれ異なるサブタイプの VAMP と共存していることが明らかになった。次に、生体組織内に存在するマスト細胞においても、先に観察されたような個々の分泌顆粒で異なる分泌機能蛋白質が局在しているかどうかについてマウス耳介組織の 3 次元組織イメージング解析を行ったところ、生体組織内におけるマスト細胞においても、*in vitro* 研究で観察されたような分泌機能蛋白質の局在が異なっている様子が観察された。本研究による初代培養マスト細胞やマウス皮膚組織を用いたマスト細胞に存在する分泌顆粒の解析から、マスト細胞の分泌顆粒は単一顆粒レベルで、個々の分泌顆粒が含有するケミカルメディエータや分泌機能タンパク質には違いが存在していることが *in vitro* や *in vivo* の解析から明らかになった。

我々のこれまでの研究から、アレルゲン親和性に特異的な浸潤細胞がアレルギー疾患の病態を制御していることが明らかになった。特に、高親和性アレルゲンの場合には好中球が有意にアレルギー炎症部位に浸潤してマスト細胞と相互作用しており、両者の相互作用がアレルギー応答を制御している可能性が示唆された。ここでは、マスト細胞と好中球との相互作用を追究するため、マスト細胞と好中球を用いた *in vitro* 共存培養システムを確立し、両者の相互作用によるアレルギー応答制御機構の解析を行った。まず共存培養したマスト細胞と好中球について、アレルギー反応に伴う両者の相互作用を追究した。マスト細胞をアレルゲンで特異的に刺激すると、マスト細胞で脱顆粒反応 (ケミカルメディエータの開口放出) が誘導され、それに伴う形質膜の波打現象 (ラフリング) が観察された。その後、好中球が脱顆粒しているマスト細胞と相互作用している様子が観察された。次に、両細胞間での細胞間シグナル伝達機構の解析を行った。細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、マスト細胞において脱顆粒反応による各種メディエータ放出に関与し、好中球においては細胞の遊走に重要な役割を担っていることが知られている。そこで、マスト細胞と好中球の細胞内カルシウムイオン動態に着目し、両細胞間の情報伝達機構を追究した。アレルゲンでマスト細胞を特異的に刺激すると、はじめにマスト細胞でカルシウムイオン濃度が上昇し、その後、好中球がマスト細胞の方向に向かって遊走し、マスト細胞に接着する様子が観察された。そして、マスト細胞と接着した好中球において一過的に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇している様子が観察された。このことから、マスト細胞と好中球が相互作用 (接着) した結果、好中球で一過的な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が誘導されている可能性が示唆された。現時点では、これら相互作用に伴うカルシウムイオン動態変化に関する分子メカニズムや生理的役割については明らかになっていないが、今後の研究の進展により明らかになっていくものと期待される。さらに、両者の接着部位の接着形態についての詳細な解析を行っ

た。その結果、走査型電子顕微鏡を用いて接着形態を観察したところ、紡錘形をした好中球とマスト細胞が密接に接着している様子が観察された。また、透過型電子顕微鏡を用いた解析では、好中球がマスト細胞から分泌された顆粒内物質を貪食しているような形態変化が観察された。本研究成果についても今後動物モデルを用いた解析によって詳細な分子メカニズムを始め生理的意義についても明らかになるものと期待される。

以上の結果から、本研究の遂行によって明らかになった転写因子のアレルゲン親和性感受性、マスト細胞の分泌顆粒の不均質性、アレルゲン親和性によって誘導される浸潤細胞とマスト細胞との細胞間相互作用などの研究成果は、アレルギー反応の実体を明らかにする上で重要な情報を提供するものであり、多様なアレルギー疾患への治療戦略を構築する上でその一助となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Inoue Y., Hasegawa S., Miyachi K., Yamada T., Nakata S., Ipponjima S., Hibi T., Nemoto T., Tanaka M., Suzuki R., Hirashima N., Development of 3D imaging technique of reconstructed human epidermis with immortalized human epidermal cell line., *Exp. Dermatol.*, 27:563-570. (2018), 査読有, DOI:10.1111/exd.13672

Suzuki R., The emerging picture of mast cell activation: The complex regulatory network of high-affinity receptor for immunoglobulin E signaling., *Biol. Pharm. Bull.*, 40:1828-1832 (2017) 査読有, DOI:10.1248/bpb.b17-00465

Yokawa S., Suzuki T., Inouye S., Inoh Y., Suzuki R., Kanamori T., Furuno T., Hirashima N., Visualization of glucagon secretion from pancreatic cells by bioluminescence video microscopy: identification of secretion sites in the intercellular contact regions., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 485:725-730 (2017) 査読有, DOI:10.1016/j.bbrc.2017.02.114

Yokawa S., Furuno T., Suzuki T., Inoh Y., Suzuki R., Hirashima N., Effect of cell adhesion molecule 1 expression on intracellular granule movement in pancreatic cells., *Cell Biochem. Biophys.*, 74:391-398 (2016) 査読有, DOI:10.1007/s12013-016-0737-6

〔学会発表〕(計15件)

鈴木 亮、注目されている免疫細胞・メディエーター「マスト細胞」、第5回総合アレルギー講習会、2018年

草田智之、抗原親和性が制御するマスト細胞の炎症性メディエータ選択的分泌機構の解析、日本薬学会第138年会、2018年

鈴木瑠理子、IgGとハプテンによる活性化マスト細胞の抑制機構の研究、日本薬学会第138年会、2018年

服部幸希、マスト細胞の分泌顆粒に局在するCaチャンネルOrai-2による細胞内Ca²⁺濃度制御、日本薬学会第138年会、2018年

横川 慧、発光イメージング法を用いたグルカゴン分泌の可視化解析系の構築、日本薬学会第138年会、2018年

井上 悠、ミトコンドリアの融合と分裂が表皮幹細胞の増殖と分化に及ぼす影響の解析、日本薬学会第138年会、2018年

草田智之、マスト細胞における分泌顆粒内炎症性メディエータの不均質性に関する研究、第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2017年

井上 悠、三次元培養表皮の3Dライブイメージング技術の開発、日本薬学会第137年会、2017年

真野安由美、GUV liposome と細胞の集合体形成における分子間相互作用と接着形態の解析、日本薬学会第137年会、2017年

木村友香、蛍光ビーズを用いたメラノサイトとケラチノサイトにおけるメラノソームの挙動解析、日本薬学会第137年会、2017年

横川 慧、細胞接着を介した隣細胞のグルカゴン分泌調節機構の解明、第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016年

真野安由美、GUV liposome 集合体でのGUV間相互作用と接着形態の解析、第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016年

溝端沙莉、In vitro 共存培養系によるマスト細胞と好中球の相互作用の追究、第39回日本分子生物学会年会、2016年

鈴木 亮、分泌顆粒局在型Ca²⁺チャンネルOrai-2によるアレルギー制御機構、第39回日本分子生物学会年会、2016年

稲本奨平、マスト細胞分泌顆粒における炎症性メディエータ不均質性の研究第25回バイオイメージング学会、2016年

〔図書〕(計1件)

鈴木 亮、IgE 受容体による多彩な抗原認識とアレルギー応答制御機構、アレルギー・免疫、277, 32-39 (2016) 査読無

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~eisei/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平嶋 尚英

ローマ字氏名：(HIRASHIMA, Naohide)

研究協力者氏名：中村 亮介

ローマ字氏名：(NAKAMURA, Ryosuke)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。