

# 皮膚ホメオスタシス制御に向けた アレルゲンセラピーの基盤研究とその応用

金沢大学医薬保健研究域 薬学系 衛生化学研究室

鈴木 亮

Allergy is an inappropriate immune response to allergens. Allergy requires initial sensitization with a specific allergen. The subsequent exposure to the same allergen result in patho(physio)logical responses mediated by immunoglobulin E (IgE) and mast cells. We have investigated high-affinity receptor for IgE (FcεRI) signals that control mast cell activation, especially focusing on the complexity of FcεRI activation and of the signaling network in response to different affinity of allergens. What we found is that IgE and FcεRI activate a complex regulatory network by the affinity of allergens that governs the type of allergic disease symptoms. In the mouse model, both high- and low-affinity allergens led to similar levels of immune cells infiltrating the site of inflammation. However, the types of infiltrating cells differed depending on whether the allergens used were high- or low-affinity. Whereas neutrophils were the dominant cell type infiltrating under a high-affinity antigen challenge, monocyte/macrophages were more abundant with the low-affinity antigen challenge. The physiological relevance of the differences in immune cell recruitment is still unclear. In this study, we explore the roles of different immune cell recruitment on physiological relevance on allergic diseases. Thus, we develop novel theories for allergen affinity-dependent immunotherapy for keeping skin homeostasis.

## 1. 緒言

人類は太古から「美」を追求し、様々なコスメティックを研究・開発してきた。現代社会において化粧は、単に「美しくなる」という目的を超え、社会的・医学的に大きな役割を担うようになってきた。例えば「コスメティックセラピー」という言葉に代表されるように、心理・健康面においても多大な影響を及ぼすことが、経験的そして科学的にも明らかになりつつある。

「化粧」には、その基本となる健康的な皮膚が不可欠であることは明らかである。ところが近年、住環境（乾燥、紫外線など）や生活環境（食生活、多種のコスメティックなど）の変化によって、我々の皮膚は様々なトラブルを抱えることが多くなってきている。そして、アトピー性皮膚炎、接触性アレルギーをはじめとするアレルギー性皮膚炎、花粉症が起因となる皮膚炎症症状など、皮膚の健康維持（ホメオスタシス）に多大なダメージを与え大きな社会問題になっている。

これら多くの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。マスト細胞は細胞膜上にIgE受容体（FcεRI）を発現し、アレルゲン特異的IgEと結合している。アレルゲンによってIgE受容体が架橋・凝集することによって、マスト細胞が活性化される。その結果、分泌反応が



図1 マスト細胞の活性化と分泌反応

促進されアレルギー反応が惹起される(図1)。

我々は、アレルギー疾患モデル動物を用いた *in vivo* 解析から、アレルゲン親和性が浸潤細胞の種類に大きな違いを生じさせ、皮膚炎症反応を調節・制御していることを明らかにした。高親和性アレルゲンでは好中球が、一方、低親和性アレルゲンでは単球・マクロファージが浸潤していることを見いだした<sup>1)</sup>。一般的に、好中球は、細菌・真菌を異物として貪食・分解することで生体防御反応を担っている。また、単球・マクロファージは死細胞や変性物質の補食・消化などクリーナーとしての役割を持つ。このことは、アレルゲン親和性選択的な浸潤細胞が、皮膚アレルギー炎症の病態(終息、増悪)決定に多大な影響を及ぼしていることを強く示唆していた。しかしながら、これらの病態決定におけるマスト細胞と浸潤細胞の相互作用の生理機能は全く明らかになっていない。

そこで本研究では、アレルゲンによって誘導される浸潤細胞とマスト細胞の相互作用という視点から、アレルギー



New insight on allergen immunotherapy for keeping skin homeostasis

Ryo Suzuki

Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University

疾患の実体を明らかにし、皮膚ホメオスタシス制御機構を明らかにすることを試みた。

## 2. 方法

### 2.1. 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 (BMMC: bone marrow-derived mast cell) は成体マウス (C57BL/6) の大腿骨から骨髄細胞を採取し、10% FBS、IL-3、SCF、MEM Non-Essential Amino Acids、Sodium Pyruvate、Penicillin、Streptomycin を加えた RPMI Medium 1640 中で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 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同様に採取し、赤血球溶血後 Percoll を用いた密度勾配遠心分画法により単離・精製した。

