46　アレルギーの多様性を担うアレルゲン親和性の役割	鈴木　亮

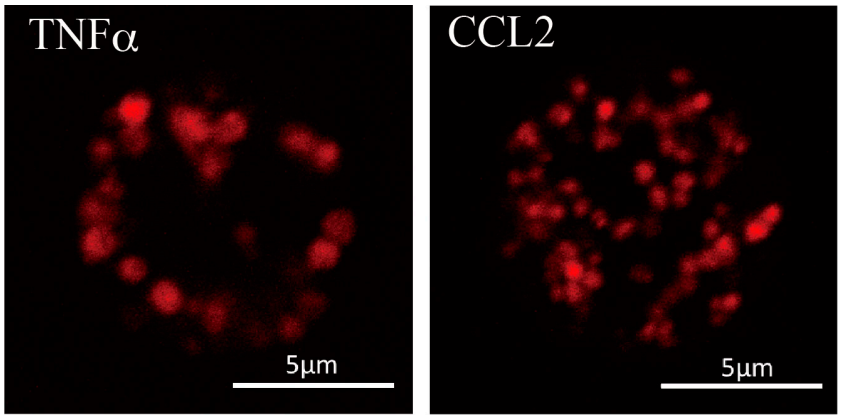
【目的】花粉症、アトピー性皮膚炎、喘息などのアレルギー疾患は、国民の半数以上が何らかのアレルギー症状を示しているにもかかわらず、その根治療法は未だ確立されていないのが現状である。その要因の一つとして、発症部位、病態、重症度など、アレルギー反応が示す多様性が挙げられる。これらアレルギー疾患には、マスト細胞が中心的な役割を担い、アレルゲン、アレルゲン特異的 Immunoglobulin E（IgE）、IgE 受容体（FcεRI）の 3 者の関係が、IgE 受容体の活性化調節をはじめ多様性制御に重要な役割を担っていると考えられる。そのような中、我々はアレルゲン親和性がアレルギー反応の「強弱」だけでなく「質的」にも異なるアレルギー応答を示すことを明らかにした。

本研究では、先に得られた研究成果をさらに発展・展開し、個々の分泌顆粒の不均質性とその分泌制御メカニズム、また、アレルゲン親和性特異的に誘導される浸潤細胞とマスト細胞の相互作用など、アレルギー反応における各ステップでの分子メカニズムを追究することによって、アレルギーの多様性制御メカニズムを明らかにすることを試みた。

【方法】本研究では、骨髄由来マスト細胞やマウス耳介組織、そして相互作用の解析には骨髄好中球を用いた。骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞をサイトカイン存在下で培養・分化させたものを用いた。また、骨髄好中球の単離・精製は、骨髄細胞の密度勾配遠心法により行った。画像解析機器としては、共焦点レーザ顕微鏡（Carl Zeiss LSM-510、LSM-800）、走査型（HITACHI、S-4300）及び透過型電子顕微鏡（HITACHI、H-7600）を用いた。

【結果】アレルゲンと IgE の親和性によって、分泌するサイトカイン（高親和性アレルゲン）やケモカイン（低親和性アレルゲン）の種類が厳密に制御されていることが明らかになった。このことから、外来アレルゲン情報によって複雑な分泌反応が誘導されることによって、多様性なアレルギー反応が誘導されている可能性が示唆された。本研究では、単一分泌顆粒レベルでの分泌制御機構を追究し、個々の分泌顆粒には特異的なケミカルメディエータや分泌機能蛋白質 SNARE（soluble NSF attachment protein receptor）が局在していることが明らかになった。また、多様性の一因と考えられるアレルゲン親和性選択的な浸潤細胞（ここでは好中球）とマスト細胞の相互作用についても独自の共存培養システムを構築し追究した。アレルゲンによってアレルギー反応を誘導したマスト細胞では、脱顆粒反応（ケミカルメディエータの開口放出）が誘導され、それに伴って浸潤細胞（好中球）がマスト細胞と相互作用していることが明らかになった。さらに、マスト細胞と好中球は、接着部位を介して細胞間シグナル伝達を行っていることが、両者の生細胞カルシウムイメージングをはじめとする画像解析によって明らかになった。

