

アレルゲン親和性を基盤とした高齢者アレルギー研究への展開

金沢大学医薬保健研究域 薬学系

教授 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

はじめに

我が国は、急速に高度高齢化社会を迎えている。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始めている。特に加齢に伴う体質の変化や免疫組織の萎縮など、加齢が生体内の恒常性を変化させ、また免疫機能を低下させることが明らかになりつつある。このように加齢による体調変化（恒常性維持の変化、免疫機能の低下）が、ガンや感染症の発症率の増加をはじめ、様々な疾患の要因であると考え

られ始めている。一方で、先述のような致死性の疾患研究に比べ、慢性疾患研究については極めて立ち遅れているのが現状である。例えば、高齢者アレルギー疾患については、加齢に伴うImmunoglobulin E (IgE) 量の減少、アレルゲン特異性の変化、皮膚アレルギーテストへの反応性の低下など、その症状から加齢に伴って緩和・治癒するとの錯覚がなされてきた。ところが、臨床・介護の現場においては、高齢者の様々なアレルギー疾患（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、喘息など）が、大きな問題になっている。それらの多くは、若年性アレルギー疾患と比較して疾患原因の特定が困難であり、そのため慢性化・難治化し、高齢者QOL (Quality of Life) の低下を招いている。そのため、高齢者アレルギーに特化した新たな診断方法や治療法の確立が急務となっている。このような社会的状況においても、加齢医薬学研究は、疾患動物モデルを作製するのに要する時間や費用の問題、さらに複雑かつ多様な疾患原因の特定の難しさなどから、従事する研究者が不足していることも、未だ十分に研究が進んでいないことの一因になっている。

一般に、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、アレルゲンによってマスト細胞が活性化し、アレルギー応答が惹起されるためには、IgEが重要である。IgEは、アレルゲン情報をIgE受容体 (FcεRI) によって細胞内に伝達することで、アレルゲン情報に特異的なマスト細胞の活性化が誘導され、アレルギー疾患が惹起される(図1)。

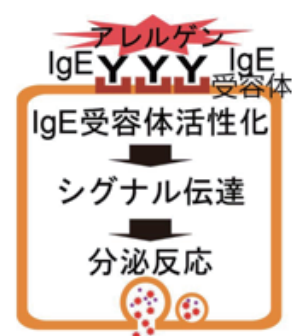


図1 マスト細胞の活性化とアレルギー応答

本研究では、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、我々の着目する新たな指標である「親和性」の影響を追究することによって⁽¹⁾、複雑な高齢者アレルギー疾患の原因究明を目指す。また、若年マウスと加齢マウスの様々な免疫組織におけるマスト細胞に着目し、それらの加齢に伴う変化を追究し、高齢者アレルギー疾患の原因を明らかにし、特化した診断・治療方法を確立しようとするものである。

