

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08811

研究課題名(和文)慢性特発性蕁麻疹の病態におけるマスト細胞と好塩基球の活性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mast cell/basophil activation mechanism in chronic spontaneous urticaria

研究代表者

岡山 吉道 (OKAYAMA, Yoshimichi)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80292605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の皮膚マスト細胞(MC)にはMRGPRX2が高発現しており、hemokinin-1(HK-1)は、MRGPRX2のリガンドではあるがMCの脱顆粒には高濃度を必要とし、MCの脱感作を起こした。血清HK-1濃度は、健康人よりもCSU患者で有意に低かった。CSU患者と健康人の血漿から固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて比較した。CSU患者において5-HETEは、有意に高値であり、IgE依存性の好塩基球の活性化を増強したことからCSUの治療標的になりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の皮膚マスト細胞(MC)の活性化機序としてIgE依存性の機序のみならずMas-related G protein-coupled receptor X2(MRGPRX2)を介した系が存在し、CSU患者血清中substance P濃度は健康人と比較して有意に高いが、健康人の皮膚MCもMRGPRX2を発現していることから何らかのMRGPRX2によるMC活性化抑制機構が存在していると考えられた。hemokinin-1がその役割を果たしていることが示唆された。CSU患者の血漿中のアラキドン酸代謝物の5-HETEはCSUの新たな治療標的になる。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported the hyper-expression of Mas-related G protein-coupled receptor X2(MRGPRX2), which is a receptor for substance P(SP) on skin mast cells(MCs) of patients with severe chronic spontaneous urticaria(CSU). We found that hemokinin-1(HK-1) was a ligand of MRGPRX2, but high concentration of HK-1 was required for the activation of MCs and HK-1 induced desensitization of MCs. The concentrations of HK-1 in sera from patients with CSU were significantly lower than those from healthy controls. Therefore, HK-1 may inhibit MC activation by SP in healthy controls. Lipid profiling in sera from CSU patients and healthy controls was performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry/mass spectrometry. The concentrations of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE) in CSU patients were significantly higher than those from healthy controls. 5-HETE induced priming of IgE-dependent basophils degranulation. Thus, 5-HETE would be a new therapeutic target for CSU.

研究分野：アレルギー学

キーワード：マスト細胞 IgE 慢性特発性蕁麻疹 好塩基球 脂質メディエーター MRGPRX2 hemokinin-1 substance P

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

重症慢性特発性蕁麻疹 (CSU) において血清 IgE 値の高い患者が、オマリズマブに有効であることから、この患者群の病態には、IgE が関与している。私達は、世界に先駆けて CSU 患者の血清中に自己抗原に対する IgE 抗体が存在することを報告した (Int Arch Allergy Immunol 161 (supple 2):154-158, 2013)。Hide らは、世界で初めて慢性蕁麻疹患者の血清中に抗 FcεRIα鎖自己抗体 (autoantibodies; AAbs) が存在することを報告した (N Engl J Med 328:1599-604, 1993)。私達は、日本人の CSU 患者においては、抗 FcεRIα鎖自己抗体より抗 IgE 自己抗体が FcεRI の架橋能を有することを報告した (Allergol Int 68:342-351, 2019)。従って自己抗原に対する IgE 抗体を持つ患者や抗 IgE 自己抗体による FcεRI の架橋能の高い患者がオマリズマブに反応するものと考えられる。

