

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19494

研究課題名（和文）アレルギーの根治を目指したアレルギー抑制型マスト細胞誘導機序の解明と活用

研究課題名（英文）Generation of immunomodulatory type of mast cells for the treatment of allergic diseases

研究代表者

倉島 洋介（Kurashima, Yosuke）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30729372

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：アレルギー免疫療法（減感作療法）はアレルギー疾患の有効な治療法である一方で、投与方法により発生率に違いはあるもののアナフィラキシーなどの重篤な副反応が発現し、治療が中止されることも少なくない。加えて、治療効果を調べるバイオマーカーも見出されておらず、治療効果も症状の発現の評価が主である。そのため、アレルギー免疫療法の治療機序の解明による治療過程における有効性と効果の持続性を示すバイオマーカーもしくは副反応の予測因子の同定が急務である。本研究では、マスト細胞の単細胞解析からアレルギー刺激の強さや頻度により、複数の活性化経路のうちの1つがマスト細胞の脱感作状態の維持に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アレルギーの根治を目指したアレルギー抑制型マスト細胞誘導機序の解明と活用を目指し、アレルギー治療につながるマスト細胞の単細胞解析データを得た。得られた結果から、新たなバイオマーカー・予測因子の候補が見出され、今後はアレルギー治療患者での解析を通じて効果的な脱感作のマーカーの同定からアレルギー疾患の治療への貢献を目指す。

研究成果の概要（英文）：While allergen immunotherapy is an effective treatment, there can be significant differences in the occurrence of serious adverse reactions, such as anaphylaxis. The adverse reaction leads to the discontinuation of treatment. In the case of oral immunotherapy, it has shown effectiveness in allergy treatment, but it is still in the clinical research stage, and the therapeutic mechanism is not yet clear, nor have any biomarkers to assess treatment efficacy or side effects been identified. Therefore, it is urgent to identify biomarkers or predictive factors for side effects that can indicate the effectiveness and durability of treatment processes through the elucidation of the therapeutic mechanism. In this study, single-cell analysis of mast cells revealed that among multiple activation pathways, one pathway is crucial for maintaining mast cell desensitization status, depending on the strength and frequency of allergen stimulation.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー マスト細胞 脱感作 制御性T細胞 減感作療法 アレルギー免疫療法 サイトカイン 食物アレルギー

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

花粉症、ハウスダスト、ピーナッツなどによるアレルギー性鼻炎や気管支喘息、食物アレルギーなどのアレルギー疾患に対する治療法に「アレルギー免疫療法(減感作療法)」が知られる。アレルギーの皮下注射を行う皮下免疫療法、薬液や錠剤を毎日舌下に投与する舌下免疫療法、アレルギーのある食物を少量ずつ摂取する経口免疫療法があり、いずれの治療法もアレルギーを段階的に長期間摂取していくことで、ヒスタミンを産生するアレルギー誘発細胞である「マスト細胞」の脱顆粒が抑制される「脱感作状態」を誘導し、維持する。

アレルギー免疫療法(減感作療法)は有効な治療法である一方で、投与方法(ルート)により発生率に違いはあるもののアナフィラキシーなどの重篤な副反応が発現し、治療が中止されることも少なくない。経口免疫療法においては、アレルギー治療に有効であるが、臨床研究段階であり、治療機序が明らかになっておらず治療効果を調べるバイオマーカーも見出されていない。そのため、治療機序の解明による治療過程における有効性や効果の持続性を示すバイオマーカーもしくは副反応の予測因子の同定が急務である。

2. 研究の目的

食物アレルギーの治療には、臨床研究段階の治療法として経口免疫療法が知られるが、アレルギーの抑制機序は不明である。我々は、以前、疾患モデルマウスを作成し解析した。その結果、本来は脱顆粒反応によってアレルギーの発症を引き起こすマスト細胞であるが、経口免疫療法の成功例ではマスト細胞が IL-10 と IL-2 を産生することで、直接的もしくは制御性 T 細胞の増殖を介して間接的にアレルギーを抑える「アレルギー抑制型」マスト細胞に変化していることを見出している。つまり、アレルギー抑制型のマスト細胞の効果的な誘導法と維持法の開発がアレルギーの次世代治療法の確立につながると考えた。

そこで、本研究では、アレルギーの侵入門戸である粘膜組織において、効果的にアレルギー反応を抑え、免疫寛容を誘導することで食物アレルギーのみならず、気管支喘息、花粉症などのアレルギー疾患を抑制することを目的として、アレルギー抑制型マスト細胞誘導機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

in vitro の脱感作マスト細胞の網羅的遺伝子解析から、脱顆粒反応に対して抑制的に働く受容体群の発現が脱感作状態のマスト細胞で増加することが見出された。そこで、これらの受容体が脱感作の誘導維持に関わるかということについて検証を進めた。脱顆粒受容体欠損もしくは機能的に阻害をしたマスト細胞に対して、脱感作誘導を行い脱感作状態の誘導効率について解析を進めた。脱顆粒状態の評価には抗 CD63 抗体によるフローサイトメトリー解析を用いた。

