

<研究課題> アレルゲン親和性に着目した高齢者アレルギー疾患の原因究明と診断法の開発

代表研究者 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 講師 鈴木 亮
共同研究者 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授 平嶋尚英

【まとめ】

高度高齢化社会を向かえている我が国において、高齢者の健康維持・増進は、社会的関心事である。これまで加齢免疫学研究は、感染症・ガンが中心であり、高齢者アレルギーに関しては、十分な研究がなされていない。本研究では、加齢マウスを用いた研究から、アレルギー反応を担うマスト細胞が、加齢によって恒常的に活性化されていることが分かった。このことから、加齢によるアレルゲン非依存的なマスト細胞活性化機構の存在が示唆された。

1. 研究の目的

我が国は、急速に高度高齢化社会を向かえている。このような社会状況の中、高齢者の健康維持・増進は、大きな社会的関心事である。近年、「Immunosenescence（免疫老化）」という言葉が、多く語られるようになり、加齢に関する様々な研究が盛んに行なわれはじめている。特に加齢に伴う免疫組織の萎縮など、加齢が免疫機能を低下させることが徐々に明らかになりつつある。これら免疫機能の低下が、感染症の増加やガン発症率の増大といった、様々な疾患の一因であると推察されている。このように、加齢に伴うガンや感染症の発症要因が明らかになりつつある。一方で、高齢者アレルギー疾患に関しては、加齢に伴う Immunoglobulin E (IgE) 量の減少、抗原特異性の変化、患者アレルギーテストへの反応性の減弱など、アレルギー疾患に関しては、加齢に伴って緩和・治癒するとの錯覚がなされてきた。ところが実際の臨床・介護現場においては、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物・薬物アレルギー、そして喘息など、高齢者は様々なアレルギー疾患を発症しており、それらの多くは慢性化・難治化しているのが現状である。このような高齢者アレルギーは、発症原因も未だ不明な点も多く、根治療法も存在しないため、大きな社会問題になっている。このように、多くの点で若年アレルギーとは異なる、高齢者アレルギーに特化した診断方法や治療法の確立が急務である。

ところが、加齢免疫学研究（特に高齢者ア

レルギー研究）は、動物モデルを作製に要する時間や費用の問題、また複雑かつ多様な要因のため得られた結果の解釈が難しいなど、未だ十分に実施されていないのが現状である。

先述した様々なアレルギー疾患の発症には、マスト細胞が重要な役割を担っている。また、アレルゲン（抗原）によってマスト細胞が活性化しアレルギー反応を惹起するためには IgE が重要である。IgE は、アレルゲン情報を IgE 受容体 (FcεRI) を介して、マスト細胞に伝達することでアレルゲン情報特異的にマスト細胞の活性化が誘導され、様々なアレルギー疾患が惹起される（図1）。



図1 アレルゲンによるマスト細胞応答制御
アレルギー疾患発症に重要な役割を担うマスト細胞は、IgE・IgE 受容体複合体 (FcεRI) を介してアレルゲン情報を細胞内に伝達し、アレルゲン特異的シグナル伝達経路を活性化し、選択的分泌反応を制御することによって、異なるアレルギー応答を誘導する。

そこで、IgE 量やアレルギーテスト反応性など、多くの点において若年性アレルギー疾患とは異なる高齢者アレルギーの発症原因と新たな治療方法を確立するため、これまでのアレルギー診断基準であった「アレルゲン特異的 IgE の量」という指標に加え、我々の研究から明らかになった「新たなアレルギー疾患症状の決定因子であるアレルゲン親和性」の影響を追究することによって、複雑な高齢者アレルギー疾患の原因究明を目指す。

本研究は、若年マウスと加齢マウスの様々な組織やマスト細胞に着目し、それらの加齢に伴う影響を追究し、高齢者アレルギー疾患の原因を明らかにしようとするものである。

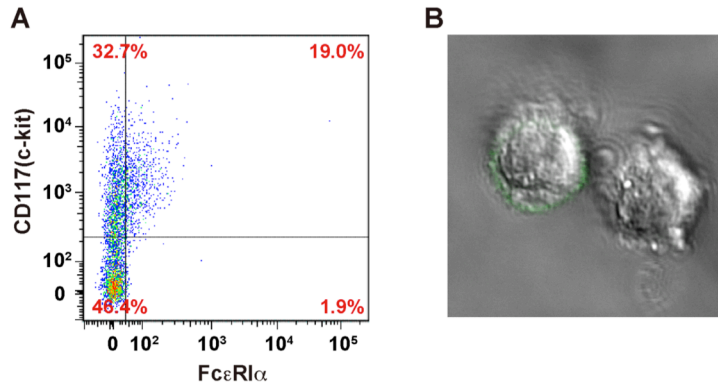


図2 マウス腹腔におけるマスト細胞
(A) マウス腹腔におけるマスト細胞 (FcεRIα⁺, CD117⁺) の確認 (B) 密度勾配遠心法を用いて精製したマスト細胞におけるマーカー蛋白質 (矢印: FcεRIα⁺) による確認