私達は、ASST 陽性かつ血清 IgE 低値がシクロスポリンに著効することを報告した (Allergol Int 68:270-273, 2019)。ASST 陽性とは、患者血清中にヒスタミン遊離因子が存在することを意味している。今までの研究ではこの因子は、補体でもなく、IgG でもないことが報告されており、私達も ASST 陽性を来すヒスタミン遊離因子が抗 FcεRIα鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体ではないことを確認した (Allergol Int 68:270-273, 2019)。私達は、重症 CSU 患者の皮膚マスト細胞には substance P の受容体である Mas-related G protein-coupled receptor X2 (MGPRX2) が高発現していることを報告した (J Allergy Clin Immunol 134:622-633, 2014)。MGPRX2 のリガンドとして、angiopeptin, somatostatin, platelet factor 4 などが報告されており、様々な内因性因子がマスト細胞を活性化する可能性がある。また他の受容体が関与している可能性もある。これらの機序によってマスト細胞は活性化され、好塩基球や好酸球が膨疹局所に集積してくる (J Allergy Clin Immunol 109:694-700, 2002)。CSU 患者の好塩基球と好酸球表面の CRTh2 の発現レベルは健常人より internalization のため低下しているという (J Allergy Clin Immunol 137:304-306, 2016)。そこで CRTh2 Antagonist (AZD1981) が CSU 患者に治験として投与さその効果は有意であったものの著効ではない (Int Arch Allergy Immunol 179:21-30, 2019)。従って prostaglandin D₂ (PGD₂) 以外の遊走因子も存在することが示唆される。末梢血好塩基球数、好酸球数が減少している患者は重症であり、炎症部位への遊走が原因と言われている。また、CSU 患者の好塩基球は IgE 依存性刺激に対する反応性が低下し、オマリズマブ治療によって反応性は回復するが、機序は不明である。

2. 研究の目的

重症 CSU 患者の治療法はヒト化抗 IgE 抗体(オマリズマブ)またはシクロスポリンの投与である。私達は、自己血清皮内テスト(ASST)陽性かつ血清 IgE 低値がシクロスポリンに著効することを報告した。一方、血清 IgE 高値の患者あるいは ASST 陰性患者が、オマリズマブに有効であることが報告されている。そこで CSU の病態を ASST の結果および血清 IgE 値で分けて検討し、今回 ASST 陽性を来すマスト細胞活性化機構の解明とその受容体を決定することを第一の目的とする。第二の目的は、皮膚マスト細胞が活性化され産生されるメディエーターが引き金となって好塩基球と好酸球の病変への集積を惹起しているものと考え、症状のある CSU 患者と健常人の血漿中および皮膚角質の脂質メディエーターを網羅的に解析 (脂質メタボローム解析) し、遊走因子および活性化制御因子を同定することである。第三の目的はオマリズマブの治療効果を予測する biomarker の同定である。

3. 研究の方法

(1). ASST 陽性を来すマスト細胞活性化機構の解明; その受容体の決定。
肺マスト細胞と皮膚マスト細胞に発現している遺伝子の網羅的比較解析によって MGPRX2 を始めとするヒト皮膚マスト細胞に特異性の高い発現を示す G タンパク質共益型受容体群およびイオンチャネル群の中から脱顆粒を正に制御する受容体群を選択し、それらを CHO 細胞に強制発現した細胞を作製した。好塩基球に発現している G タンパク質共益型受容体群も参考にして受容体群を選択した。ASST 陽性と ASST 陰性患者の血清から albumin, myoglobin, immunoglobulins, transferrin や haptoglobin など豊富に存在するタンパク質を ProteoMiner® Protein Enrichment Small-Capacity(PM) kit (Bio-Rad, CA, USA)を用いて除去した後の血清をこの細胞群に添加し Ca²⁺ influx, reporter gene assay の場合は luciferase activity を指標に評価した。

(2). 好塩基球および好酸球の遊走因子と活性化制御因子は何か。
CSU 患者 67 人、健常人 27 人の血漿から、固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて解析した。好塩基球活性化試験(BAT)を用いて脂質の好塩基球の活

性化能を評価した。

(3). オマリズマブの治療効果を予測する biomarker の同定

61名の重症CSU患者に対して、オマリズマブ投与前の free IgE 値 (pre-free IgE), total IgE 値 (pre-total IgE) および抗 IgE 自己抗体値を私達が確立した ELISA 法を用いて測定し、オマリズマブ治療効果との関連に関して解析を行った。当該研究は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に臨床試験の申請をし、承諾を得た。オマリズマブ 1 回目投与前に採血した。オマリズマブ 2 回目投与までの 4 週間の UAS7 の平均値とオマリズマブ投与 3 回目から 4 回目までの UAS7 の平均値を用いて治療効果を判定した。平均 UAS7 が 6 以下を responder, 6 より大きい場合を non-responder とし、responder と non-responder の 2 群間においてまず pre-free IgE 値と pre-total IgE 値に有意差があるかどうか評価した。

4. 研究成果

(1). ASST 陽性を来すマスト細胞活性化機構の解明; その受容体の決定.

