

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16281

研究課題名（和文）汗アレルギーにおける抗原感作経路と汗抗原感作における汗のアジュバント効果の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the antigen sensitization pathway in sweat allergy and the adjuvant effect of sweat in sweat antigen sensitization

研究代表者

石井 香（Ishii, Kaori）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：90448267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎やコリン性蕁麻疹などの皮膚疾患で真皮内に汗が漏出することを踏まえ、真皮線維芽細胞（NHDF）を汗刺激すると複数の炎症性サイトカインやケモカインの強い発現増強が見られ、これらの活性は汗に含まれるIL-1が主要因子であることを特定し、汗漏出による炎症の可能性を示唆した。また真皮線維芽細胞と表皮角化細胞（HaCaT）を共培養することで汗刺激による線維芽細胞の炎症性サイトカイン増強を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は汗中IL-1が真皮線維芽細胞の炎症性サイトカインやケモカインの発現増強することを示し、真皮内に汗漏出することで線維芽細胞を刺激し炎症を引き起こす可能性を示唆した。汗の真皮内漏出が確認されているアトピー性皮膚炎やコリン性蕁麻疹患者の多くは発汗時の強い痒みや汗アレルギーに関わる汗主要抗原に対する特異的IgE抗体が検出されており今回の結果はこれらのメカニズムを解明する重要な事象と考えられる。また汗刺激による真皮線維芽細胞の炎症増強を表皮角化細胞が抑制する事実は、表皮と真皮の相互作用による恒常性維持を示唆しており炎症抑制因子の追求は汗アレルギーを伴う上記疾患等の治療応用の可能性を含んでいる。

研究成果の概要（英文）：Based on the fact that sweat leaks into the dermis in skin diseases such as atopic dermatitis and cholinergic urticaria, we found that stimulating dermal fibroblasts (NHDF) with sweat strongly enhanced the expression of multiple inflammatory cytokines and chemokines, it was identified that IL-1 contained in sweat was the main factor in these activities, suggesting the possibility of inflammation caused by sweat leakage. We also found that co-culturing dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes (HaCaT) suppressed the increase in inflammatory cytokines in fibroblasts induced by sweat stimulation.

研究分野：汗アレルギー

キーワード：汗アレルギー 皮膚バリア 汗腺からの汗漏出 汗中サイトカイン 汗による炎症 アトピー性皮膚炎 コリン性蕁麻疹 真皮線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

汗は保湿や抗菌ペプチド、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ等の皮膚バリア機能を持ち、体温調節や細菌増殖抑制など恒常性の維持に貢献している。一方、汗はアトピー性皮膚炎 (AD) などの増悪因子でもあり、多くの AD 患者やコリン性蕁麻疹患者では、汗中に含まれるマラセチア由来抗原 (汗の主要抗原) に対する特異的 IgE が検出されており、この汗抗原特異的 IgE を介してマスト細胞および好塩基球が活性化され、汗アレルギーが引き起こされる。汗中の主要抗原として同定された MGL_1304 は、皮膚の常在菌の一つの *Malassezia globosa* の分泌する蛋白で、AD およびコリン性蕁麻疹患者の 70~80% にこの蛋白に対する特異的 IgE が検出されている。しかし、汗中に含まれる MGL_1304 蛋白の濃度は AD 患者と健常人の間で明らかな差はなく、MGL_1304 に対する IgG は健常人においても AD およびコリン性蕁麻疹患者でも同様に検出される。さらに、コリン性蕁麻疹では AD や喘息ほど顕著なタイプ 2 炎症は見られないことから、これらの疾患における汗アレルギーには、単なる皮膚バリア障害や Th2 環境だけでは説明出来ない、皮膚固有の感作機序が関与すると考えられる。

近年、AD およびコリン性蕁麻疹を含むいくつかの皮膚疾患では、汗腺周囲のタイトジャンクションの不良で真皮内に汗が漏れていることが明らかになった (Yamaga K, et al. JID, 138:1279-87, 2018)。これは汗に溶けた抗原が、汗腺を通して直接真皮に侵入し得ることを意味する。過去の報告ではエクリン汗中には IL-1 α 、IL-1 β 、IL-31 のサイトカインが存在し、汗で刺激したケラチノサイトが IL-8 や CCL2 などの炎症性サイトカインの増強を誘導し、NF- κ B、ERK、JNK の活性化が起こることが報告されており (Xiuju Dai, et al. PLOS ONE 8(6): e67666, 2013)。また炎症性サイトカインである IL-1 は自然免疫系の活性化だけではなく、T 細胞の活性化に必要な CD40 リガンドや OX40 の発現を誘導し、獲得免疫系においてもアジュバント作用を持つことが知られている (Nakae S, et al. J Immunol, 167: 90-97, 2001)。

