

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

所属機関名 山梨大学大学院総合研究部免疫学講座

職名・氏名 特任助教・TRAN NGUYEN QUOC VUONG ⑧

1 研究テーマ

アレルギー疾患における生体内マスト細胞の量的・空間的・時間的な解析

2 研究の目的

(本研究の背景・ニーズ)

喘息、花粉症、食物アレルギー、蕁麻疹などのアレルギー疾患は、環境中の無害な分子（アレルゲン）に対する免疫応答により様々な症状が誘発される病気である。日本では約3人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患している（下図参照）。残念なことに、山梨県はブドウや桃の生産量だけでなくアレルギー疾患の1つである花粉症（スギ花粉症）を有する人も日本で、2人に1人が罹患し全国的に突出している(2022年、後述)。特に山梨県では若年者の罹患率が増加しており成長や学習への影響、医療費の増大など多くの問題が将来的に懸念される。現在、アレルギー疾患については対症療法が主体であり、難治性の患者さんもいまだに多く、アンメット・クリニカルニーズ(unmet clinical needs)が発生している。よってアレルギー疾患の病態をより深く理解し、新たな予防や治療法の開発に結びつけることがまだまだ必要である。

右図：アエラ 2016年3月号



アレルギー疾患の病態形成の中心となる細胞の1つはマスト細胞である。マスト細胞は皮膚、気道粘膜、腸管粘膜など主に生体が外界と接する組織に多数存在する。この空間的配置によりアレルゲンの外界からの侵入を検知し、免疫応答を始動、増強、制御する役割を担っている。

マスト細胞は、一説によれば、ヒト体内で1兆個近くあると言われるが(羅知靖「マスト細胞の多彩な役割」医学界新聞 2498号 2002年)正確な数は不明である。またマスト細胞は喘息や食物アレルギー、蕁麻疹などの病変部で増加すると考えられている。しかしこの知見は病理標本等で病変の一部のマスト細胞増加を観察し得られたもので組織全体や全身の動態は不明である。例えばマスト細胞が病変組織の一部に集積しているだけの可能性もある。したがって個体・組織レベルでマスト細胞数を正しく評価することは未だ出来ていないのが現状である。

右図：マスト細胞の電子顕微鏡写真

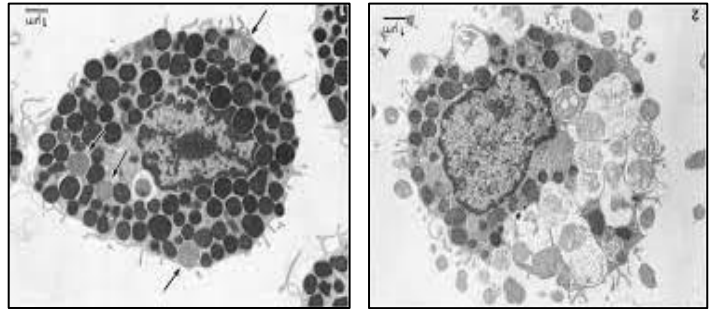
(左：定常状態、右：活性化状態)

細胞質内の顆粒を放出している像が捉えられている。

顆粒中にはヒスタミンなどの化学物質が

含まれており、これがくしゃみや鼻水、咳、かゆみなどの

アレルギー症状を引き起こす。Virchows Archiv B Cell Pathol 55:311, 1988 より。)

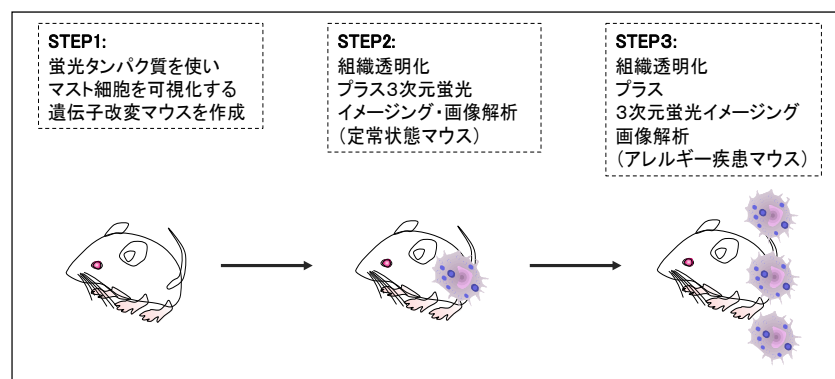


生体内におけるマスト細胞の数を正しく評価することはアレルギー疾患の理解を深め、新たな予防・治療戦略を創出する上で極めて重要である。例えば、蕁麻疹、喘息、花粉症、食物アレルギーなどの病変部のマスト細胞数を正確に経時的に定量化し、かつ治療薬への反応性を解析することはマスト細胞の病態に対する真の寄与度を理解する大事な知見となる。また病変部だけでなく他臓器の変化も観察することで、アレルギーマーチなどの基盤となる知見が得られるかもしれない。種々の非アレルギー性刺激（ウイルス感染、ストレス、運動、寒冷刺激等）時におけるマスト細胞数の変化は非アトピー型喘息、慢性蕁麻疹や運動誘発性アナフィラキシー等のアレルゲンが明確でないアレルギー疾患の病態に新しい視点を提供する。さらに、ステロイド、抗 IgE 抗体や抗 IL-5 抗体、JAK 阻害剤等の既存の抗アレルギー薬が、直接的または IgE や好酸球減少等を介し間接的にマスト細胞数に及ぼす影響を評価することは抗アレルギー薬の新たな作用の発見につながる。これらの知見は、「マスト細胞数の増加こそアレルギー疾患の本質である」というような結論を導く可能性もある。