2. 研究方法と経過

2-1 マスト細胞の単離・精製方法の確立

マスト細胞の加齢に伴う変化を追究するため、若年マウス (<3 ヶ月齢) 及び加齢マウス (>12 ヶ月齢) の腹腔からのマスト細胞の単離・精製条件の検討を行った。単離・精製には Kovarova (Kovarova M., *Methods Mol Biol.*, 1032:109-119. (2013)) によって報告されている方法を参考にした。若年・加齢マウスの腹腔から、無菌操作下で腹腔洗浄液を回収した。その後、回収した腹腔洗浄液は 70% Percoll 上に積層し、15 分間遠心処理 (700 xg) を行った。先述の Percoll 密度勾配遠心法により、マウス腹腔洗浄液から単離・精製を行った腹腔マスト細胞の確認には、マスト細胞のマーカー蛋白質である FcεRIα、CD117 を用いた。また、それらの検出には、フローサイトメータ及び共焦点レーザー顕微鏡により行った。

2-2 マウス組織における加齢細胞の検出

様々なマウス組織での老化細胞の検出には、老化細胞を検出マーカーとして用いられている Senescence-Associated β-Galactosidase (SA β-Gal) の細胞内での発現量を指標に行った。SA β-Gal の検出には、GlycoYELLOW™-β-Gal (五稜化薬) を用い、各組織の凍結組織切片の作製及び染色をした後、老化細胞の検出を行った。

2-3 マウス組織におけるマスト細胞の検出

組織におけるマスト細胞の分布や活性化状態の形態学的観察には、各種蛍光色素で標識した Avidin を用いた。Avidin を用いたマスト細胞活性化状態の観察には、共焦点レーザー顕微鏡を用いた Avidin 陽性細胞の組織内での形態を観察することによって、活性化 (脱顆粒) 状態の指標とした。

3. 研究の成果

3-1 腹腔マスト細胞の単離方法の確立

加齢に伴うアレルギー疾患の発症機構を追究するため、若年及び加齢マウスの腹腔に存在する腹腔マスト細胞の単離及び精製条件の検討を行った。我々は、これまでラットの腹腔マスト細胞の単離・精製方法に関しては既に確立しているが、今回は、マスト細胞機能の加齢による影響を追究するため、末梢組織で分化・成熟したマウスマスト細胞を使用する必要性があった。そこで本研究では、総取得細胞数などの問題から難しいとされていた、マウス腹腔マスト細胞の単離・精製方法の検討を行った。そのため初期段階として、マウス腹腔内でのマスト細胞の同定を行った。マウス腹腔の洗浄を行い、回収した洗浄液中の腹腔マスト細胞の存在の確認について、フローサイトメトリーを用い、マスト細胞マーカー蛋白質 (FcεRIα、CD117) を検出することにより行った。その結果、腹腔には、腹腔洗浄液の全細胞中の約 20% が FcεRIα⁺、CD117⁺ のマスト細胞であることが分かった (図 2 A)。次に、これら腹腔マスト細胞を単離・精製することを試みた。単離・精製には、以前 Kovarova によって報告 (Kovarova M., *Methods Mol. Biol.*, (2013)) された方法を参考に行った。

Kovarova の方法によって、単離・精製した腹腔細胞について、マスト細胞マーカー蛋白質 (FcεRIα) の発現状態を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、細胞膜上に FcεRIα の発現を観察することに成功した (図 2 B)。しかし、今回の単離・精製方法では、マスト細胞の純度や数について、当初目的としたものと比較して、低いことが明らかになった。そのため、現在はマウス腹腔洗浄液からフローサイトメ

