

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461714

研究課題名(和文) 特発性慢性蕁麻疹の病態解明と新規診断法確立

研究課題名(英文) analysis of pathogenesis of chronic spontaneous urticaria and development of new diagnostic method

研究代表者

照井 正 (TERUI, Tadashi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30172109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性蕁麻疹とは発症後4週以上継続したものを言い、一部は自己免疫が関与するが、多くは原因不明の特発性慢性蕁麻疹(CSU)である。またアレルゲン-IgE系を介した刺激以外にもマスト細胞の刺激因子が想定されており、サブスタンスP (SP)も刺激因子の1つである。我々は本研究を通じてマスト細胞に対する自己抗体である抗Fc RI 鎖抗体がELISA法で検出でき、さらに症状が投薬なしで持続する患者では有意に高くなることを見出した。またCSU患者の病変部でMrgX2の発現が上昇し、MrgX2がヒト皮膚培養マスト細胞のSPに対する応答性の責任受容体であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chronic urticaria is characterized by the occurrence of the spontaneous emergence of wheals and a flare reaction lasting for more than 4 weeks, which is so called chronic spontaneous urticaria (CSU). Its pathogenesis is still unclear, while part of it is involved with autoimmunity. Several activation factors which are independent of IgE-allergen pathway are supposed, and substance P (SP) is one of them. In this study, firstly we identified that anti-Fc RI antibody is able to detect by ELISA and which titer is higher in sever CSU patients which symptoms were continuous without medication. Secondary, we identify that expression of MrgX2 in skin mast cells of patients with CSU are significantly greater than those in NC subjects, and SP induce skin mast cell activation through MrgX2.

研究分野：皮膚科

キーワード：蕁麻疹 マスト細胞 Fc RI MrgX2

1. 研究開始当初の背景

慢性蕁麻疹とは明らかな直接的誘因なく紅斑と膨疹の出没を繰り返す蕁麻疹のうち発症後4週以上継続したタイプを言う。その中で自己血清皮内テスト(ASST)が陽性であるものを自己免疫性蕁麻疹と定義している。現在までにマスト細胞からの脱顆粒を惹起する自己抗体として抗FcεRIα鎖抗体、抗IgE抗体の2種類が同定されている。これら自己抗体がヒト皮膚マスト細胞上に発現しているFcεRIを架橋することによりヒスタミンやアラキドン酸代謝産物、サイトカインが遊離されることが膨疹形成の機序と考えられている。これまでの実験で我々はELISA法を用いて抗FcεRIα鎖抗体の定量を行った。その結果、患者群と健常群では患者群の方が抗体価の平均値は高かったが統計学的な有意差はなく、自己血清皮内テストの陽性群と陰性群でも抗体価に有意な差はなかった。このことから抗FcεRIα鎖抗体には活性型と不活性型が存在すると考えられ、慢性蕁麻疹患者及び健常人から精製した抗FcεRIα鎖抗体をヒトマスト細胞に添加したところ、患者の抗体では脱顆粒を惹起できるものがあった。以上のように自己免疫性蕁麻疹においても抗FcεRIα鎖抗体の役割は不明な点が多い。

また前述のごとく慢性蕁麻疹の一部は自己免疫性と考えられているが、大半が特異性に分類される。アレルゲン-IgE系を介した刺激以外にもマスト細胞の刺激因子が多数想定されており、神経ペプチドの一種であるサブスタンスP(SP)も刺激因子の一つとして知られている。実際、慢性蕁麻疹の病変部でサブスタンスP濃度が有意に上昇しているという報告がある。近年、SPの受容体としてMrgX2が同定された。我々はMrgX2がヒト皮膚マスト細胞に発現していることを確認した。このことから慢性蕁麻疹の病態の一部にはサブスタンスPが関与していることが示唆される。

2. 研究の目的

前回までの研究で抗FcεRIα鎖抗体のアッセイ系は確立されている。慢性蕁麻疹患者と健常人でみられる抗FcεRIα鎖抗体の量に差がないので、活型と不活性型が存在することを示唆する。そこで本研究では特異性慢性蕁麻疹(CSU)患者のどれ位の患者に抗FcεRIα鎖抗が関係しているのかを調べる。もし関係が明らかになったら抗FcεRIα鎖抗を有する患者と有しない患者で皮疹の形態・重症度・持続時間あるいは抗ヒスタミン剤を中心とする標準治療に対する反応性に違いがないかどうかを明らかにしたい。

また以前我々は神経ペプチドの受容体であるMrgX2が皮膚マスト細胞上に発現していることを報告している。慢性蕁麻疹患者において神経ペプチドが関与しているか、また関与していればその作用について解析したい。

3. 研究の方法

[抗FcεRIα鎖抗体の解析]