上記の解析に加えて、アレルギーに対する未反応、活性化(脱顆粒)、脱感作状態のマスト細胞を生体内で区別化し、機能解析を可能にする目的で、*in vitro* マスト細胞のシングルセル解析を行った。得られたマスト細胞のシングルセル解析から、クラスタリング解析並びに Trajectory 解析を行い、活性化、脱感作マスト細胞の誘導系譜について解析した。

4. 研究成果

マスト細胞の脱顆粒に対して抑制的に働く複数の脱顆粒抑制受容体に着目し、抑制受容体シ

グナル欠損マウスの骨髄細胞から、マスト細胞を誘導し、脱顆粒解析を行った。その結果、欠損細胞において脱感作の誘導がキャンセルされることはなく、コントロール細胞と同程度の脱感作誘導効率が認められた。つまり、マスト細胞のアレルゲンに対する低応答化の誘導に対しては、脱顆粒に対する抑制受容体シグナルの寄与が少ないことが示された。

加えて、脱感作を誘導し活性化を低下させたマスト細胞集団の中にも、アレルゲン刺激で脱顆粒反応を示すマスト細胞がある程度の割合で存在していることに着目し、アレルゲンに対する個々の細胞の反応性の違いについて明確化が必要と考えられた。アレルゲンに対する個々の反応性の差異についての解明が、脱感作の誘導効率に関わるということが示唆された。つまり、効果的なアレルギー抑制マスト細胞の誘導や維持には、マスト細胞の状態（未感作、活性化、脱感作）における不均一性を明らかにする必要があると考えられた。

そこで、マスト細胞を1細胞レベルで解析し、マスト細胞の不均一性状態と活性化もしくは脱感作状態への移行シグナルの解明を目指した。

その結果、誘導したマウス骨髄細胞由来 *in vitro* マスト細胞のすべての細胞が c-kit と IgE 受容体を均一に発現している状態においても、単一細胞ではなく、複数の細胞亜集団で構成されていることが示された。オントロジー解析から細胞周期や細胞内代謝に応じて細分化されることが示された。これらの細胞においてアレルゲンへの応答性が細胞亜集団によって異なることが推察されたことから、脱顆粒、脱感作の誘導刺激を実施したのちにシングルセル解析を実施し、刺激後にはさらに複数の亜集団が誘導されてくることが示された。この細胞集団について発現している遺伝子のオントロジー解析を行ったところ、脂質代謝やサイトカインシグナル経路によって形質が異なっていることが示された。ここから得られた発現遺伝子などの情報は、マスト細胞活性化、脱感作マーカーとして有用な情報である。

本研究で得られたマスト細胞の遺伝子発現解析データから、アレルゲン刺激の強さや頻度によって異なる複数のシグナル経路が活性化されることが示された。

FcεR1 を少ないアレルゲンで刺激した場合の弱い刺激においては、Fyn/Gab2 を介したシグナル伝達経路が Syk/LAT を介した経路よりも優先的に使用され、サイトカイン産生よりもケモカイン産生が誘導されることが知られている。また、Lyn、Syk、LAT 経路が“Principle’ signaling cascade”と呼ばれるのに対して、Fyn-Gab2-PI3K 経路は“Amplification’ signaling cascade”とも呼ばれ、これらのシグナルがマスト細胞の脱感作状態の誘導と維持にどのように関わってくるかについても解析を進める予定である。

本研究で得られた単細胞解析データから、新たなバイオマーカー・予測因子の可能性についてタンパクレベルでの評価に加えて、動物モデル並びに患者検体での解析が必要である。

今後の研究の発展から、効果的な脱感作の誘導機序を明らかにすることでアレルギー疾患の治療への貢献を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nakahashi-Ouchida R., Fujihashi K., Kurashima Y., Yuki Y., Kiyono H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Nasal vaccines: solutions for respiratory infectious diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 124 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmed.2022.10.009	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 Kobayashi H., Kimura M.Y., Hasegawa I., Suganuma E., Ikehara Y., Azuma K., Ito T., Ebata R., Kurashima Y., Kawasaki Y., Shiko Y., Saito N., Iwase H., Lee Y., Rivas M.N., Arditi M., Zuka M., Hamada H., Nakayama T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased Myosin light chain 9 expression during Kawasaki disease vasculitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1036672	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 Zhang Z., Ernst P.B., Kiyono H., Kurashima Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Utilizing mast cells in a positive manner to overcome inflammatory and allergic diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.937120	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 Zhang Z., Tanaka I., Pan Z., Ernst P.B., Kiyono H., Kurashima Y.	4. 巻 52
2. 論文標題 Intestinal homeostasis and inflammation: Gut microbiota at the crossroads of pancreas?intestinal barrier axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.202149532	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 Sato S., Kainuma K., Noda T., Ebisawa M., Futamura M., Imamura T., Miyagawa A., Nakajima S., Ogawa Y., Inomata T., Kan-o K., Kurashima Y., Masaki K., Myojin T., Nishioka Y., Sakashita M., Tamari M., Morita H., Adachi T.	4. 巻
2. 論文標題 Evaluation of adrenaline auto-injector prescription profiles: A population-based, retrospective cohort study within the National Insurance Claims Database of Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.02.002	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 -

