

所属機関 山梨大学医学部免疫学講座

職名・氏名 助教・中嶋正太郎

1 研究テーマ

「こころの変化がアレルギー性鼻炎(花粉症)の症状に与える影響の解析」

2 研究の目的

花粉症をはじめとした I 型アレルギー反応(アレルゲン特異的 IgE 刺激によるマスト細胞の脱顆粒反応)により引き起こされるアレルギー疾患は精神的な(こころの)変化により影響を受けるものと考えられている。たとえば、精神的なストレスが強い状態ではアレルギー症状が悪化するとの疫学的な報告がある(Wainwright NW et al. 2007/Rod NH et al. 2012)。一方、I 型アレルギー疾患はプラセボ効果(患者の前向きな感情が薬効と無関係に治療効果を高めること)が強く新規薬剤の臨床試験において薬効評価が困難なことがある。このように I 型アレルギー疾患は精神的な(こころの)変化が症状に影響を与えることが経験的に知られているもののその科学的基盤はほとんど明らかにされていない。

本研究では精神的な変化、特にプラセボ効果のようなポジティブなこころの変化が I 型アレルギー疾患に影響を与えるのか否か、また影響を与える場合その作用機序を明らかにし花粉症などの I 型アレルギー疾患の原因解明および有効な対策の基盤を創出することを目的とする。

3 研究の方法

プラセボ効果は脳内の報酬中枢の活性化を介して得られることが報告されている(de la Fuente-Fernandez R et al. 2001/Scotto DJ et al. 2008)。腹側被蓋野(以下 VTA)という脳領域には多数のドーパミン作動性ニューロンが集積しており、側坐核(以下 NA)などにドーパミンを投射することで快の情同行動(報酬経路)を惹起する(図1)。プラセボ効果では、患者が偽薬を摂取した際の症状改善への期待感により報酬経路が活性化され症状が改善する可能性が考えられるが科学的な基盤はほとんどなく不明な点が多い(図2)。