対象:CSU患者121名の末梢血を遠心分離し血清を採取した。コントロールとしてNC56名から血清を採取した。全ての血清からprotenova®のAb-Rapid SPiN EXを用いてIgGを精製した。

ELISA:可溶性α鎖蛋白質を固相化し抗α鎖自己抗体価を測定した。血清と精製IgGを用いて検討した。

FC:細胞膜上にFcεRIα鎖を発現するCHO細胞を用いて測定した。精製IgGを用いて検討した。

ELISA、FC共にASSTの結果との関連についても解析した。臨床的特徴との関連については、Mann-Whitney-U testまたはFisher's exact testで解析した。

[MrgX2の解析]

対象:慢性蕁麻疹患者9人の病変部より皮膚生検を行ない、またコントロールとしては植皮術に用いた13人の正常皮膚の植皮片余剰部位を用いた。

細胞:ヒト皮膚組織より細胞を分離し、SCF存在下にメチルセルロースを用いて約10週~12週培養した培養皮膚マスト細胞を用いた。

蛋白発現解析:MrgX2発現はフローサイトメーターと免疫組織染色で

検討した。

マスト細胞機能解析:EIA法でヒスタミン遊離とPGD2産生を評価した。

遺伝子発現抑制:MrgX2をターゲットとしたshRNAはレンチウイルスのベクターを用いて導入した。

4. 研究成果

[抗FcεRIα鎖抗体の解析]

ELISAとFCによる健常人とCSU患者の比較

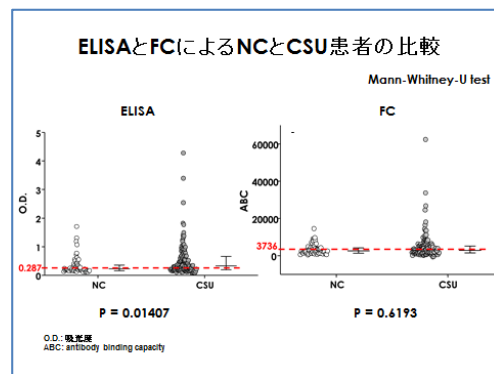


図1

以前、我々はELISA法で抗FcεRIα鎖抗体の測定に成功している。しかし、この方法は抗原の固相化が必要であり、煩雑である。そこで固相化を必要としない細胞膜表面上に発現している膜型のα鎖蛋白質を利用するFCを利用した方法を使用して抗FcεRIα鎖抗

体の測定が可能かを調べた。その結果、ELISA法では有意差がみられたが、FC法では有意差がみられなかった。(図1) また、ASST陽性患者とASST陰性患者で分類したが、有意差は見られなかった。(図2) 以前の研究ではELISA法では有意差がみられなかったが、本研究では有意差がみられた。これはn数が増えたためと考えられた。

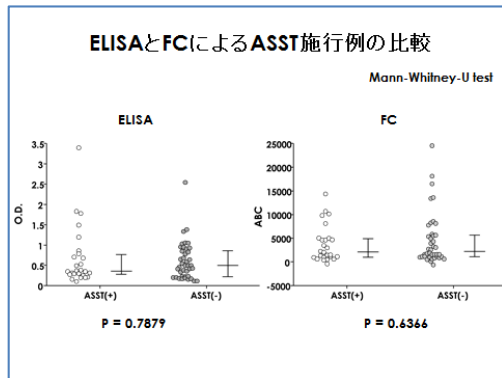


図2

次に患者の臨床症状との相関を調べた。前述のごとくELISAで解析した抗FcεRIα鎖抗体はCSU患者の方が健常者よりも有意に高かったが、FCによる解析では両群間に有意差はなかった。さらに抗体価のカットオフ値以上の群とカットオフ値未満の群で比較した場合、ELISA、FC共にカットオフ値以上の群において持続型CSU(治療により症状が軽減するが完全に消失せず、抗ヒスタミン剤内服などの治療をstep downすると再燃する型)が有意に多かった($p < 0.05$)。一方、ELISA、FC共にカットオフ値未満の群において再燃型(治療により症状がほぼ出現しなくなるが治療をstep downすると再燃する型)が有意に多かった($p < 0.05$)。罹患年数やASSTの結果と抗FcεRIα鎖抗体の間に相関性はなかった。

以上の結果からELISAによる抗FcεRIα鎖抗体の解析は結合するエピトープに影響が出る可能性があり、FCの膜型のα鎖蛋白質と結合できるα鎖自己抗体が異なっている可能性があることが示唆された。また臨床型の解析からは抗FcεRIα鎖抗体価が蕁麻疹の臨床型と相関している可能性が示唆された。さらにASSTの結果と臨床型は相関しないことが示された。

