

令和元年6月17日現在

機関番号：12605

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06669

研究課題名（和文）相対的低酸素環境に基づく新たなアレルギー病態の解析

研究課題名（英文）Novel pathogenesis of allergic disorders based on relative hypoxic stress

研究代表者

松田 研史郎（Kenshiro, Matsuda）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・産学官連携研究員

研究者番号：70642619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：TRPA1、TRPM3、TRPM7チャンネルがマスト細胞に顕著に発現しており、相対的低酸素刺激に対する特異的な感受性が認められた。特にTRPA1チャンネル応答がマスト細胞の脱顆粒を誘導し、ヒスタミンやトリプターゼを放出することで直腸温度の低下や血管透過性の上昇などのアナフィラキシー症状を誘発した。60%以上、16時間以上からの相対的低酸素刺激によって病態は発現し、重症度は、酸素濃度及び高酸素曝露時間依存的に増加した。他方、TRPA1遺伝子欠損マウスやマスト細胞欠損マウスでは、病態の抑制が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相対的低酸素環境下におけるマスト細胞などの各種免疫細胞の酸素センシングを担うと考えられるTRPチャンネルの機能を分子解析することで、酸素起因性アレルギーの新たな病態を明らかにし、医療及び獣医療において社会的問題化しているアレルギー疾患の新規視点に基づく治療法開発の基礎的知見の獲得を目指した。すなわち、生体が曝露される大気中酸素濃度の変化、即ち相対的低酸素環境が末梢組織に存在する様々な細胞群を活性化させ、それによって生じるあるいは修飾されるアレルギー病態の解明に繋がり、酸素起因性疾患を新たに定義することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：Transient Receptor Potentially (TRP) Ankyrin 1, Melastatin 3 and 7 were expressed in the mast cells including bone marrow cultured mast cells (BMCMC), and skin mast cells. Especially, TRPA1 response in the mast cells clearly induced the release of α -hexosaminidase, mMCP-6, and histamine. Systemic anaphylactic phenotypes such as reduced rectal temperature, and increased vascular permeability were then indicated after relative hypoxia stress in adult C57BL/6J mice. However, each phenotypes was significantly inhibited in mast cell deficient mice and TRPA1 knockout mice. These findings introduce a potential role of oxygen in inducing mast cell-dependent systemic anaphylaxis.

研究分野：動物生命科学

キーワード：アレルギー 相対的低酸素 TRPチャンネル アナフィラキシー

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

1. 研究開始当初の背景

アレルギー反応は、各種 T 細胞やマスト細胞、B 細胞などの免疫担当細胞が関与するが、特にマスト細胞の活性化はアレルゲン刺激によりヒスタミンや tryptase など種々のケミカルメディエーターを遊離することで Ⅰ型アレルギー反応相やアナフィラキシー、血管新生、細胞外マトリックスのリモデリングなどを亢進させる。他方、これらの細胞が生体内において転写レベルで低酸素誘導因子 (HIF-1 α) などの酸素依存的転写因子の発現を亢進させていることから、酸素濃度の変化がアレルギー反応を誘発する 1 つのファクターであると考えられるが、その役割は十分に解析されていない (*J. Immunol.* 181:1665-1672, 2008)。

アレルギー疾患の中で、最も重篤な症状を示すのが、アトピー性皮膚炎 (AD) とアナフィラキシーと考えられるが、その発症起点および増悪化機構については未だ十分解明されていない。この点で東京農工大学の研究グループによって発見・研究されてきた、AD 自然発症モデルマウスは極めて有用である。申請者も研究グループの一人として研究に参加してきたが、その中で中枢および末梢神経が大きく関与する痒みの発生機構について基礎的研究を開始した。特に、AD の痒み (atopic itch) は複雑な因子によって発症すると考えられており、最近では蛋白質分解酵素 (セリンプロテアーゼ)、サイトカイン (Thymic stromal lymphopoietin: TSLP や Interleukin-31: IL-31 など)、神経伝達物質 (ヒスタミン、セロトニン、神経成長因子: NGF など) が痒みの発生に関わっていることが報告されている。また、atopic itch は体が温まると悪化したり、冷感を与えると改善したりすることも知られている。つまり AD では、温度変化を察知する神経と痒みが何らかの関係を持っており、これによって修飾を受けると考えられる。他方、申請者は、未熟児網膜症の基本病態が異常血管新生によって惹起されることから、血管新生因子を産生放出するマスト細胞が本疾患発症に関与するのではとの独創的な発想するに至った。この仮説のもとに末梢微小環境の相対的低酸素状態がマスト細胞を活性化させることに気づいた (*J. Clin. Invest.* 2017 年)。本発見によって、前者の温度センシングと後者の酸素センシングを考慮して、温度チャネルである transient receptor potential (TRP) が有力なセンシング分子候補と推論した。予備的試験の結果、マスト細胞には TRP チャネルが発現しており、マスト細胞活性化阻害剤の前処置により相対的低酸素による活性化を抑制することが判明した。さらに、TRPA1 ノックアウトマウス由来マスト細胞が相対的低酸素低感受性であることを実証した。

このような学術的背景と申請者の研究実績を基盤に、**相対的低酸素環境下における各種免疫細胞の機能を分子解析**することで、酸素起因性アレルギーの新たな病態を明らかにし、医療及び獣医療において社会的問題化しているアレルギー疾患の新規視点に基づく治療法開発の基礎的知見の獲得を目指すものである。すなわち、酸素センシングを担う TRP チャネルに着目して、免疫担当細胞の機能を標的とした新たなアレルギー病態を分子解析した。