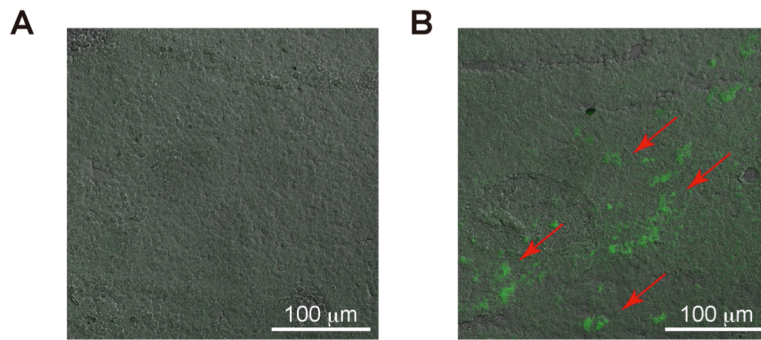


図3 マウスリンパ組織における SA β -Gal 陽性細胞
マウスリンパ組織における加齢細胞の検出を、SA β -Gal 発現を指標に行った。
(A) 若年マウス皮膚組織での SA β -Gal 発現細胞。(B) 加齢マウス皮膚組織での SA β -Gal 発現細胞の顕微鏡画像。矢印は、SA β -Gal 陽性細胞を示している。

ータを用いたマスト細胞のソーティングやマグネットビーズを用いた単離・精製方法条件の検討を行っている。

3-2 マウス組織における老化細胞の検出

若年マウスと加齢マウスにおける各種免疫組織において、種々の免疫細胞が老化し、機能変化をすることにより、アレルギー応答が変化していることが予想される。そこで、若年マウスと加齢マウスの組織の組織切片を用いて、老化細胞の検出を行った。老化細胞の検出には、SA β -Gal を用いた。その結果、図3に示すように、若年マウスのリンパ節では、SA β -Gal の発現する老化細胞は、ほとんど検出されなかった（図3A）。ところが、加齢マウスのリンパ節では、SA β -Gal を発現する老化細胞が数多く観察された（図3B、矢印）。

次に、これらの組織において、老化細胞がマスト細胞であるかどうかを検討するため、マスト細胞と SA β -Gal 陽性老化細胞の同時検出を行った。その結果、リンパ節で観察された老化細胞とマスト細胞の局在は異なっていたことから、ここで観察された老化細胞は、マスト

細胞ではないことが分かった（data not shown）。

次に、リンパ節以外の免疫組織（脾臓）においても老化細胞の検出を行った。その結果、若年マウスの脾臓では、SA β -Gal の発現する細胞は検出されなかったが、加齢マウスの脾臓では、SA β -Gal を強く発現する細胞が数多く観察された（data not shown）。さらに、脾臓においても老化細胞とマスト細胞の局在を観察したところ、脾臓で観察された SA β -Gal 陽性老化細胞についても、マスト細胞との共局在は観察されなかった。このことから脾臓で観察された SA β -Gal 陽性老化細胞は、マスト細胞ではないことが、明らかになった（data not shown）。

また、我々のこれまでの研究成果から、様々なアレルギー炎症反応に伴い、リンパ組織に存在するマスト細胞の数が増加し炎症反応を修飾していることが明らかになっている（Hershko AH., *Immunity*, (2011)）。そのため、加齢に伴うリンパ組織でのマスト細胞数の増減が起こっているのではないかと考え、各種リンパ組織におけるマスト細胞数と加齢に伴う変化を追究した。その結果、組織に存在するマ

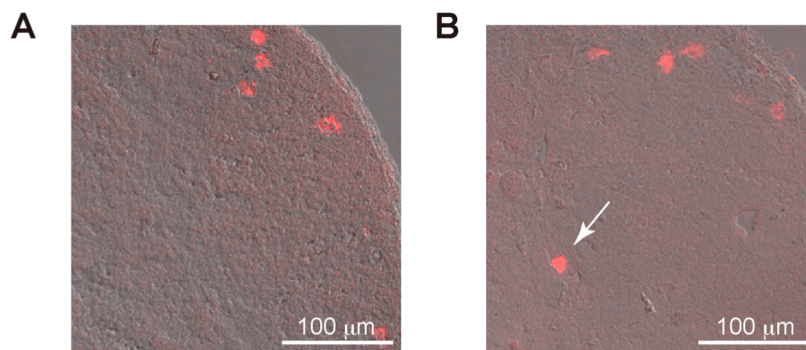


図4 マウスリンパ組織におけるマスト細胞の分布
マウスリンパ組織におけるマスト細胞の検出を行った。(A) 若年マウスリンパ組織でのマスト細胞。(B) 加齢マウスリンパ組織でのマスト細胞の顕微鏡画像。
加齢マウスのリンパ組織では、組織の内部でもマスト細胞が観察される。