### 2.2. フローサイトメータによるマーカー蛋白質の解析

マウス骨髄細胞から分化及び単離・精製した骨髄由来マスト細胞と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。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 IgE 受容体 (FcεRI) を用い、IgE 受容体 α 鎖に対する特異的抗体を用いて行った。また、好中球の解析には、マウス好中球のマーカー蛋白質である Ly6G に対する特異的抗体を用いた。これらマーカー蛋白質の定量的な発現解析にはフローサイトメータ (FACS Verse) を用いた。

### 2.3. *In vitro* 共存培養システムの確立

骨髄由来マスト細胞 ( $1.0 \times 10^6$  cells) と骨髄好中球 ( $6.0 \times 10^6$  cells) をマトリゲルコートしたガラスボトムディッシュ上で 24 時間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) 刺激に伴う両細胞の細胞間相互作用を追究した。

### 2.4. 細胞内カルシウムイオン動態と細胞骨格蛋白質の局在解析

骨髄由来マスト細胞と骨髄好中球の細胞内カルシウムイオン動態の解析には、カルシウム蛍光指示薬 (Fluo4-AM) を用い、共焦点レーザー顕微鏡による画像解析により行った。取得した蛍光強度の解析には Image J を用いた。細胞骨格蛋白質の局在解析には、好中球と共存培養させたマスト細胞を抗原により特異的に活性化させたものを用いた。アクチンの染色には FITC 標識ファロイジンを用い、チューブリンの染色には Alexa Fluor 647 標識チューブリン抗体を用いた。画像の取得には共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) を用い、相互作用の解析には Image J を用いた。

### 2.5. 走査型及び透過型電子顕微鏡による撮影

電子顕微鏡による相互作用の解析には、マトリゲルをコートしたカバーガラス上で共存培養した細胞を用いた。走査型電子顕微鏡のサンプルは 1% グルタルアルデヒド、0.5% タンニン酸及び 1% 四酸化オスミウムで処理後、70~100% エタノールで脱水処理した。透過型電子顕微鏡のサンプルの場合には、2% グルタルアルデヒド、2% 四酸化オスミウム、30~100% エタノールで処理後、エポキシ樹脂で包埋した。作製したサンプルは、走査型電子顕微鏡 (HITACHI, S-4300) 及び透過型電子顕微鏡 (花市電子顕微鏡技術研究所 HITACHI, H-7600) により撮影した。

## 3. 結果

### 3.1. マスト細胞と好中球の *in vitro* 共存培養システムの確立

我々の研究から、アレルギー親和性選択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<sup>1)</sup>。特に、高親和性抗原の場合には好中球が有意にアレルギー炎症部位に浸潤しマスト細胞と相互作用していた。そこで、マスト細胞と浸潤細胞 (好中球: 高親和性抗原) 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単離・精製マウス好中球を用いた *in vitro* 共存培養システムの確立を試みた。

マウス大腿骨から骨髄細胞を採取し、骨髄由来マスト細胞への分化を行った。骨髄細胞は、SCF 及び IL-3 の存在下で 1 ヶ月間培養を行い、骨髄由来マスト細胞を得た。骨髄由来マスト細胞の分化レベルの確認には、マスト細胞マーカー蛋白質である FcεRI を用い、α 鎖に対する特異的抗体によるフローサイトメータ解析を行った。その結果、95% 以上の細胞でマスト細胞に分化していることが明らかになった (図 2)。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。骨髄好中球の確認には、マウス好中球マーカー蛋白質である Ly6G を用いた。フローサイトメータで解析した結果、約 85% の細胞で Ly6G の発現が確認され、骨髄から好中球の単離・精製に成功したと考えられた (図 2)。