(本研究の目的)

上記の背景を踏まえ、本研究の目的は、マスト細胞を可視化する最新技術を用いることによって、定常状態およびアレルギー疾患時のマスト細胞数を定量化することである。

右図：本研究の全体像



3 研究の方法

1) 蛍光タンパク質によってマスト細胞を可視化する遺伝子改変マウスの作成

マスト細胞は生体内で大きく結合組織型、粘膜型の2つに大別される。結合組織型マスト細胞は皮膚、腹腔、脂肪組織、脳などに存在し、粘膜型マスト細胞は気道、腸管、生殖器などに存在する。

本研究では結合組織型マスト細胞にフォーカスした。蛍光タンパク質によって結合組織型マスト細胞を可視化するために、結合組織型マスト細胞に特異的に発現する Mcpt5 (mast cell specific protease-5) のプロモーター領域に Cre タンパク質が結合したマウス (Mcpt5-Cre) と蛍光タンパク質である TdTomato が Flox 領域と結合したマウス (Floxed-Tdtomato) を交配し、結合組織型マスト細胞特異的に TdTomato を発現するマウスを作成した (Mcpt5-TdTomato マウス)。

2) 組織透明化技術と3次元蛍光イメージングを用いたマスト細胞の数や分布の解析

現在、生体組織から高屈折率成分を除いたり、溶媒を高屈折率液体へ置き換えることにより光散乱を低減し固定組織を透明化する技術が注目され、基礎生物学分野や製薬分野でこの技術導入が少しずつ広がっている。この技術は、従来二次元を主体として行われてきた組織学を三次元に拡張し組織学における新たな視野を得るための方法の一つとなる。

Mcpt5-TdTomato の皮膚組織を、最新の組織透明化技術 (Nat Protoc 14:3506, 2019) を使い透明化し3次元蛍光イメージングを行い、画像解析によりマスト細胞数の定量を試みた。

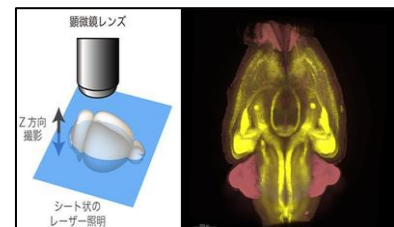
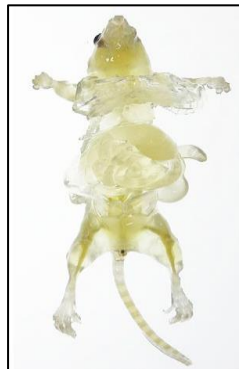
右図：組織透明化技術と3次元蛍光イメージング

(左パネル：マウス個体の透明化

右：シート顕微鏡を使った透明化したマウス脳の蛍光イメージング

(東京大学 上田泰己博士

JST レポート 2016 より)



3) アレルギー疾患モデル誘導時および非アレルギー刺激負荷時、抗アレルギー薬使用時におけるマスト細胞の量・空間・時間的な変化の解析

蕁麻疹モデルの1つである PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応、拘束ストレス、自発的な運動誘発 (回転カゴ留置による)、低温刺激 (低温室での短時間のケージ暴露) を、それぞれ Mcpt5-TdTomato マウスに誘導する。その後、経時的に (各種刺激後 1, 6, 12, 24 時間) マウス皮膚を透明化し、3次元蛍光イメージングを行い、画像解析によりマスト細胞数を定量する。またその後にデキサメサゾン、ヒスタミン H1 受容体拮抗剤、抗 IgE 抗体、抗 IL-5 抗体、JAK 阻害剤を投与する条件下での解析も行う。これらの解析により、種々の非定常状態時 (病態時) 及び抗アレルギー薬使用時における皮膚結合組織型マスト細胞の量・空間・時間的な変化が明らかになる。

4 研究の成果

Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織を透明化し、3次元蛍光イメージングを行い、画像解析によりマスト細胞数を同定、定量化を試みた。Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織、特に真皮中に赤色に染色される多数のマスト細胞を同定することに成功した（下図参照）。

5 今後の展望

現在、Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織におけるマスト細胞を定量化する方法について検討中である。定量化に成功した後、各種のアレルギー疾患モデルを Mcpt5-TdTomato マウスに導入し、皮膚組織中のマスト細胞の数や分布の変化について解析する。

アレルギー疾患モデルとしては、蕁麻疹モデルの1つである PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応を使う予定である。また拘束ストレス、自発的な運動誘発（回転カゴ留置による）、低温刺激（低温室での短時間のケージ暴露）、薬剤（ステロイド塗布、ヒスタミン H1 受容体拮抗剤、抗 IgE 抗体、抗 IL-5 抗体、JAK 阻害剤など）による皮膚マスト細胞の数や分布の変化についても解析する。

これらの解析により、定常時の結合組織型マスト細胞の数や分布を解析するとともに、アレルギー疾患の病態時やストレス、薬剤投与時における結合組織型マスト細胞の量・空間・時間的な変化が明らかになる。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

アレルギー研究の分野で最も権威ある米国あるいは欧州アレルギー学会誌に論文を投稿する予定である。

(参考データ)

マウス皮膚における組織透明化技術を用いたマスト細胞可視化

写真(上): コントロールマウス皮膚

写真(下): MCPT-5-TdTomato マウス皮膚

における組織透明化技術を用いたマスト細胞可視化

赤く染色された粒様に見えるのが結合組織型マスト細胞で、
コントロールマウス皮膚では認められない