2. 研究の目的

本研究では、酸素センシングの有力候補である TRP ファミリーのうち TRPA1 および TRPV1 に焦点を絞り、(1)アレルギー反応に寄与するエフェクター細胞群 (マスト細胞、T 細胞、B 細胞、抗原提示細胞など) における TRP ファミリー分子の発現状態を探索するとともに、(2)細胞群の活性化に及ぼす影響を調べた。(3)さらに、相対的低酸素のセンシング機構を TRP チャネルの遺伝子改変操作によって詳細に検討する。以上の *in vitro* 試験を実施し、得られた知見を基に、*in vivo* 試験を実施した。即ち、相対的低酸素起因性疾患の病態モデルとして、アナフィラキシー (急性高山病) および AD について検討を加えた。以上の研究計画により、相対的低酸素刺激がもたらすアレルギー反応の誘導及び修飾に関する基本病態を明らかにした。

3. 研究の方法

In vitro および *in vivo* の試験から構成され、前者ではマスト細胞をはじめとする T 細胞、B 細胞などアレルギーエフェクター細胞群を対象に、酸素センシングチャネルと推測される TRP サブファミリーの発現状態を検証した。また、相対的低酸素刺激が細胞の生存と活性化に及ぼす影響を、TRP チャネルノックアウトマウスを利用し、分子生物学的手法を主体に解析した。後者では、相対的低酸素起因性疾患の病態モデルとして、アナフィラキシー (急性高山病) について検討を加えた。即ち、TRP チャネルノックアウトマウスや特異的阻害剤を駆使しながら、相対的低酸素環境下で誘導されたショック状態を検証するため、そのパラメーターである体温低下率や血中ヒスタミン濃度などを定量化するとともに、発症や病勢との連関を評価した。

4. 研究成果

本研究は、酸素濃度の変化がアレルギー反応を誘発する1因子であると考えられること、そしてTRPA1が相対的低酸素状態におけるマスト細胞の酸素受容を担うという代表者の発見に基づき、各種免疫細胞のTRPチャンネル発現動態を解析し、アレルギー病態の酸素受容による増悪化機構を明確化することを目的とした。

(1) 各種免疫系細胞におけるTRPチャンネルの発現解析

マウス骨髄由来マスト細胞ならびにその細胞株、T、B細胞群の各種TRPチャンネルの発現をフローサイトメトリー、プロテオーム、免疫染色で解析した。骨髄由来マスト細胞では、TRPA1、M3、M7が発現しており、マウス及びヒト細胞株では、TRPA1がより発現していた一方、M3、M7は発現量に差異はなく、その他TRPサブファミリーの発現も認められなかった。腹腔内より抽出したT、B細胞では、いずれのTRPチャンネルの発現も確認できなかった。

(2) 相対的低酸素状態におけるマスト細胞のTRPチャンネルの発現解析

上記の結果から、相対的低酸素刺激後のマスト細胞のTRPA1、M3、M7の発現動態をフローサイトメトリー及び免疫染色、ウェスタンブロット法にて解析した所、TRPA1チャンネルのみ発現量が増加した。

(3) ADモデルマウスにおけるTRPA1チャンネルの発現解析

ADモデルNC/Tndマウスに対して相対的低酸素刺激を加え、搔爬行動、皮膚炎症状、経費水分蒸散量を解析し、皮膚組織におけるTRPA1発現を確認した。さらに、NC/Tndマウス骨髄由来マスト細胞に対して相対的低酸素刺激を加え、発現解析を実施した。相対的低酸素刺激後、皮膚炎症状、経皮水分蒸散量に変化は認められなかった。他方、搔爬行動は、顕著に増加し、皮下組織におけるTRPA1陽性マスト細胞数が増加した。

(4) 相対的低酸素刺激によるアナフィラキシー病態の解析

各50%、60%、75%酸素からの相対的低酸素刺激を成体C57BL/6Jマウスに加え、刺激直後から16、24、72、120時間後までの直腸温度、血管透過性、血中tryptase、histamine濃度を測定した。50% 20%の刺激では、直腸温度の低下や血管透過性の上昇、tryptase、histamineの血中濃度の増加は認められなかった。しかし、60% 20%、75% 20%の刺激では、それらアナフィラキシー病態が発現し、酸素濃度及び高酸素曝露時間(16時間以上の曝露)依存的に重症度が増加することが分かった。他方、TRPA1ノックアウトマウスやマスト細胞欠損マウス(Cpa3^{Cre/+})では、アナフィラキシー症状が顕著に抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

松田研史郎、田中あかね、松田浩珍、マスト細胞の活性化に基づく未熟児網膜症の病態発病メカニズム、Functional Food Research、14巻、2018、4-9 査読有

Matsuda K, Okamoto N, Kondo M, et al. Mast cell hyperactivity underpins the development of oxygen-induced retinopathy. *J. Clin. Invest.* 127(11):3987 - 4000, Nov. 2017 査読有

〔学会発表〕(計3件)

○松田研史郎、田中あかね、松田浩珍 未熟児網膜症病態発現機構の分子解析：マスト細胞の必要性

日本獣医学会学術集会 2018年9月

○Matsuda K, Karasawa K, Arkwright PD, Tanaka A, Matsuda H. Mast cells are critical for aberrant vascular remodeling of oxygen-induced retinopathy.

European Academy of Allergy and clinical immunology Congress 2018. May 2018

○松田研史郎、田中あかね、松田浩珍 肥満細胞の活性化に起因する未熟児網膜症の発病メカニズム

Tokyo Biomarker Innovation Research Association Forum 2018年5月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：松田浩珍

ローマ字氏名：MATSUDA, hiroshi

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。