[MrgX2の解析]

我々は以前の研究でヒト皮膚マスト細胞にMrgX2が発現していることを報告している。次にこの受容体がCSUの病態に影響しているかを調べた。CSU患者の病変部位と健常人の皮膚を比較した。その結果、健常人皮膚組織と比較して、CSUの病変部のMrgX2陽性マスト細胞数の上昇がみられた。(図3)

次にMrgX2の機能を明らかにする目的でサブスタンスP刺激によるMrgX2を介したヒト皮膚マスト細胞の活性化があるかどうかを確かめるためにヒスタミン遊離とPGD₂産生を調べた。(図4)

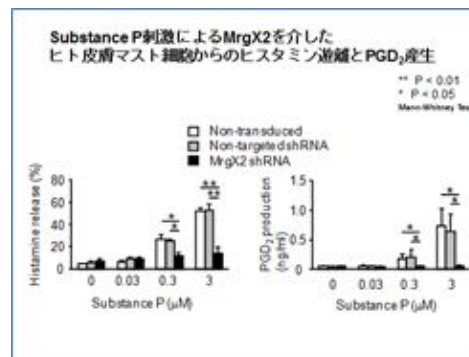


図3

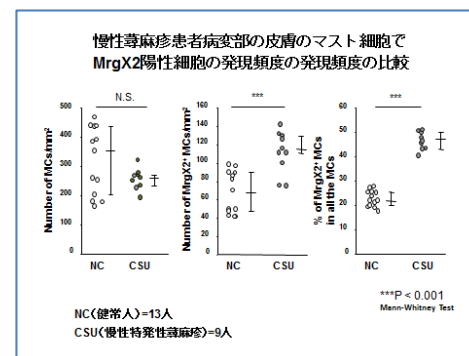


図4

ヒト皮膚マスト細胞上のMrgX2の発現が抑制されたマスト細胞では未処理のマスト細胞、コントロールのshRNAが導入された細胞に比べてSP刺激で左図ヒスタミン放出と右図プロスタグランジン産生が有意に低下していた。以上よりSPがMrgX2を介してヒト皮膚培養マスト細胞の活性化を誘導していることが示唆された。

また、蕁麻疹の患者の皮膚では好酸球の浸潤がみられることがある。実際に我々は患者の皮膚の組織染色にて好酸球が浸潤していることを確認している。マスト細胞は塩基性好酸球顆粒蛋白 major basic protein (MBP)、eosinophil peroxidase (EPO)で刺激され脱顆粒することが知られている。我々はこの反応にMrgX2が関与するかどうかを調べた。shRNAを導入しMrgX2の発現を抑制した細胞においてMBP、EPO、EDNによる脱顆粒が有意に抑制されたことから、MrgX2がこの反応の責任受容体であることが示された。(図5)

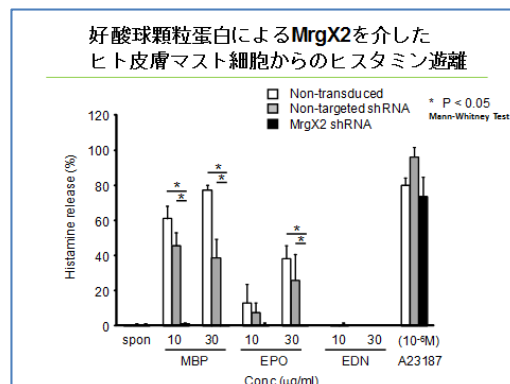


図5

以上より CSU 病変部 MC で MrgX2 の発現が上昇し、MrgX2 がヒト皮膚培養マスト細胞の SP や MBP、EPO に対する応答性の責任受容体であることを明らかにした。MrgX2 は CSU 治療の新たな分子標的になりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Nunomura S, Okayama Y, Matsumoto K, Hashimoto N, Endo-Umeda K, Terui T, Makishima M, Ra C, Activation of LXRs using the synthetic agonist GW3965 represses the production of pro-inflammatory cytokines by murine mast cells. *Allergol Int.* (査読あり)2015;64 Suppl: S11-7.
DOI: 10.1016/j.alit.2015.03.001.
2. Nunomura S, Okayama Y, Terui T, Ra C. Treatment of murine mast cells with IgE_k and protein L enhances apoptotic cell death induced by IL-3 withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読あり)2015; 456: 700-5.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.045.
3. Nunomura S, Ohtsubo-Yoshioka M, Okayama Y, Terui T, Ra C. FcR_γ promotes contact hypersensitivity to oxazolone without affecting the contact sensitisation process in B6 mice. *Exp Dermatol.* (査読あり) 2015 ; 24: 204-8.
DOI: 10.1111/exd.12622.
4. 葉山惟大, 照井 正. 慢性蕁麻疹と自己抗体. *臨床免疫・アレルギー科.* (査読なし)2015; 64: 255-260.
DOI:なし
5. 葉山惟大, 照井 正. 【皮膚アレルギーの診断と治療】 蕁麻疹. *医学と薬学*(査読なし) 2015; 72: 1667-1673.
DOI:なし
6. Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, Kuroda K, Nunomura S, Hayama K, Terui T, Ra C, Okayama Y. Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* (査読あり) 2014 Sep;134(3):622-633.e9.
DOI: 10.1016/j.jaci.2014.05.004.
7. Hatada Y, Kashiwakura J, Hayama K, Fujisawa D, Sasaki-Sakamoto T, Terui T, Ra C, Okayama Y. Significantly