先述した方法により得た骨髄由来マスト細胞と単離・精製した骨髄好中球を用いて、両細胞を用いた *in vitro* 共存培養システムの確立を行った。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、好中球はマスト細胞 (直径: ~12 μm) と比較し、やや小さい (直径: ~7 μm) ことがわかった。そこで、マスト細胞を特異的に抗原で活性化した際の両細胞間での相互作用について、細胞形態及び動態を指標にイメージング解析を行った。マスト細胞を抗原で特異的に刺激すると、抗原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

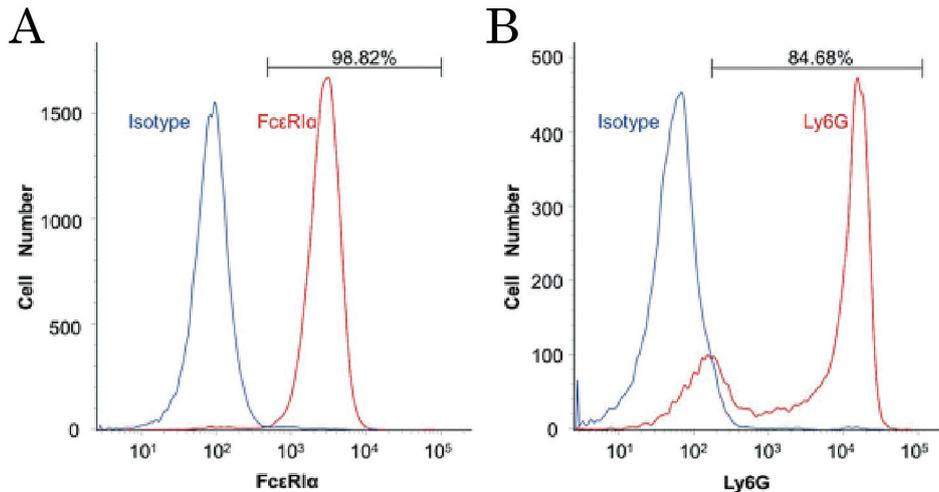


図2 フローサイトメータによる骨髄由来マスト細胞と骨髄好中球の確認  
 (A) マスト細胞マーカー蛋白質FcεR1αの発現確認  
 (B) マウス好中球マーカー蛋白質Ly6Gの発現確認

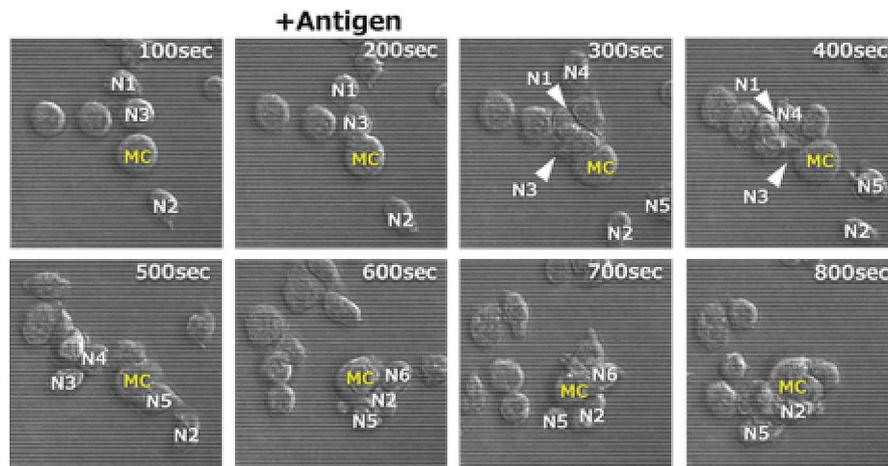


図3 骨髄由来マスト細胞の抗原刺激応答に伴う骨髄好中球の動態  
 マスト細胞(MC)に好中球(N1-6)が集積し相互作用している。

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、丸い形態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する様子が観察された。そして複数の好中球が、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(図3)。

