

## 研究タイトル

アレルギー親和性を基盤とした高齢者アレルギー発症機構と  
戦略的脱感作療法の確立

所属：金沢大学 医薬保健学研究域 薬学系

助成対象者：鈴木 亮

所属：名古屋市立大学 大学院薬学研究科

共同研究者：平嶋尚英

### 概要

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の多くは、感染症やガンなどが中心であり、高齢者発症アレルギーに関しては、十分な研究がなされてこなかった。ところが、臨床・介護の現場においては、高齢者発症アレルギー疾患が大きな問題になっているのが現状である。本研究では、若年・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が示唆された。

### abstract

The ageing is a complex process that abnormally affects the ability of immune cell function (normally referred to as “immunosenescence”). The etiology of elderly allergic diseases might be associated with immunosenescence, however the mechanisms of age-related allergic disease have not been well studied. Here we studied the mechanisms in age-related changes of allergic diseases. We found that mast cells (responsible cells for allergic

disease) were constitutively degranulated in the absence of specific antigen in old mice. Our data mentioned that the aging leads to induce mast cell degranulation without specific antigen.

## 研究内容

### 「背景」

日本は、かつて世界が経験したことのない急速な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、増加する高齢者の健康維持・増進は、社会的にも大きな関心事である。我々は、加齢に伴い体調が変化（感染症・ガンの罹患率の増加など）することを実感しているにもかかわらず、その実体に関しては未だ不明な点が多いのが現状である。免疫システムは、生体の恒常性を維持する上で極めて重要な役割を果たす。ところが昨今「Immunosenescence（免疫老化）」という言葉が、多く語られるようになり、加齢に伴う免疫システムの変化が、生体の恒常性維持に関してどのような影響を及ぼすのか、そのメカニズムに関して様々な研究が行なわれはじめている[1, 2]。実際に加齢に伴う免疫組織の萎縮や代謝機能の違いによる免疫応答の変化など、加齢によって免疫機能が変化することが、実験的にも徐々に明らかになりつつある[3, 4]。このような加齢に伴う免疫機能の変化が、様々な疾患の発症に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある一方で、高齢者発症アレルギー疾患に関しては、研究実績の欠如から未だ不明な点が多いのが現状である。実際の臨床・介護現場においては、花粉症、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、これら高齢者発症アレルギー疾患の多くは、重症化・慢性化するため発症原因についても早急な研究の進展と高齢者発症アレルギーに特化した診断方法や治療法の確立が極めて重要な研究課題であると考えられる。

### 「目的」

若年で発症する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。マスト細胞は、アレルゲン（抗原）が IgE 受容体 (FcεRI) に結合している抗原特異的 IgE 抗体を介して認識される。そして、アレルゲンによって IgE 受容体が活性化されると、マスト細胞内のヒスタミンをはじめとした炎症性メディエーターが細胞外へ放出され、アレルギー反応が惹起される[5]。これまでは「アレルゲン特異的 IgE の量」が、アレルギー診断において重要な指標であった。しかしながら、免疫機能が低下していると推察される高齢者で発症するアレルギー疾患においては、必ずしも有用な指標ではないのではないかと

言われている。そこで本研究では、若年マウスと加齢マウスに存在するマスト細胞や組織に着目し、それらの加齢に伴う変化や影響を明らかにすることによって、高齢者アレルギー疾患の原因を追究し、新たな治療方法の確立を目指すものである。

「結果」

### 【1】マウス腹腔マスト細胞の単離培養方法の確立

高齢者発症アレルギーの分子メカニズムを追究するため、マスト細胞の加齢に伴う変化について若年（3ヶ月齢以内）及び加齢（12ヶ月齢以上）マウスの腹腔から成熟マスト細胞の単離・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。単離・精製には、既に Kovarova らによって報告されている方法を参考にした[6]。初めに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て検出したところ、腹腔洗浄液全細胞中の約 20%がマウスマスト細胞マーカータンパク質（FcεRIα<sup>+</sup>、CD117<sup>+</sup>）陽性の細胞であることが分かった。次に、これら腹腔マスト細胞を Kovarova らの方法によって単離・精製し、共焦点レーザー顕微鏡によりマスト細胞マーカー蛋白質（FcεRIα）の発現状態を観察したところ、細胞膜上に FcεRIα の発現を観察することに成功した。しかし、Kovarova らの単離・精製方法では、純度・細胞数が十分ではないため、フローサイトメータを用いたソーティングやマグネットビーズを用いた単離・精製など精製方法について詳細に検討中である。

### 【2】加齢マウス組織における恒常的マスト細胞の活性化

これまでの研究から、若年性のアレルギー疾患には、アレルゲンが疾患の発症に重要な役割を担うと考えられている。しかしながら、加齢に伴う高齢者発症アレルギーについては、アレルゲンを特定することが困難なことや様々な増悪因子

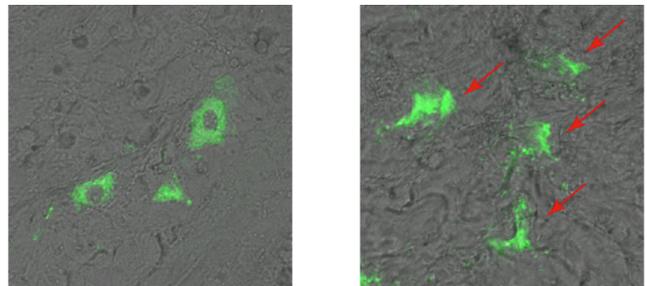


図1 皮膚組織内マスト細胞の加齢に伴う恒常的活性化

の存在によって、アレルゲン以外の要因によってマスト細胞が活性化している可能性が示唆されているにもかかわらず、これまであまり研究がなされてこなかった。そこで若年マ

ウスと加齢マウスに関して、アレルゲン非存在下(未刺激時)における、マスト細胞の活性化状態や炎症細胞の組織への浸潤状態について追究した。組織内マスト細胞の同定には、蛍光 (FITC、Alexa Fluor 647) 標識 Avidin を用い、またマスト細胞の活性化 (脱顆粒) 状態の形態学的観察には、共焦点レーザー顕微鏡を用いた Avidin 陽性細胞の形態観察によって行った。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 1 左)。一方で、加齢マウスにおいては、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反応を起こした際に生じる顕著な細胞輪郭部分の変化と分泌による顆粒状の染色 (図 1 右、矢印) が観察された。このことから、皮膚組織内のマスト細胞は、アレルゲンが存在していないにもかかわらず、加齢変化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。

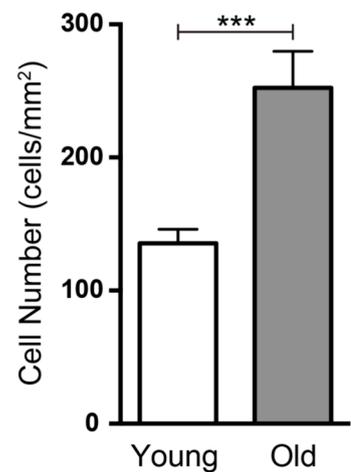


図2 リンパ組織におけるマスト細胞数の比較

マスト細胞は、体内で炎症反応が起こるとリンパ組織で細胞数が増加し炎症反応を調節・制御していることが先の我々の研究から明らかになっている。ここでは、加齢に伴うアレルギー疾患制御機構を明らかにするため、リンパ組織におけるマスト細胞の分布及び活性化状態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 2)。また、これら増加したマスト細胞の活性化状態について形態的観察を行ったところ、加齢マウスの場合には皮膚組織の場合と同様に脱顆粒しているマスト細胞が有意に増加していることが明らかになった (図 3)。

このことから、特定のアレルゲンが存在しない状況において、加齢が一因となってマスト細胞の数の増加と脱顆粒反応を誘導されていることが明らかになった。この結果から、ヒト高齢者で発症するアレルギー疾患においても、加齢に伴う体内変化がアレルギー細胞の活性化を誘導している可能性が示唆された。

「今後」

本助成研究の遂行により、アレルギー疾患に寄与するマスト細胞が、加齢に伴い組織内細胞数や活性化状

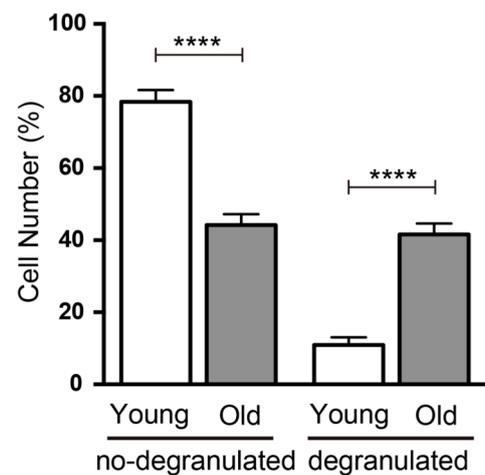


図3 脱顆粒しているマスト細胞の割合

態など、若年マウスとは異なっていることが示された。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マスト細胞の状態（細胞老化や応答性など）について検討する。現在は、本研究の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ギー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。

#### 引用文献

- [1] Fuentes E, Fuentes M, Alarcon M, Palomo I. Immune System Dysfunction in the Elderly. *An Acad Bras Cienc* 89: 285-299, 2017.
- [2] Nguyen M, Pace AJ, Koller BH. Age-induced reprogramming of mast cell degranulation. *J Immunol* 175: 5701-5707, 2005.
- [3] Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A et al. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 30: 366-373, 2009.
- [4] Pera A, Campos C, Lopez N et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas* 82: 50-55, 2015.
- [5] Suzuki R, Scheffel J, Rivera J. New insights on the signaling and function of the high-affinity receptor for IgE. *Curr Top Microbiol Immunol* 388: 63-90, 2015.
- [6] Kovarova M. Isolation and characterization of mast cells in mouse models of allergic diseases. *Methods Mol Biol* 1032: 109-119, 2013.

#### 本助成に関わる成果の公表

現在、本研究で得られた結果についてさらに詳細な解析を行うとともに、脱顆粒誘導因子の同定を行い、それらの成果を組み合わせ、日本アレルギー学会、日本免疫学会、日本分子生物学会での発表を検討している。