結 果

(1) 若年・加齢マウスからの腹腔マスト細胞の単離・精製方法の確立

はじめに、加齢により発症する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。これまでの研究成果から、ラットの腹腔からラット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ものの⁽²⁾、アレルギー疾患モデルの多くがマウスを用いて作製するため、ラットではなくマウスで加齢の影響を追究する必要がある。さらに、マスト細胞機能の加齢による影響を追究するためには、骨髓より採取した未成熟骨髓細胞から分化させた骨髓由来マスト細胞ではなく、末梢組織で分化したマウス腹腔内成熟マスト細胞を使用する必要性があった。そのため本研究では、総取得細胞数などの問題から難しいとされていた、マウス腹腔内成熟マスト細胞の単離・精製方法の検討を行った。そのため先行研究として、マウス腹腔内での成熟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内マスト細胞の存在について、マスト細胞マーカー蛋白質 (FcεRIα、CD117) を用いたフローサイトメータ解析により行った。その結果、腹腔洗浄液細胞中の約20%が、FcεRIα⁺、CD117⁺の成熟マスト細胞であることが分かった (data not shown)。次に、これらマウス腹腔内成熟マスト細胞を単離・精製することを試みた。単離・精製には、既に成功例として報告があるKovarovaらの単離・精製方法を参考に行った⁽³⁾。密度勾配遠心法によって単離・精製した腹腔内マスト細胞について、マーカー蛋白質 (FcεRIα) 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、単離・精製した細胞の細胞膜上に、FcεRIαが発現しているマウス腹腔内成熟マスト細胞の観察に成功した (data not shown)。しかしながら、Kovarovaらの方法の単離・精製方法では、ある程度の腹腔内成熟マスト細胞の単離・精製には成功したものの、当初予定していた純度や細胞数と比較して、著しく低いことが分かった。これらの問題を解決するため、マウス腹腔洗浄液からマスト細胞マーカー蛋白質の1つであるCD117に対する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たところ、精製についてはマグネットビーズを用いることで、改善がみられたが、現在も十分な細胞数を得る条件には至っていない。

（２）加齢マウスの免疫組織における老化細胞の検出

近年、加齢に伴う細胞老化が、生体内の恒常性や免疫機能に影響を及ぼしていることが明らかになりつつある。そのため、種々の免疫組織において様々な免疫細胞の老化や機能変化が、アレルギー応答を制御している可能性が示唆される。本項目では、若年マウスと加齢マウスにおける種々の免疫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、Senescence-Associated β -Galactosidase (SA β -Gal) を用いた⁽⁴⁾。その結果、若年マウスの免疫組織（リンパ節、脾臓）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。一方、加齢マウスの免疫組織（リンパ節、脾臓）では、SA β -Galを発現する老化細胞が数多く観察された。次に、ここで観察された免疫組織内の老化細胞がマスト細胞であるかどうかについて、マスト細胞（アビジン染色）とSA β -Gal陽性老化細胞（SA β -Gal染色）の二重染色による画像解析で追究したところ、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）。現在は、この老化細胞がどのような種類の細胞であるのか、また、これらの老化細胞がどのようにアレルギー疾患の発症に関与しているのか慎重に検討を行っている。

（３）加齢によるマスト細胞および活性化状態の変化

若年性のアレルギー疾患では、疾患の発症に外来アレルゲンが重要な役割を担う。しかしながら、マウスをはじめヒトにおいても加齢により様々な体内変化が起こることが予想され、加齢マウスのアレルギー疾患発症メカニズムは若年マウスのものとは異なる可能性が示唆される。実際に、加齢に伴う高齢者アレルギーは、外来アレルゲンに対する体内IgE量が低下しており、外来アレルゲンによるアレルギー発症機構とは異なる可能性が示唆される。ここでは、若年マウスと加齢マウスにおける、定常状態（外来アレルゲン非存在下）でのマスト細胞の体内での状態（細胞数や活性化状態など）についての検討を行った。

はじめに、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。その結果、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したマスト細胞が数多く観察された（図2）。一方で、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細胞輪郭の変化と、分泌反応による顆粒状の染色が観察された（図2）。これらの結果から、加齢によってマスト細胞が、外来アレルゲンが存在していないにもかかわらず、組織内で恒常的な脱顆粒反応を起こしている可能性

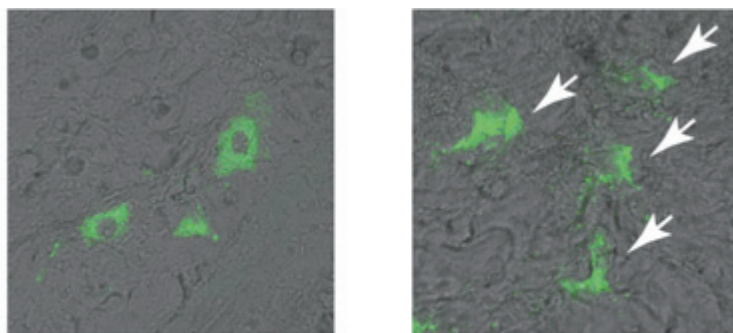


図2 免疫組織内マスト細胞の加齢に伴う脱顆粒反応

が示唆された。

さらに我々の研究成果から、マスト細胞は組織で炎症反応が起こると、様々なリンパ組織でのマスト細胞数の増加と抑制性T細胞との相互作用によってアレルギー炎症を調節・制御していることが明らかになっている⁽⁵⁾。加齢に伴うマスト細胞によるアレルギー応答制御機構を明らかにするため、はじめにリンパ組織におけるマスト細胞の分布及び細胞数についても追究した。その結果、加齢に伴いリンパ組織内のマスト細胞数が有意に増加していることが分かった(図3)。

以上の結果から、加齢によって免疫組織におけるマスト細胞の細胞数が増加し、アレルギー応答を制御している可能性が示唆された。また、特定の外来アレルゲンが存在していない条件下においても、免疫組織内のマスト細胞で脱顆粒反応が誘導されていた。これらのことは、アレルゲン非依存的なマスト細胞の活性化メカニズムが存在する可能性や、加齢に伴う恒常性維持機構の変化による体内物質のアレルゲン化など、これまで明らかになっていないマスト細胞活性化制御機構と高齢者アレルギー疾患発症機構の存在の可能性が示唆された。

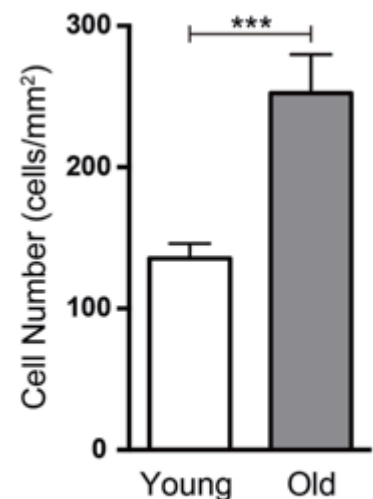


図3 免疫組織内マスト細胞数の加齢による増加

考 察

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、加齢とともに免疫組織内の細胞数や活性化状態など、若年マウスとは大きく異なっている可能性が示唆された。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、外来アレルゲンが存在していない状態においても、マスト細胞が恒常的に活性化していることが明らかになった。このことは、加齢による体内物質のアレルゲン化など、これまで明らかになっていなかった新たなアレルギー発症メカニズムの存在の可能性が強く示唆される。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、今後も疾患モデル動物の樹立や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くことによって、加齢に伴い発症する高齢者アレルギー疾患の原因の一端が明らかになると強く期待できる。

要 約

高度高齢化社会を迎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

では、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、加齢によるアレルギー非依存的なマスト細胞活性化機構の存在や加齢に伴う恒常性維持機構の変化により内因性物質のアレルゲン化など新たなアレルギー発症機構の存在が示唆された。

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. Brochetta C., Suzuki R., Vita F., Soranzo MR., Claver J., Madjene LC., Vitte J., Varin-Blank N., Zabucchi G., Rivera J., Blank U., Munc18-2 and Syntaxin 3 Control Distinct Essential Steps in Mast Cell Degranulation., **J. Immunol.**, 92:41-51, 2014
3. Kovarova M., Isolation and characterization of mast cells in mouse models of allergic diseases., **Methods Mol Biol.**, 1032:109-119, 2013
4. Sikora E., Bielak-Zmijewska A., Mosieniak G., Cellular senescence in ageing, age-related disease and longevity., **Curr Vasc Pharmacol.**, 12:698-706. (2014)
5. Hershko AH., Suzuki R., Charles N., Alvarez-Errico D., Sargent JL., Laurence A., Rivera J., Mast Cell Interleukin-2 Production Contributes to Suppression of Chronic Allergic Dermatitis., **Immunity**, 35:562-571., 2011