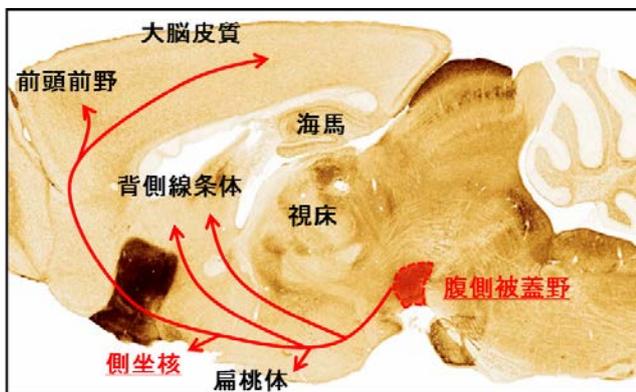


図1. 腹側被蓋野からのドーパミン投射

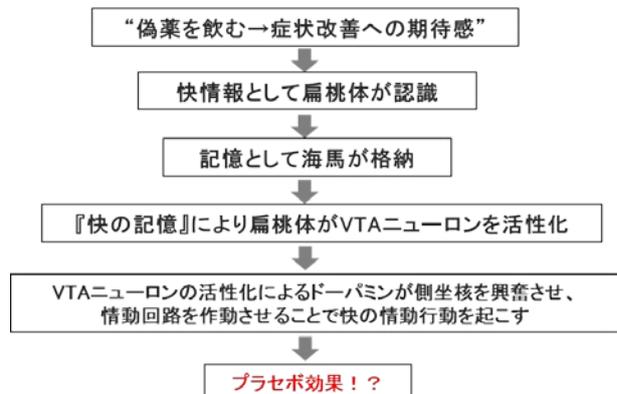


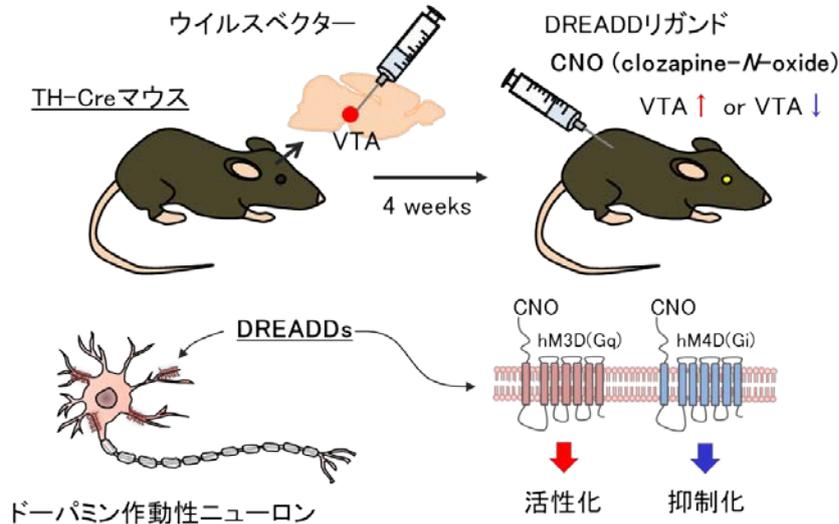
図2. 報酬経路とプラセボ効果

本研究では報酬経路の活性化がアレルギー反応、とくに花粉症に代表される I 型アレルギー反応に直接的に影響を与えるか否かについて検討を行う。具体的な研究方法は以下のである。

1) 甘い水(サッカリン水)の給水により報酬経路を活性化した際、I 型アレルギー反応を個体レベルで観察で

きる受動皮膚アナフィラキシー反応(以下 PCA 反応)を行い報酬経路の活性化がI型アレルギー反応に与える影響を検討する。

2) Th-Cre マウス[ドーパミン産生に必須なチロシン水酸化酵素(TH)遺伝子プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼ遺伝子を組み込んだマウス]の VTA 領域にウイルスベクターを注入し改変受容体 DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug)の発現を介してマウス VTAドーパミン作動性ニューロンの活性化を人工的に制御する系を構築する(図3)。



TH-Cre マウス:ドーパミン産生に必須なチロシン水酸化酵素(TH)遺伝子プロモーターの下流にCreリコンビナーゼ遺伝子を組み込んだマウス

ウイルスベクター: AAV8-hSyn-DIO-mCherry (コントロール)
AAV8-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry (活性化)
AAV8-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (抑制化)

図3. VTA活性化マウスの構築

3) 上記システムを用いて VTAドーパミン作動性ニューロンを活性化及び抑制化後、PCA 反応または全身アナフィラキシー反応を行い報酬経路がI型アレルギー反応に与える影響を検討する。

4 研究の成果

1) サッカリン水を用いた報酬経路の活性化によるI型アレルギー反応の抑制

過去の報告においてサッカリン(人工甘味料)水と水の2ボトルをケージにセットしある一定期間ラットを飼育することで選択的にサッカリン水を摂取するようになり、サッカリン水を摂取する割合がプラトーに達した際に報酬経路に関与する VTA および NA を含む複数の脳領域が活性化することが示されている(Dudek M et al. 2014)。そこで C57BL/6J マウスを水-サッカリン水の2ボトルケージで飼育し(図4A)、サッカリン水の給水量がプラトーに達した時点で PCA 反応を行った。