マスト細胞の分泌顆粒の不均質性



46. アレルギーの多様性を担うアレルゲン親和性の役割

鈴木　亮

*名古屋市立大学 大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野

Key words：アレルギー，マスト細胞，アレルゲン，Immunoglobulin E，アフィニティー

緒　言

花粉症、アトピー性皮膚炎、喘息などのアレルギー疾患は、国民の半数以上が、何らかのアレルギー症状を示しているにもかかわらず、その根治療法は未だ確立されていないのが現状である。

その要因の一つとして、アレルギー反応が示す多様性が挙げられる。アレルギー疾患は、発症部位（鼻、皮膚、腸、気管支など）、病態（発疹、浮腫、瘙痒など）、重症度（軽微、ショックなど）など、極めて多様な疾患症状を示す。さらに、アレルギー疾患の多くは、幼児、成人、高齢者といった成長・加齢により多様な病状変化を伴うため、疾患の複雑化・慢性化を招いている。このようにアレルギー反応が示す多様性の分子メカニズムを解明し、その実体を明らかにすることは、新たな治療戦略を確立する上で極めて重要であると考えられる。

上述した様々なアレルギー疾患には、マスト細胞が重要な役割を担っている。マスト細胞の細胞膜上には、Immunoglobulin E（IgE）受容体（FcεRI）が発現し、アレルゲン特異的 IgE と結合している。アレルゲンが IgE を介して IgE 受容体を架橋すると、細胞内シグナル伝達経路の活性化とヒスタミンを始めとする炎症性メディエータの分泌反応が亢進し、その結果アレルギー反応が惹起される（図 1）。この様に、マスト細胞の活性化やアレルギー応答の決定には細胞外のアレルゲン情報を細胞内に伝達する過程、すなわちアレルゲン、アレルゲン特異的 IgE、そして IgE 受容体の 3 者の関係による、IgE 受容体の活性化制御が重要な役割を担っている［1］。



図 1. アレルゲンによるマスト細胞の活性化と分泌反応

アレルゲンがアレルゲン特異的 IgE を介して IgE 受容体を活性化すると、受容体の活性化、シグナル伝達を経てケミカルメディエータの分泌反応（脱顆粒反応）が誘導される。

末梢血中 IgE 量やアレルゲン特異的 IgE 量は、アレルギー診断において重要な役割を担っている。しかしながら、臨床現場では、必ずしも末梢血中 IgE 量やアレルゲン特異的 IgE 量と疾患症状が一致しない場合も数多く見受けられるのが現状である。

*現在の所属：金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 衛生化学研究室

そのような中、IgE 受容体の活性化状態を制御する要因の一つとして、アレルゲンとアレルゲン特異的 IgE の親和性が、マスト細胞の活性化やアレルギー反応の多様性に重要な役割を担うのではないかと考え、親和性の異なるアレルゲンや独自の研究システムを作製し、アレルゲン親和性がアレルギー炎症反応の「強弱」だけでなく「質的」にも異なるアレルギー応答を示すことを明らかにした［2］。

本研究では、先に得られた研究成果をさらに発展・展開することによって数多くの新たな知見を得た。具体的には、アレルゲン親和性に依存的に分泌されるケミカルメディエータに違いが観られたことから、個々の分泌顆粒内のメディエータに着目したところ、個々の分泌顆粒には不均質性が存在していることが明らかになった。また、親和性の異なるアレルゲンによって浸潤する免疫細胞の種類に違いが生じていることから、これら浸潤細胞とマスト細胞の相互作用について追究した結果、ダイナミックな相互作用が観察され、浸潤細胞とマスト細胞の相互作用がアレルギー反応の多様性に関与している可能性が示唆された。