### 3. 2. *In vitro* 共存培養システムを用いた細胞間情報伝達機構の解析

細胞内カルシウムイオン濃度は、様々な細胞機能の調節に関与しており、細胞活性化状態を知る上で極めて重要な指標になることが、これまでの多くの研究から明らかになっている<sup>2,3)</sup>。特にマスト細胞においては、抗原依存的な細胞の活性化が小胞体からのカルシウムイオンの放出と細胞外部からのカルシウムイオンの流入を引き起こすことによって脱顆粒反応が誘導され、各種メディエータ放出に重

要な役割を担っている<sup>4,5)</sup>。一方、好中球の細胞膜上には遊走刺激因子を感知する各種受容体が存在し、受容体の活性化にともなう様々なシグナル分子の活性化と細胞内カルシウムイオン動態の制御を行っていることが明らかになっている<sup>6,7)</sup>。ここでは、様々な細胞機能において重要な役割を担う細胞内カルシウムイオンに着目し、両者の接着に伴う相互作用が、細胞間情報伝達においてどのような影響を及ぼすのか追究した。その結果、好中球単独培養の場合には、抗原の刺激応答に伴う細胞内カルシウムイオン濃度変化は観察されなかった。一方、マスト細胞と共存培養した場合においては、抗原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の上昇が観察された。その後、好中球がマスト細胞に向かって動き、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、好中球に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の生理的役割については不明であるが、現在慎重に検討中である。

### 3. 3. 細胞間情報伝達を制御する分子基盤の解析

免疫細胞の細胞間相互作用において、様々な分子がその相互作用部位において特徴的な局在変化を行い、それら適切な局在変化が起こることによって機能的な細胞間相互作用と情報伝達が行われていることが明らかになっている<sup>8,9)</sup>。

そこで相互作用の足場として重要な細胞骨格に着目し、マスト細胞と好中球の相互作用にともなう細胞骨格蛋白質の局在変化について追究した。ここでは、様々な細胞間相互作用において、接着部位で細胞骨格蛋白質の変化が明らかになっているFアクチンの集積やチューブリンの極性などについて、共焦点レーザー顕微鏡を用いた画像解析により追究した。はじめに、チューブリンについて、相互作用に伴うチューブリンの極性変化を免疫染色法によって追究したところ、共存培養を行った細胞と共存培養していない細胞では明確な極性変化は観察されなかった(Data not shown)。次に、アクチンについて相互作用に伴うFアクチンの局在変化を、ファロイジンを用いたFアクチンの特異的染色法により追究した。その結果、マスト細胞と好中球が相互作用(接着)している部分で、Fアクチンが顕著に集積している様子が観察された(図4)。このような接着面でのFアクチンの集積は、接着していないマスト細胞や好中球では観察されなかった。また、マスト細胞・好中球相互作用に関与する分子の同定についても幾つか成功しており、マスト細胞と好中球の相互作用には、細胞骨格をはじめとする様々な機能分子が関与している可能性が示唆された。現在は、個々の機能分子について相互作用における役割について検討を行っている途中である。