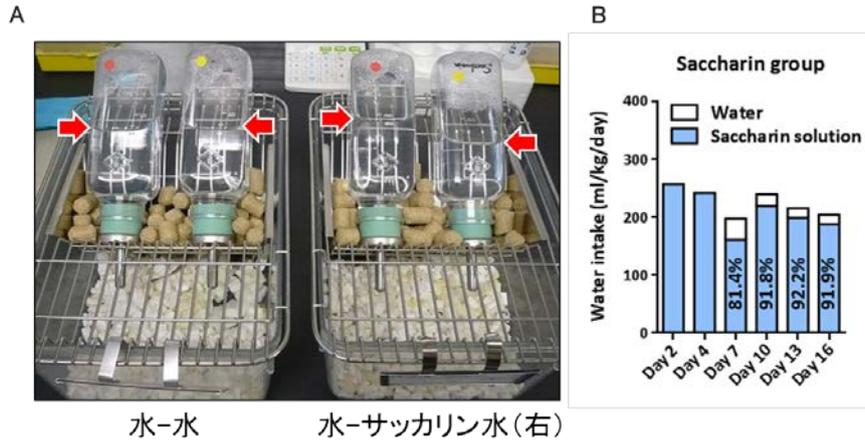


図4. 2ボトルケージによる飼育とサッカリン水給水率

マウスを水-水および水-サッカリン水の2ボトルをセットしたケージで飼育した結果、2週間以内に 90%以上の割合でサッカリン水を給水するようになり(図4B)、その時点においてPCA 反応を行なったところコントロール群(水-水の2ボトルケージ飼育群)と比較してPCA 反応の有意な減弱が見られた(図5)。

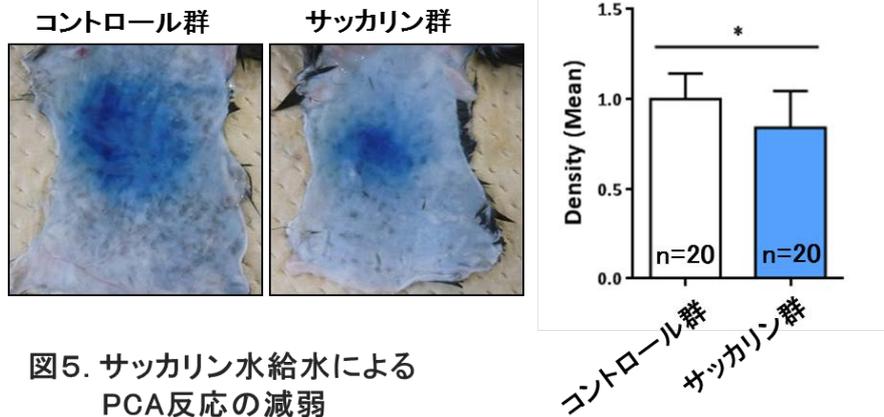


図5. サッカリン水給水によるPCA反応の減弱

またサッカリン水の2ボトル給水と同量のサッカリンを2週間経口投与し PCA 反応を行なった際には、PCA 反応の減弱は観察されなかった。経口投与ではサッカリン水を直接胃まで投与するため、マウスは味を感じず報酬経路の活性化はみられないものと考えられる。

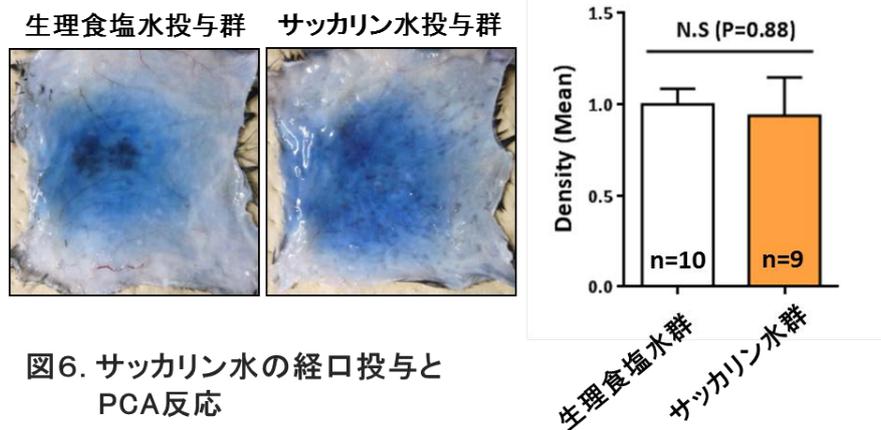


図6. サッカリン水の経口投与とPCA反応

これらの結果より甘い水を摂取した際の報酬経路を含む脳領域の活性化によりI型アレルギー反応が抑制される可能性が示唆された。

2) ウイルスペクター注入条件の検討

現在、Th-Cre マウスは米国ジャクソン研究所から購入し繁殖中である。そこで野生型 C57BL/6J を用いてウイルススペクターの注入条件の検討を行なった。使用したウイルススペクターは AAV1-hSyn-Cre および AAV1-CAG-FLEX-EGFP であり、両方のウイルススペクターが感染した神経細胞において緑色蛍光タンパク質(以下 GFP)を発現する。ウイルススペクター注入から4週間後に脳切片を作成し GFP の発現を観察することで最適なウイルススペクターの注入条件を検討した。