方　法

1. 骨髄由来マスト細胞の分化と骨髄好中球の単離・精製方法

骨髄由来マスト細胞はマウス大腿骨から骨髄細胞を採取し Interleukin-3、stem cell factor の存在下で 1 ヶ月間培養しマスト細胞に分化させた。骨髄好中球はマウス骨髄細胞を密度勾配遠心分画法により単離・精製した。骨髄由来マスト細胞や骨髄好中球の確認には、フローサイトメータを用い、マーカー蛋白質の発現解析により行った［3～4］。

2. 顕微光学法による画像解析

単一顆粒レベルでの分泌顆粒の画像解析には、骨髄由来マスト細胞及びマウス耳介組織を用いた。各種目的蛋白質の検出には、目的蛋白質と蛍光蛋白質とのキメラ蛋白質や特異的抗体を用いた免疫染色法により行った。また、共存培養システムを用いた解析では、骨髄由来マスト細胞と骨髄好中球をマトリゲルコートディッシュ上で共存培養し、実験に用いた。共存培養した骨髄由来マスト細胞を抗 DNP（Dinitrophenyl）-IgE 抗体で感作し、抗原（DNP-HSA）で特異的に刺激し、アレルギー反応に伴う細胞間相互作用を追究した。画像解析には、共焦点レーザ顕微鏡（Carl Zeiss LSM-510、LSM-800）、走査型（HITACHI、S-4300）及び透過型電子顕微鏡（HITACHI、H-7600）を用いた。

結果および考察

1. アレルギーの多様性における分泌顆粒の不均質性の解析

アレルゲン親和性が、分泌するサイトカイン（高親和性アレルゲン）やケモカイン（低親和性アレルゲン）の種類を厳密に制御していることが明らかになっている。このことから、外来アレルゲン情報によって複雑な分泌反応が誘導されており、その結果として多様性なアレルギー反応が誘導されている可能性が示唆された。これら多様な分泌反応の一因として、個々の分泌顆粒に含まれるケミカルメディエータに違いが生じているのではないかと考えた。そこで、TNFαや CCL2 と各種蛍光蛋白質のキメラ蛋白質や特異的抗体を用いた免疫染色法による画像解析を行った。その結果、TNFαと CCL2 は細胞内で異なる分泌顆粒に存在している様子が観察された（図 2A）。また、TNFαを含む分泌顆粒は、CCL2 が含まれる分泌顆粒と比較して、顆粒サイズが有意に大きいことが明らかになった（図 2B）。さらに、マスト細胞の開口放出に関与すると考えられている分泌機能蛋白質 SNARE の一種である VAMP（Vesicle Associated Membrane Protein）の異なるサブタイプについて、個々の分泌顆粒における VAMP の局在解析を行った。その結果、TNFαや CCL2 を含む分泌顆粒では、それぞれ異なるサブタイプの VAMP と共局在していることが明らかになった。

次に、生体組織内に存在するマスト細胞においても、先に観察されたような個々の分泌顆粒で異なる分泌機能蛋白質が局在しているかどうかについて追究した。ここでは、目的組織を切片処理やパラフィン処理をせずに直接染色することが可能なホールマウント法を用いた。ホールマウント法によりマウス耳介組織の 3 次元組織イメージング解析を行ったところ、生体組織内におけるマスト細胞においても、*in vitro* 研究で観察されたようにサブタイプの異なる VAMP で、局在が異なっている様子が観察された。さらに、サブタイプの異なる VAMP を発現する分泌顆粒の顆粒サイズについて追究したところ、異なる VAMP が発現する分泌顆粒サイズには有意に違いが存在することが明らかになった。この

ことから、マスト細胞では、単一分泌顆粒レベルで開口放出が制御され、外来アレルゲン情報によって多様に分泌反応が制御されている可能性が示唆された。

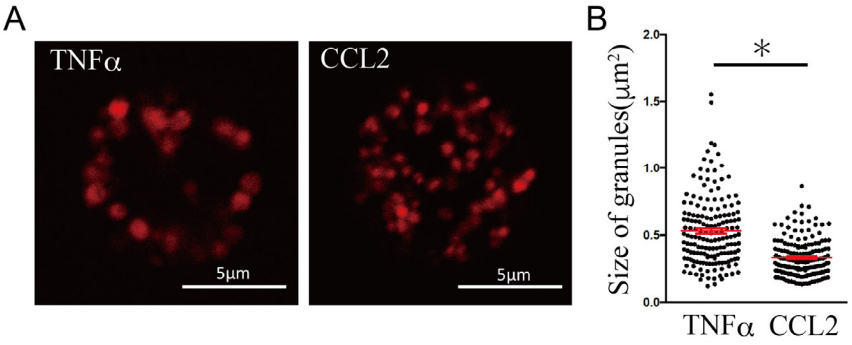


図 2. マスト細胞における分泌顆粒の不均質性

マスト細胞における TNFαや CCL2 の分布及び分泌顆粒サイズ。A）TNFαや CCL2 と蛍光蛋白質のキメラ蛋白質を発現しているマスト細胞における TNFαや CCL2 の分布。B）図 A で観察した分泌顆粒においてそれぞれの分泌顆粒サイズを測定した。（Student's t-test, *p ＜ 0.05）

2. *In vitro* 共存培養システムを用いた細胞間相互作用の解析

我々の研究から、アレルゲン親和性に特異的な浸潤細胞がアレルギー疾患の病態を制御していることが明らかになった。特に、高親和性アレルゲンの場合には好中球が有意にアレルギー炎症部位浸潤しマスト細胞と相互作用しており、両者の相互作用がアレルギー応答を制御している可能性が示唆された。ここでは、マスト細胞と好中球との相互作用を追究するため、マウス骨髄由来マスト細胞と骨髄好中球を用いた *in vitro* 共存培養システムの確立を試みた。マウス骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞から分化させた骨髄由来マスト細胞を用いた。骨髄細胞を、SCF 及び IL-3 の存在下で 1 ヶ月間培養することで骨髄由来マスト細胞を得た。また、マウス骨髄好中球の単離・精製には、マウス大腿骨の骨髄細胞について Percoll を用いた密度勾配遠心分画法により行った［5］。

先の方法で得たマスト細胞と好中球を共存培養すると、どちらの細胞も球形をしており、好中球（~7 μm）は、マスト細胞（~12 μm）と比較して、やや小さいことが分かった。アレルギー反応に伴う両者の相互作用を追究するため、マスト細胞をアレルゲンで特異的に刺激した。アレルゲンによって活性化されたマスト細胞では、脱顆粒反応（ケミカルメディエータの開口放出）が誘導され、それに伴う形質膜の波打現象（ラッフリング）が観察された。その後、球形をしていた好中球が、紡錘形に変化しマスト細胞の方向へ移動し、脱顆粒をしているマスト細胞と相互作用（接着）している様子が観察された。