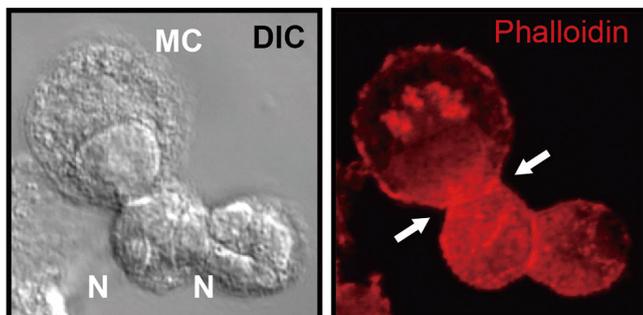


図4 マスト細胞と好中球の相互作用部位におけるFアクチンの集積

マスト細胞(MC)と好中球(N)の相互作用の接着部位においてFアクチンの集積が観察された(矢印)。

### 3. 4. 電子顕微鏡を用いたマスト細胞と好中球の相互作用の追究

抗原刺激応答に伴いマスト細胞と好中球が接着し、ダイナミックに相互作用する様子が観察された。そこで、マスト細胞の好中球の接着形態や相互作用をより詳細に観察するために、走査型及び透過型電子顕微鏡を用いて追究した。はじめに走査型電子顕微鏡を用いて両者の接着形態を観察したところ、抗原刺激前は球形をしていた好中球が紡錘形に形態を変化させ、マスト細胞に密接に接着している様子が観察された(Data not shown)。また、透過型電子顕微鏡を用いた解析では、抗原刺激により活性化されたマスト細胞から分泌された顆粒内物質を好中球が貪食している様子が観察された(Data not shown)。このことから、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。

## 4. 考 察

マスト細胞と好中球との相互作用を追究するための*in vitro*共存培養システムの確立に成功した。確立したシステムを用いた解析から、好中球はマスト細胞の活性化に伴い、遊走し接着することが明らかになった。また、両者の接着部位では細胞骨格をはじめとする様々な機能分子の集積が起こっていることが明らかになった。さらに細胞内カルシウムイオン動態の解析から、両細胞間ではカルシウムイオン動態を制御する情報交換が起こっていることも明らかにした。そして電子顕微鏡を用いた解析からは、好中球がマスト細胞の分泌メディエータを貪食することによってアレルギー応答を制御している可能性が示唆された。

## 5. 総 括

本研究で確立した*in vitro*共存培養システムは、これまで明らかになっていなかった細胞間相互作用について、様々な分子基盤の研究を可能にし、相互作用が担う生理機能を明らかにする上で極めて有用な研究システムであった。本研究で確立した*in vitro*共存培養システムを用い、さらに分子・細胞レベルでの研究を行うとともに、それらの知見を基盤にした*in vivo*研究へ展開することによって、相互作用が担う生理機能の一端が明らかになり、皮膚の健康維持に関する戦略的な治療方法の確立を行えるものと考えられる。また*in vitro*共存培養システム確立に向けた条件検討段階であるマスト細胞と単球・マクロファージの相互作用研究においても、*in vitro*及び*in vivo*研究を遂行することによって、これまで不明であった、アレルギー応答における単球・マクロファージの新たな生理機能が明らかになることが予想される。これらの取り組みによって、新たな視点からアレルギー疾患の原因を究明するとともに、「コスメトロジー」における新たな展開をもたらせるものと考え

えられる。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご支援を頂きましたことを、心より感謝申し上げます。

#### (引用文献)

- 1) 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*, **343**, 1021-1025 (2014).
- 2) Rivera J, Fierro NA, Olivera A, Suzuki R. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol*, **98**, 85-120 (2008).
- 3) Suzuki R. The Emerging Picture of Mast Cell Activation: The Complex Regulatory Network of High-Affinity Receptor for Immunoglobulin E Signaling. *Biol Pharm Bull*, **40**, 1828-1832 (2017).
- 4) Suzuki R, Liu X, Olivera A, Aguiniga L, Yamashita Y, Blank U, Ambudkar I, Rivera J. Loss of TRPC1-mediated  $Ca^{2+}$  influx contributes to impaired degranulation in Fyn-deficient mouse bone marrow-derived mast cells. *J Leukoc Biol*, **88**, 863-875 (2010).
- 5) 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*, **451**, 62-67 (2014).
- 6) Putney JW, Steinckwich-Besancon N, Numagata Tomita T, Davis FM, Desai PN, D'Agostin DM, Wu S, Bird GS. The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys Acta*, **1864**, 900-906 (2017).
- 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*, **263**, 10557-10560 (1988).
- 8) Hashimoto-Tane A, Saito T. Dynamic Regulation of TCR-Microclusters and the Microsynapse for T Cell Activation. *Front Immunol*, **7**, 255 (2016).
- 9) Dustin ML, Baldari CT. The Immune Synapse: Past, Present, and Future. *Methods Mol Biol*, **1584**, 1-5 (2017).