1. 著者名 Adachi T., Ogawa Y., Fukushi T., Ito K., Koizumi A., Shirabe M., Toriya M., Hirako J., Inomata T., Masaki K., Sasano R., Sato S., Kainuma K., Futamura M., Kano K., Kurashima Y., Nakajima S., Sakashita M., Morita H., Iwamoto A., Nishima S., Tamari M., Iizuka H.	4. 巻
2. 論文標題 Research impact analysis of international funding agencies in the realm of allergy and immunology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15249	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 Kamioka M., Goto Y., Nakamura K., Yokoi Y., Sugimoto R., Ohira S., Kurashima Y., Umemoto S., Sato S., Kunisawa J., Takahashi Y., Domino S.E., Renaud J.C., Nakae S., Iwakura Y., Ernst P.B., Ayabe T., Kiyono H.	4. 巻 119
2. 論文標題 Intestinal commensal microbiota and cytokines regulate Fut2 + Paneth cells for gut defense	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2115230119	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 Zhang Z., Kurashima Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Two Sides of the Coin: Mast Cells as a Key Regulator of Allergy and Acute/Chronic Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1615 ~ 1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10071615	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14件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kurashima Y.
2. 発表標題 Elucidation of mucosal defense mechanism by hierarchical support system of digestive tract
3. 学会等名 International Symposium for Future Mucosal Vaccines: Safeguards and Innovations against Infectious Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kurashima Y.
2. 発表標題 Spatially Organized Multicellular Mesenchymal-Neural Hubs in Intestinal Mucosa
3. 学会等名 cSIMVA Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tanaka I., Murasaki S., Zhang Z., Black A., Ernst P.B., Kiyono H., Kurashima Y.
2. 発表標題 Elucidation of Disease-associated Mesenchymal Cells in the Tissue Microenvironment in Mice Colon
3. 学会等名 cSIMVA Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zhang Z., Pan Z., Saito Y., Tanaka I., Black A., Ernst P.B., Kiyono H., Kurashima Y.
2. 発表標題 Identification of Pancreas GP2-binding Bacteria and Elucidation of its Pathogenicity in Intestinal Inflammation
3. 学会等名 cSIMVA Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉島 洋介
2. 発表標題 臓器・細胞連関による腸管粘膜保護
3. 学会等名 SAMURAI研究会 3rd (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kurashima Y.
2. 発表標題 Gut Microbiota at the Crossroads of Pancreas-Intestinal Barrier Axis
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉島 洋介
2. 発表標題 腸管バリア機能を強化する Lactobacillus 株のスクリーニングと有効性の検証
3. 学会等名 第22回DIJFカンファランス (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉島 洋介
2. 発表標題 マスト細胞のアレルゲンセンシング ~脱感作と抗アレルギー機能~
3. 学会等名 日本食品免疫学会第18回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉島 洋介
2. 発表標題 食物アレルギー減感作療法におけるマスト細胞のフェノタイプ変化
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉島 洋介
2. 発表標題 臍による腸管感染防御機構
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kurashima Y.
2. 発表標題 Pancreas-intestinal barrier axis and the control of commensal bacteria in intestinal inflammation
3. 学会等名 15th World Immune Regulation Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉島 洋介
2. 発表標題 腸内細菌の調整役としての「臍臓」の役割
3. 学会等名 SPC (Science Pioneers Consortium) 2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurashima Y.
2. 発表標題 Two sides of the coin: mast cells as a key regulator of allergy and inflammation.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katori A., Saito Y., Ernst P.B., Kiyono H., Kurashima Y.
2. 発表標題 Orchestration of mucosal inflammation by mesenchymal uridine diphosphate-glucose receptor
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 倉島 洋介	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学図書出版	5. 総ページ数 304
3. 書名 胆と膵. 44(3) 腸内細菌の制御を担う膵臓の役割	

1. 著者名 倉島洋介, 清野宏	4. 発行年 2023年
2. 出版社 アークメディア	5. 総ページ数 440
3. 書名 肝胆膵. 86(3) マイクロバイオームと膵腸連関	

1. 著者名 田中 和, 倉島 洋介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 クリニコ出版	5. 総ページ数 128
3. 書名 アロスエルゴン4. 2(1) 免疫応答の万事屋、マスト細胞の細胞間相互作用	

1. 著者名 田中 和, 潘 臻, 倉島 洋介, 清野 宏	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 250
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科. 77(2) 膵臓Glycoprotein2による恒常性維持と腸炎回避機構	

1. 著者名 倉島 洋介	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 470
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科. 76(4) 免疫療法の成功の秘訣：マスト細胞が持つアレルギー抑制機能をいかに引き出せるか	

1. 著者名 香取 明都, 潘 臻, 齊藤 ゆかり, 倉島 洋介	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 228
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科. 76(2) 粘膜間葉系細胞による 修復と炎症遷延化	

〔産業財産権〕

〔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			
米国	University of California, San Diego			