まずポジティブコントロールとして MRGPRX2 および MRGPRX1 を CHO 細胞に強制発現した細胞を作製した。血清中の MRGPRX2 のリガンドの濃度を測定したが、それらの濃度は、MRGPRX2 強制発現 CHO 細胞の Ca^{2+} influx を誘導できる濃度より 100 倍低く、実験系の感度の問題から ASST 陽性を来すマスト細胞の活性化を起こす責任受容体は同定できなかった。しかしながら MRGPRX2 のリガンドの検索を行った際に CSU 患者および健常人血清中に hemokinin-1 (HK-1) が存在していることを発見した。そこで以下の研究をまとめた。

substance P と 70% の homology を示す HK-1 は、MRGPRX2 のリガンドではないかという仮説を立て CSU における HK-1 の役割を解析した。ヒトマスト細胞からのヒスタミン遊離 50% 効果濃度は substance P (426 nM) よりも HK-1 (5056 nM) の方が 12 倍高値であった。ヒトマスト細胞の MRGPRX2 の発現をレンチウイルス shRNA サイレンシング法により抑制すると HK-1 刺激によるヒスタミン遊離は完全に抑制された。血清 HK-1 濃度は、健常人 (n = 114) よりも CSU 患者 (n = 151) で有意に低かった ($P < 0.0001$)。HK-1 でマスト細胞を 15 分間前処理すると、substance P 刺激によるヒスタミン遊離量が有意に減少したが、MRGPRX2 の急速な internalization は誘発されなかった。健常人において高濃度 HK-1 は、MRGPRX2 を介したマスト細胞の活性化を脱感作し substance P による MC の脱顆粒を抑制している可能性がある。

(2). 好塩基球および好酸球の遊走因子と活性化制御因子は何か.

CSU 患者 67 人、健常人 27 人の血漿から、固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて解析した。好塩基球活性化試験 (BAT) を用いて脂質の好塩基球の活性化能を評価した。CSU 患者群においてアラキドン酸代謝物の 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) と leukotrien (LT) C_4 および LTE_4 が健常人と比較して有意に高値であった。エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸の代謝物では 5-hydroxyeicosapentaenoic acid (HEPE), protectin (PD)1, resolving (Rv) D2 などが健常人と比較して有意に高値であった。5-HETE は、末梢血好塩基球数とも有意な正の相関を示した。5-HETE の好塩基球への添加により IgE 依存性の好塩基球の活性化が増強された。重症度とは 12-HETE および 12-HEPE が負の相関関係を示した。

(3). オマリズマブの治療効果を予測する biomarker の同定

61名の重症CSU患者に対して、オマリズマブ投与前の free IgE 値 (pre-free IgE), total IgE 値 (pre-total IgE) および抗 IgE 自己抗体値とオマリズマブ治療効果の関連に関して解析を行った。当該研究は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に臨床試験の申請をし、承諾を得た。オマリズマブ 1 回目投与前に採血した。オマリズマブ 2 回目投与までの 4 週間の UAS7 の平均値とオマリズマブ投与 3 回目から 4 回目までの UAS7 の平均値を用いて治療効果を判定した。平均 UAS7 が 6 以下を responder, 6 より大きい場合を non-responder とし、responder と non-responder の 2 群間においてまず pre-free IgE 値と pre-total IgE 値に有意差があるかどうか評価した。投与開始 0 から 4 週間後の平均 UAS7 で分類した responder と non-responder では pre-free IgE 値, pre-total IgE 値は有意差がなかった。次にオマリズマブ投与開始 8 から 12 週間後の平均 UAS7 で分類した responder と non-responder の 2 群間での pre-free IgE 値, pre-total IgE 値の有意差検定を行ったところ、pre-free IgE 値, pre-total IgE 値両者とも responder 群で有意に高かった。Pre-free IgE のカットオフ値は、133.3 ng/ml、感度は、57.1%、特異度は、85%であった。Pre-total IgE のカットオフ値は、327.6 ng/ml、感度は、71.4%、特異度は、72.5%であった。従って、慢性特発性蕁麻疹に対してオマリズマブの治療効果を判定する biomarker として pre-free IgE が pre-total IgE に勝るものではなかった。しかしながら投与開始 0 から 4 週間後の平均 UAS7 で分類した responder と non-responder では抗 gE 自己抗体値は non-responder において有意に高かった。その機序として IgE とオマリズマブの複合体