high levels of anti-dsDNA immunoglobulin E in sera and the ability of dsDNA to induce the degranulation of basophils from chronic urticaria patients. *Int Arch Allergy Immunol.* (査読あり) 2013; 161 Suppl 2: 154-8.

DOI: 10.1159/000350388.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Izaki S, Nunomura S, Hayama K, Fujisawa D, Hatada Y, Fujita H, Ra C, Okayama Y, Terui T. Usefulness of anti-FcεRIα autoantibody to predict clinical course in chronic spontaneous urticaria. 日本研究皮膚科学会第 40 回年次学術大会・総会 2015 12/11-13 (岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター)
2. Hayama K, Izaki S, Nunomura S, Fujisawa D, Hatada Y, Fujita H, Ra C, Okayama Y, Terui T. Usefulness of flow cytometry measurement of reactivity between FcεRIα on gene-transfected CHO cells and its autoantibody in chronic spontaneous urticaria. 23rd World Congress of Dermatology 2015 6/8-13 (Vancouver, Canada)
3. 藤澤大輔, 柏倉淳一, 布村聡, 紀太博仁, 菊川裕介, 藤谷靖志, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 照井 正, 羅 智靖, 岡山吉道. 皮膚マスト細胞における Mas-related gene X2 について. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015 5/26-28 (東京都、港区、グランドプリンスホテル新高輪)
4. 伊崎聡志, 布村 聡、藤澤大輔、畠田優子、葉山惟大、藤田英樹、羅 智靖、岡山吉道、照井 正. 細胞膜発現 FcεRIα 鎖蛋白との反応性を利用した抗 FcεRIα 鎖抗体検出法の慢性蕁麻疹患者における有用性. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015 5/26-28 (東京都、港区、グランドプリンスホテル新高輪)
5. Fujisawa D, Hayama K, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, Kuroda K, Nunomura S, Ra C, Okayama Y, Terui T : Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the patients with severe chronic spontaneous urticaria. 日本研究皮膚科学会第 39 回年次学術大会・総会 2014 12/12-14 (大阪府、吹田市、ホテル阪急エキスポパーク)
6. 葉山惟大. マスト細胞から考える蕁麻疹の治療戦略. 第 77 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 2014 2/15-16 (東京都、千

- 代田区、東京国際フォーラム)
7. 藤澤大輔, 岡山吉道, 柏倉淳一, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 羅智靖, 紀太博仁, 照井 正: MrgX2 を介したヒト皮膚マスト細胞の脱顆粒. 第 77 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 2014 2/15-16 (東京都、千代田区、東京国際フォーラム)
 8. 畠田優子, 岡山吉道, 柏倉淳一, 葉山惟大, 藤澤大輔, 坂本朋美, 羅智靖, 照井 正. 抗 dsDNA IgE 抗体価の慢性蕁麻疹患者血中での有意な増加. 第 77 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 2014 2/15-16 (東京都、千代田区、東京国際フォーラム)
 9. 藤澤大輔, 照井 正, 柏倉淳一, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 布村聡, 下川敏文, 羅智靖, 紀太博仁, 岡山吉道. 好中球顆粒蛋白はヒト皮膚マスト細胞に発現している MrgX2 を介して脱顆粒を惹起する. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013 11/28-30 (東京都、港区、ホテルニューオタニ)
 10. 畠田優子, 照井 正, 葉山惟大, 柏倉淳一, 坂本朋美, 藤澤大輔, 下川敏文, 布村聡, 羅智靖, 岡山吉道. 慢性蕁麻疹患者における血中抗 dsDNA IgE 抗体価の有意な増加(続報). 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013 11/28-30 (東京都、港区、ホテルニューオタニ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照井 正 (TERUI, Tadashi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 30172109

(2) 研究分担者

岡山 吉道 (OKAYAMA, Yoshimiti)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 80292605

葉山 惟大 (HAYAMA, Koremasa)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 80292605

(3) 連携研究者

()

研究者番号: