

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19396

研究課題名（和文）アレルギー親和性を基盤とした加齢発症アレルギーの原因究明と戦略的脱感作療法の確立

研究課題名（英文）Age-related changes in allergic disease and establishment of affinity allergen-based immunotherapy

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） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：高度高齢化社会を向かえている我が国において、高齢者の健康維持・増進は、社会的関心事である。これまで加齢免疫学研究は、感染症・ガンについては行われてきたものの、加齢発症アレルギーに関しては、十分な研究がなされてこなかった。本研究では、加齢マウス等を用いた研究から、アレルギー反応を担うマスト細胞が、加齢によって恒常的に活性化されており、加齢によるアレルギー非依存的なマスト細胞活性化機構の存在が示唆された。またアレルギー疾患モデル動物を用いた解析から、アレルギー疾患の種類によって異なる病態を示す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

高度高齢化社会を向かえている我が国において、高齢者の健康維持・増進は、社会的関心事である。これまで加齢免疫学研究は、感染症・ガンについては行われてきたものの、加齢発症アレルギーに関しては、十分な研究がなされてこなかった。本研究の遂行によって、アレルギー疾患は、加齢によるアレルギー担当細胞の恒常的活性化や疾患モデル毎に異なる病態を示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In Japan, which is facing a highly aging society, maintaining and improving the health of the elderly is a social concern. Immunosenescence research has been mainly conducted on infectious diseases and cancer, however sufficient research has not been conducted on aging-onset allergies. In this study, we investigated that mast cells are constitutively activated in aging mice, suggesting the existence of an allergen-independent mast cell activation mechanism. In addition, analysis using allergic disease model mice revealed that different pathological conditions are exhibited depending on the type of allergic disease such as atopic dermatitis and anaphylactic reactions.

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 加齢 免疫老化 アレルギー親和性

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

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は、急速に高度高齢化社会を向かえており、高齢者の健康維持・増進は、大きな社会的関心事である。近年、「Immunosenescence (免疫老化)」という言葉が、多く語られるようになり、加齢に伴う免疫機能の変化と疾患発症との関係が注目されている。加齢による体調変化(免疫機能低下)は、ガンや感染症の発症率の増加の一因であると考えられており、致死性疾患についてはこれまで研究が行われてきた。しかしその一方で、アレルギー疾患のような慢性疾患研究については立ち遅れているのが現状であり、中でも加齢発症アレルギー疾患については、発症要因が未だ明らかになっていない。そのため、臨床・介護の現場においては、高齢者の様々なアレルギー疾患(アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物・薬物アレルギー、喘息など)の問題が山積しており、その解決は喫緊の課題である。このように、加齢発症アレルギー疾患は、若年性アレルギー疾患と比較して疾患原因の特定が困難であることから、慢性化・難治化し高齢者 QOL (Quality of Life) の低下を招いており、発症メカニズムの解明が不可欠である。

### 2. 研究の目的

アレルギー反応は、アレルゲンがマスト細胞上の IgE を介して IgE 受容体 (Fc RI) を活性化し、ヒスタミンなどの炎症性メディエータを分泌することによって引き起こされる。加齢に伴って発症するアレルギー疾患は、加齢特有の体質変化(免疫機能、アレルギーテスト反応性、バリア機能等)から、若年性アレルギー疾患とはその原因が大きく異なると考えられている。

本研究では、加齢特有の体質変化など、多くの点において若年性アレルギー疾患とは異なる加齢発症アレルギーについて、若年及び加齢マウスを用いた *in vitro* 及び *in vivo* 解析を通して発症メカニズムを解明する。さらにアレルゲンの親和性を利用した新規脱感作メカニズムを解明し、加齢発症アレルギー疾患の治療に応用することを試みた。

### 3. 研究の方法

若年及び加齢マウスを用いた *in vitro* 及び *in vivo* 解析を通して、加齢発症アレルギー疾患の原因究明とアレルゲン親和性を用いた新しい視点から脱感作療法の分子メカニズムの解明を目指した。

#### (1) 若年・加齢マスト細胞を用いた *in vitro* 解析

若年・加齢マウスからマスト細胞の単離や培養を行い、それらの解析を行うことによってマスト細胞の加齢に伴う機能変化を明らかにすることを試みた。また申請者が独自に作製した親和性アレルゲンを用い、アレルゲン親和性による IgE 受容体の活性化制御機構と脱感作メカニズムを明らかにし、加齢発症アレルギーへの応用を目指した。

#### (2) 若年・加齢マウスと各種アレルギー疾患モデルを用いた加齢発症アレルギーの機能解析

若年及び加齢マウスを用いて、Senescence-Associated  $\beta$ -Galactosidase (SA  $\beta$ -Gal) を用いた老化細胞の検出を試みた。また各種アレルギー疾患モデル(局所性及び全身性アナフィラキシー、アトピー性皮膚炎等)を作製し、アレルギー疾患応答や組織学的解析、また免疫学的な解析を実施し加齢発症アレルギーの分子メカニズムを追究した。

### 4. 研究成果

#### (1) 若年・加齢マスト細胞を用いた *in vitro* 解析

若年・加齢マウスからの腹腔マスト細胞の単離・培養方法の確立

加齢発症アレルギー疾患の発症機構を追究するため、若年及び加齢マウスの腹腔に存在する腹腔マスト細胞の単離及び培養条件の検討を行った。単離腹腔マスト細胞をマーカー蛋白質(Fc RI)発現を指標に共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、マーカー蛋白質が発現しているマウス腹腔マスト細胞の観察に成功した。今回の単離・精製方法では、腹腔マスト細胞の単離・精製には成功したものの、十分な純度及び細胞数の確保が難しいことが示唆された。そこでこれらの問題を解決するため、マスト細胞マーカー蛋白質の1つである CD117 に対するマグネットビーズを用いた単離・精製方法条件の検討を行った。その結果、精製純度についてはマグネットビーズを用いることで、大幅な改善が観られたが十分な細胞数を得ることが難しいと考えられた。次に、腹腔マスト細胞の培養条件の検討を行った。その結果、培養後の腹腔マスト細胞では、十分な純度と細胞数が得られることが分かった。これらの結果は、マスト細胞の加齢による性質変化を追究するための重要なツールになると考えられる。

アレルゲン親和性による脱感作療法と加齢発症アレルギー抑制への応用

加齢発症アレルギー疾患の新しい治療方法を確立する一環として、アレルゲン親和性(高親和性及び低親和性アレルゲン)を基盤とした新たな視点から脱感作療法を検討するため、骨髄由来マスト細胞を用いた *in vitro* 脱感作のメカニズム解析を行った。その結果、高親和性アレルゲンや低親和性アレルゲンを用いて脱感作を行ったマスト細胞では、いずれの場合にもマスト細胞のアレルゲン刺激応答に伴う分泌反応が抑制されていることが明らかになった。さらに、脱感作後のマスト細胞上の IgE 受容体 (Fc RI) の発現量も低下しており、また細胞内への IgE-IgE 受容体 (Fc RI) 複合体の取り込みについては増加していることが明らかになった。このことから、アレルゲン親和性を利用した脱感作療法が、加齢発症アレルギー疾患においても有効である可能性が考えられた。

## (2) 若年・加齢マウスと各種アレルギー疾患モデルを用いた加齢発症アレルギーの機能解析

### 加齢マウスの免疫組織における老化細胞の検出

加齢に伴う細胞老化が、生体内の恒常性や免疫機能に影響を及ぼしていることが明らかになりつつある。また、種々の組織における免疫細胞の老化や機能変化が、アレルギー応答を制御している可能性が示唆されている。そのため若年マウスと加齢マウスの免疫組織の組織切片を用いて、老化細胞の検出を行った。老化細胞の検出には、Senescence-Associated-Galactosidase (SA-β-Gal) を用いた。その結果、若年マウスの免疫組織（リンパ節、脾臓）では、SA-β-Gal の発現する老化細胞はほとんど検出されなかった。一方、加齢マウスの免疫組織（リンパ節、脾臓）では、SA-β-Gal を発現する老化細胞が数多く観察された。また、画像解析の結果、ここで観察された老化細胞はマスト細胞ではないことが分かった。