2. 研究の目的

個体が皮膚表面に存在する汗抗原に対する特異的 IgE を産生するためには、皮膚のバリア障害による汗抗原の免疫系への曝露と、B 細胞が IgE を産生する形質細胞へと分化、増殖するための微小環境 (タイプ 2 炎症反応) が必要である。

汗中には IL-1 α 、IL-1 β 、IL-31 のサイトカインが存在し、ケラチノサイトを活性化することや、IL-1 が自然免疫系の活性及び獲得免疫系でのアジュバント効果を持つことが報告されているので、汗に溶解した抗原は優位に感作され得ることが予想される。

これらの報告やそれに対する仮説を元に炎症性サイトカインを含む汗に溶解した抗原が、皮膚バリアを通過し表皮または真皮に侵入することで、T 細胞の活性化や抗原感作が増強される可能性を、汗に曝露された皮膚内での遺伝子や蛋白レベルの変化を軸にしながら検証する。

3. 研究の方法

本研究では AD、痒疹、コリン性蕁麻疹などの皮膚疾患で真皮内に汗が漏出する報告 (Yamaga K, et al. JID, 138:1279-87, 2018) を踏まえ、真皮線維芽細胞株 (NHDF) を汗刺激により発現変化が見られる遺伝子を RNA シークエンスで網羅的に解析する。汗中に含まれるサイトカインについては既存の報告があるので、RNA シークエンスデータを元にアンタゴニストや中和抗体を用いながら、汗中のアジュバント効果を示す分子を特定し、その分子と汗抗原を用いてマウスの皮膚免疫 (表皮と真皮) を行い特異的抗体の産生誘導について検討する。また汗腺のタイトジャンクションを形成する Claudin-3 の KO マウスを用いて、フットパット汗腺からの抗原侵入の検討や汗抗原免疫を行い、同様に特異的抗体の産生を検討する。

4. 研究成果

AD、痒疹、コリン性蕁麻疹などの皮膚疾患で真皮内に汗が漏出することを踏まえ、真皮線維芽細胞株 (NHDF) を汗刺激したところ複数の炎症性サイトカインやケモカインの強い発現増強が見られた (Fig.1、Fig.2)。汗中には IL-1 α 、IL-1 β 、IL-31 が含まれることが報告されているので、これらの組換え蛋白を用いて NHDF 刺激し検証したところ IL-1 α が全ての遺伝子発現増強のマスター因子であることを同定した (Fig.3)。これは真皮内に汗が漏出することで、汗中の IL-1 α が線維芽細胞を刺激して炎症を引き起こす可能性を示唆している。これらの事象は、真皮内汗漏出が確認される AD やコリン性蕁麻疹で痒みの誘引や皮膚常在菌である *Malassezia globosa*

が分泌する汗主要抗原 MGL_1304 に対する特異的 IgE が多く検出されることとの相関を解明する一つの重要な要因と考えている。

上記の事象を *vivo* で検証する為に HR-1 ヘアレスマウスの真皮と表皮へ汗や IL-1 を投与し遺伝子発現の変化を検証したところ、表皮投与より真皮投与で IL-6 と CCL2 の発現が上がる傾向が見られた (Fig.4)

タイトジャンクションを構成する Claudin-3 の KO マウスの足裏肉球内での真皮内への汗漏出の検出と炎症性サイトカインの発現は現在実験中で、*vitro* および *vivo* での汗抗原感作の検証は 2024 年度からの科研 (課題番号 24K11495) に引き継ぐ。

また計画には無く研究遂行中に得られた結果として、NHDF と HaCaT の共培養に汗を添加すると、NHDF で単独で確認されていた複数の遺伝子発現増強がかなり抑制されることが確認された (Fig.5)。この事実は生体皮膚内でこれらの皮膚細胞同士の相互作用が恒常性の維持を行っている可能性を示唆しており、遺伝子増強抑制などに働く因子を探索することは汗アレルギーを伴う上記疾患等の治療に応用出来る可能性を含んでいると考え、このテーマについても次期科研 (課題番号 24K11495) にて追求する予定である。

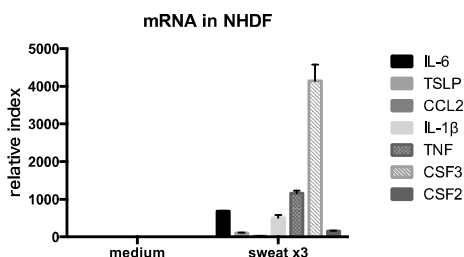


Fig.1 真皮線維芽細胞株の遺伝子発現

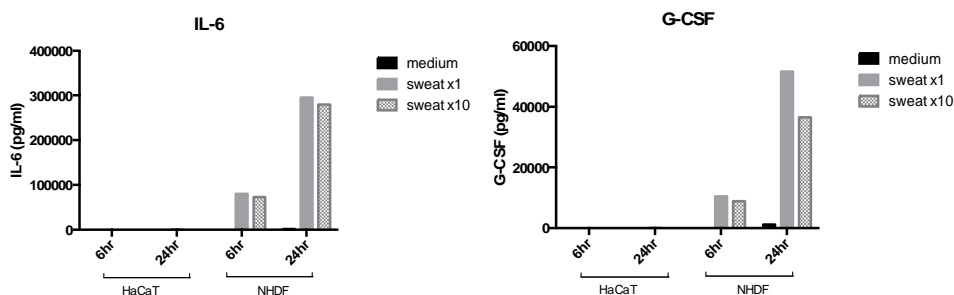


Fig.2 汗刺激した細胞の培養上清に分泌されたサイトカイン濃度

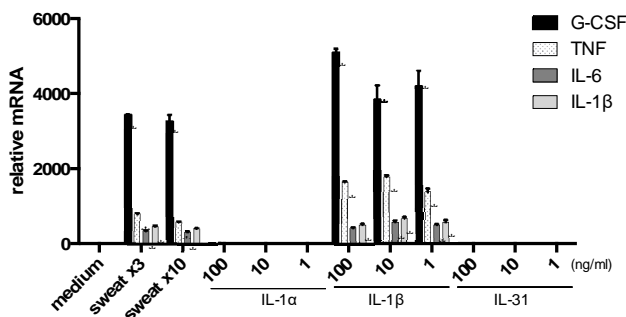


Fig.3 汗中サイトカインの組換え蛋白による NHDF の遺伝子発現

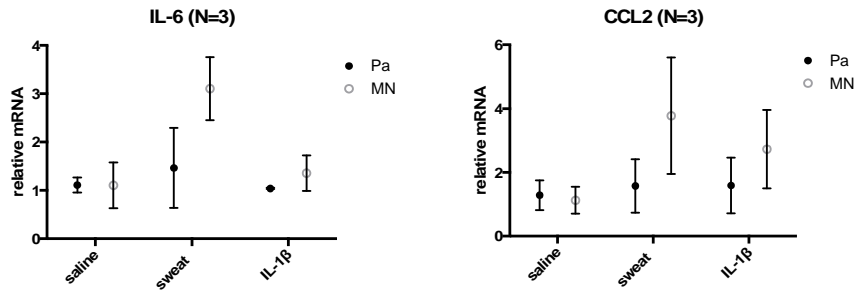


Fig. 4 HR-1 マウスの皮膚投与によるサイトカインの発現 (Pa : 表皮、MN : 真皮)

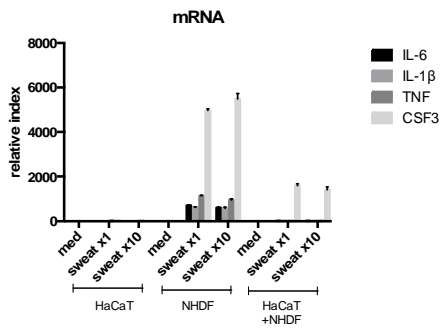


Fig. 5 共培養による遺伝子発現増強の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井 香
2. 発表標題 汗刺激によるヒト角化細胞応答の解析
3. 学会等名 第72回 日本アレルギー学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------