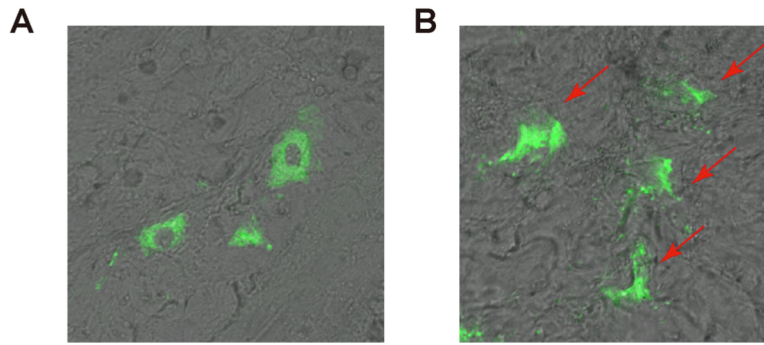


図5 マウス皮膚組織におけるマスト細胞の加齢に伴う活性化
マウス皮膚組織におけるマスト細胞活性化状態について形態学的観察を行った。
(A) 若年マウス皮膚組織では輪郭がはっきりとしたマスト細胞が数多く観察された。
(B) 加齢マウス皮膚組織のマスト細胞では、脱顆粒（分泌）反応に伴う顕著な輪郭の変化と分泌による顆粒状の染色（矢印）が観察された。

スト細胞の数に関しては、加齢に伴い増加する傾向はあるものの有意な差は認められなかった（図4）。また、リンパ組織内でのマスト細胞の分布に関して、加齢とともにその局在に変化が起こっている可能性が示唆された（図4B、矢印）。

3-3 加齢による恒常的な脱顆粒反応の誘導

一般的に、若年性のアレルギー疾患には、アレルゲンが重要な役割を担うと考えられている。ところが、加齢に伴う高齢者アレルギーの発症については、特定のアレルゲンが存在せず、若年アレルギーとは異なる原因で起こる可能性が示唆されている。ここでは、若年マウスと加齢マウスにおける、定常状態（アレルゲン非存在下）におけるマスト細胞の活性化状態についての検討を行った。

若年マウスと加齢マウスの皮膚組織におけるマスト細胞の染色を行った結果、若年マウスの皮膚組織に存在するマスト細胞の場合には、細胞膜の輪郭がはっきりとしたマスト細胞が数多く観察された（図5A）。ところが、加齢マウスの皮膚組織においては、マスト細胞の細胞膜が、マスト細胞内に含まれる炎症性メディエータを細胞外に放出する脱顆粒（分泌）反応を起こした際に生じる顕著な輪郭の変化と分泌による顆粒状の染色（図5B、矢印）が観察された。このことから、皮膚マスト細胞は、アレルゲンの非存在下において、加齢に伴い恒常的な脱顆粒反応を起こしていることが示唆された。

このことから、特定のアレルゲンが存在しない状況でみられる、ヒト高齢者アレルギーの一因ではないかと推察された。

4. 今後の課題

本助成研究の遂行により、アレルギー担当細胞として重要な役割を担っているマスト細胞が、加齢とともに組織に存在する数や組織内での場所など、若年マウスとは異なっている可能性が示唆された。また、皮膚組織に存在するマスト細胞では、若年マウスでは観察されないような、加齢に伴う脱顆粒（分泌）反応している形態学的な特徴が観察された。このことから、アレルゲン非存在下においても、加齢による何らかの因子によってマスト細胞が恒常的に活性化していることが示唆された。

今後は、本研究で得られた幾つかの成果をさらに詳細に追究していく。例えば、恒常的な脱顆粒反応を誘導する因子の同定やリンパ組織における老化細胞の実体についての解明、また、それら老化細胞とアレルギー疾患との関わりについて追究する。現在は、本研究の遂行における重要課題であった加齢マウスの十分な供給も可能になり、疾患モデル動物の樹立と加齢に伴うアレルゲン親和性への感受性の影響などを追究している途中である。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得た研究成果に関しては、国内（日本アレルギー学会、日本免疫学会、日本分子生物学会など）及び国際学会（アメリカアレルギー学会、国際マスト細胞・好塩基球学会など）で、その研究成果を発表するとともに、原著論文として国際紙に公表する予定である。

以上