### 加齢によるマスト細胞および活性化状態の変化

若年性のアレルギー疾患では、疾患の発症に外来アレルゲン及び外来アレルゲン依存的なマスト細胞の活性化が重要な役割を担うと考えられている。しかし、加齢マウスのアレルギー疾患発症メカニズムは若年マウスのもとは異なる可能性が示唆される。ここでは、若年マウスと加齢マウスにおける、定常状態（外来アレルゲン非存在下）でのマスト細胞の体内での状態（細胞数や活性化状態など）についての検討を行った。はじめに、若年マウスと加齢マウスの皮膚組織におけるマスト細胞の染色を行ったところ、若年マウスの皮膚組織に存在するマスト細胞の場合には、細胞膜の輪郭がはっきりしたマスト細胞が数多く観察された。一方で、加齢マウスの皮膚組織においては、マスト細胞の細胞膜が、マスト細胞内に含まれる炎症性メディエータを細胞外に放出する脱顆粒（分泌）反応を起こした際に観察される顕著な細胞輪郭の変化と、分泌反応による顆粒状の染色が観察された。これらの結果から、加齢によってマスト細胞が、外来アレルゲンが存在していないにもかかわらず、組織内で恒常的な脱顆粒反応を起こしている可能性が示唆された。

さらに我々の研究成果から、マスト細胞は組織で炎症反応に伴いリンパ組織でのマスト細胞数の増加や他の細胞との相互作用によってアレルギー炎症を調節・制御していることが明らかになっている。そこで、各種リンパ組織におけるマスト細胞の分布及び細胞数についても追究した。その結果、加齢に伴い頸部リンパ組織内のマスト細胞数が有意に増加していることが分かった。以上の結果から、加齢によって免疫組織におけるマスト細胞の細胞数が増加し、アレルギー応答を制御している可能性が示唆された。また、特定の外来アレルゲンが存在していない条件下においても、免疫組織内のマスト細胞で脱顆粒反応が誘導されていたことから、アレルギー非依存的なマスト細胞の活性化メカニズムが存在する可能性や加齢に伴う恒常性維持機構の変化による体内物質のアレルゲン化など、これまで明らかになっていないマスト細胞活性化制御機構と加齢発症アレルギー疾患発症機構の存在の可能性が示唆された。

### 加齢によるアレルギー疾患の病態変化

次に、アトピー性皮膚炎モデル、局所性及び全身性アナフィラキシーモデルを用いて、加齢によるアレルギー疾患の病態変化について追究した。その結果、アトピー性皮膚炎モデルに関しては、若年及び加齢マウスで病態の発症について、顕著な違いは観察されなかった。一方、局所性及び全身性アナフィラキシーモデルの場合には、若年及び加齢マウスで病態の大きな違いが観察された。局所性アナフィラキシーモデルにおいては、マスト細胞の活性化の指標として用いた血管透過性において、加齢マウスで有意に血管透過性が亢進しており、マスト細胞が有意に活性化している可能性が示唆された（図1）。また、全身性アナフィラキシーモデルでは、直腸体温変化をアナフィラキシーショックの指標としており、こちらについても加齢マウスで有意にショック症状が増悪していることが明らかになった。これらのことから、アレルギー疾患の種類によって、加齢による感受性が異なっており、疾患症状に違いが生じている可能性が示唆された。

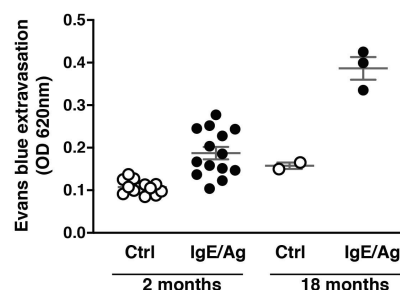


図1 若年及び加齢マウスでのアレルギー刺激に伴う血管透過性解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 長田夕佳、安藤広和、佐々木陽平、鈴木 亮	4. 巻 548
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 Nagata Y, Ando H, Sasaki Yo, Suzuki R	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 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 534
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 Inoue Y., Hasegawa S., Miyachi K., Yamada T., Nakata S., Ipponjima S., Hibi T., Nemoto T., Tanaka M., Suzuki R., Hirashima N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Development of 3D imaging technique of reconstructed human epidermis with immortalized human epidermal cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp. Dermatol.	6. 最初と最後の頁 563-570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13672.	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 -

〔学会発表〕 計29件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

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 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

1. 発表者名 鈴木 亮
2. 発表標題 注目されている免疫細胞・メディエーター「マスト細胞」
3. 学会等名 第5回総合アレルギー講習会（招待講演）
4. 発表年 2018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
研究協力者	平嶋 尚英  (HIRASHIMA Naohide)  (10192296)	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授    (23903)	

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
---------	---------