細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、マスト細胞において脱顆粒反応による各種メディエータ放出に関与し、好中球においては細胞の遊走に重要な役割を担っている［6〜7］。そこで、マスト細胞と好中球の細胞内カルシウムイオン動態に着目し、両細胞間の情報伝達機構を追究した。アレルゲンでマスト細胞を特異的に刺激すると、はじめにマスト細胞でカルシウムイオン濃度が上昇し、その後、好中球がマスト細胞の方向に向かって遊走し、マスト細胞に接着する様子が観察された。そして、マスト細胞と接着した好中球において一過的に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇している様子が観察された（Data not shown）。このことから、マスト細胞と好中球が相互作用（接着）した結果、好中球で細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が誘導されている可能性が示唆された。現時点では、これら相互作用に伴うカルシウムイオン動態変化に関する分子メカニズムや生理的役割については不明であるが、慎重に検討中である。次に、走査型及び透過型電子顕微鏡を用いた解析では、マスト細胞と好中球の接着形態についてより詳細に追究した。はじめに走査型電子顕微鏡を用いて接着形態を観察したところ、紡錘形をした好中球とマスト細胞に密接に接着している様子が観察された（図 3）。また、透過型電子顕微鏡を用いた解析では、好中球がマスト細胞から分泌された顆粒内物質を貪食している様子が観察された（Data not shown）。このことは、好中球がマスト細胞から放出された炎症性メディエータを貪食しアレルギー炎症応答を制御している可能性が示唆された。

以上のように、本研究で明らかになったマスト細胞の分泌顆粒の不均質性や細胞間相互作用についての研究成果は、

アレルギー反応の実体を明らかにする上で重要な情報を提供するものであり、多様なアレルギー疾患への治療戦略を構築する上でその一助となると考えられる。

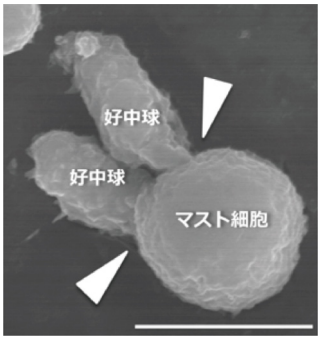


図 3. 骨髄由来マスト細胞のアレルゲン刺激応答に伴う骨髄好中球の相互作用
アレルゲンで活性化され脱顆粒したマスト細胞に複数の好中球が集積し相互作用している。矢頭の部分で両者が接着している（scale bar = 10 μm）。

共同研究者・謝辞

本研究を行うにあたり、名古屋市立大学大学院薬学研究科生体超分子システム解析学分野の平嶋尚英教授に感謝申し上げます。

文　献

1) Suzuki R, The Emerging Picture of Mast Cell Activation: The Complex Regulatory Network of High-Affinity Receptor for Immunoglobulin E Signaling. Biol Pharm Bull. 2017;40(11):1828-1832. doi: 10.1248/bpb.b17-00465.
2) Suzuki R, Leach S, Liu W, Ralston E, Scheffel J, Zhang W, Lowell CA, Rivera J. Molecular editing of cellular responses by the high-affinity receptor for IgE. Science. 2014 Feb 28;343(6174):1021-5. doi: 10.1126/science.1246976.
3) Suzuki R, Liu X, Olivera A, Aguiniga L, Yamashita Y, Blank U, Ambudkar I, Rivera J. Loss of TRPC1-mediated Ca2+ influx contributes to impaired degranulation in Fyn-deficient mouse bone marrow-derived mast cells. J Leukoc Biol. 2010 Nov;88(5):863-75. doi: 10.1189/jlb.0510253.
4) Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. J Leukoc Biol. 2013 Oct;94(4):585-94. doi: 10.1189/jlb.0113014.
5) Lämmermann T, Afonso PV, Angermann BR, Wang JM, Kastenmüller W, Parent CA, Germain RN. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. Nature. 2013 Jun 20;498(7454):371-5. doi: 10.1038/nature12175.
6) Ikeya M, Yamanoue K, Mochizuki Y, Konishi H, Tadokoro S, Tanaka M, Suzuki R, Hirashima N. Orai-2 is localized on secretory granules and regulates antigen-evoked Ca^{2+} mobilization and exocytosis in mast cells. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Aug 15;451(1):62-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.060.
7) Jaconi ME, Rivest RW, Schlegel W, Wollheim CB, Pittet D, Lew PD. Spontaneous and chemoattractant-induced oscillations of cytosolic free calcium in single adherent human neutrophils. J Biol Chem. 1988 Aug 5;263(22):10557-60. PMID:3392026