を抗 IgE 自己抗体が IgE とオマリズマブの複合体を解離させることが分かった.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, Hayama K, Matsuda A, Watanabe Y, Terui T, Gon Y, Matsumoto K, Okayama Y	4. 巻 In press
2. 論文標題 miR103a-3p in extracellular vesicles from Fc RI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2021.01.002	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 該当する

1. 著者名 Mishima S, Kashiwakura J, Toyoshima S, Sasaki-Sakamoto T, Sano Y, Nakanishi K, Matsumoto K, Okayama Y	4. 巻 In press
2. 論文標題 Higher PGD2 production by synovial mast cells from rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients via miR-199a-3p/prostaglandin synthetase 2 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84963-7	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 該当する

1. 著者名 Nishimori N, Toyoshima S, Sasaki-Sakamoto T, Hayama K, Terui T, Okayama Y	4. 巻 In press
2. 論文標題 Serum level of hemokinin-1 is significantly lower in patients with chronic spontaneous urticaria than in healthy subjects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 In press
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 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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 田杭真帆, 豊島翔太, 三木寿美, 伊東真奈, 武富芳隆, 葉山惟大, 坂本朋美, 村上誠, 藤田秀樹, 照井正, 岡山吉道
2. 発表標題 リビドミクスを用いたアトピー性皮膚炎患者の脂質プロファイルの解析
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊東真奈, 田杭真帆, 遠藤高太, 豊島翔太, 三木寿美, 武富芳隆, 葉山惟大, 坂本朋美, 村上誠, 照井正, 藤田秀樹, 岡山吉道
2. 発表標題 慢性突発性蕁麻疹患者血漿中の脂質メディエーターの病態への関与
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, Hayama K, Matsuda A, Watanabe Y, Terui T, Gon Y, Matsumoto K, Okayama Y
2. 発表標題 miR103a-3p in extracellular vesicles derived from human mast cells following aggregation of Fc epsilon RI enhances IL-5 production from IL-33-stimulated type2 innate lymphoid cells via PRMT5
3. 学会等名 JSA/WAO XXVII Allergy Congress (WAC 2020) joint with the APAPARI 2020 Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamada S, Maruoka S, Fukuda A, Kurosawa Y, Toyoshima S, Okayama Y, Ito R, Ito M, Gon Y
2. 発表標題 Establishment of a human severe asthma model using humanized mice
3. 学会等名 JSA/WAO XXVII Allergy Congress (WAC 2020) joint with the APAPARI 2020 Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tagui M, Toyoshima S, Miki Y, Endo T, Ito M, Niwa Y, Taketomi Y, Hayama K, Sakamoto S, Murakami M, Terui T, Okayama Y
2. 発表標題 Lipid mediator profiles of chronic spontaneous urticaria and atopic dermatitis
3. 学会等名 JSA/WAO XXVII Allergy Congress (WAC 2020) joint with the APAPARI 2020 Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okayama Y
2. 発表標題 Human mast cell interaction with inflammatory cells in allergic diseases, In Symposium of Mast cells, basophils and eosinophils
3. 学会等名 JSA/WAO XXVII Allergy Congress (WAC 2020) cojoint with the APAPARI 2020 Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 慢性皮膚疾患の検査キット、及び慢性皮膚疾患の評価方法	発明者 岡山吉道, 田杭真帆, 照井正, 伊東真奈, 豊島翔太他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-153097号	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 慢性皮膚疾患の検査キット、及び慢性皮膚疾患の評価方法	発明者 岡山吉道, 田杭真帆, 照井正, 他5名	権利者 学校法人日本大 学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-153097号	出願年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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