The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates(Paxinos and Franklin. 2012)を参考に注入位置を矢状縫合と冠状縫合との交点であるブレグマから-3.15 mm、両側±0.5 mm、深さ-4.0 mm および-4.8 mm と推測し(図7)、それぞれ 100、200、500、700、1000 nL のウイルススペクターを注入した(表1)。

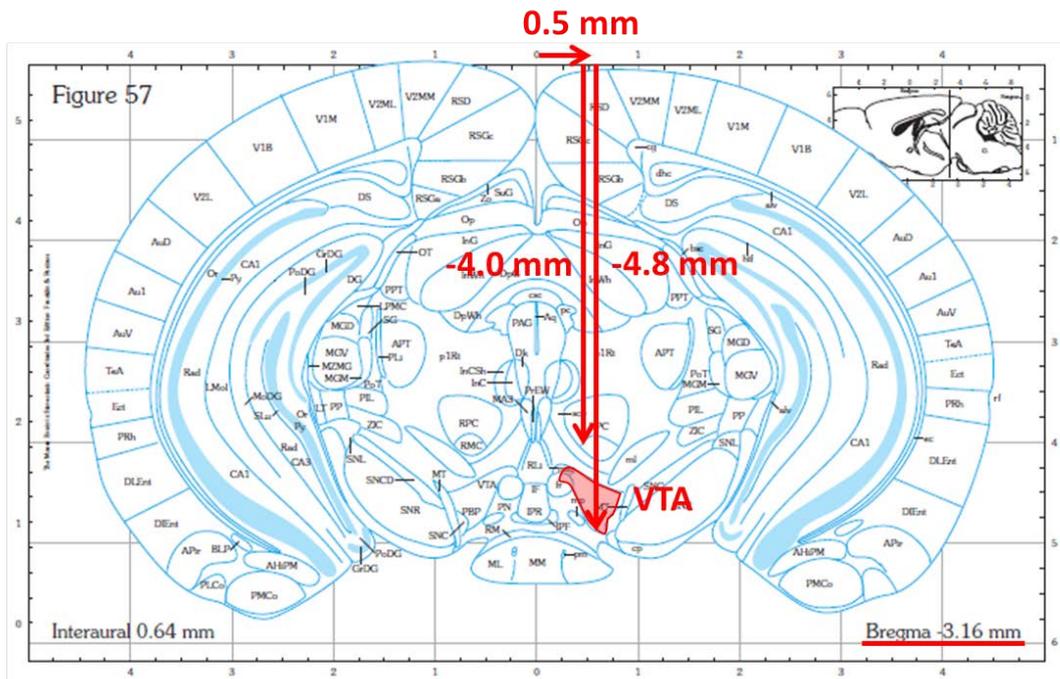


図7. マウス脳アトラスによるVTA領域へのウイルススペクター注入位置の検討

表1. 野生型 C57BL/6J マウス右脳へのウイルススペクター注入

No.	体重 (g)	注入位置(右脳のみ)	ウイルススペクター量 (nL)	
1	19	-3.15 mm; 0.48 mm; -4.0 mm	100	異常なし
2		-3.15 mm; 0.48 mm; -4.8 mm	100	異常なし
3	25	-3.07 mm; 0.47 mm; -3.9 mm	200	異常なし
4	23	-3 mm; 0.48 mm; -3.81 mm	500	左半身に異常あり
5	25	-3.29 mm; 0.5 mm; -4.19 mm	700	左半身に異常あり
6	19	-3.15 mm; 0.48 mm; -4.0 mm	1000	2週間後に死亡
7	23	-3.10 mm; 0.51 mm; -4.28 mm	1000	2週間後に死亡
8	22	-3.29 mm; 0.5 mm; -4.19 mm	1000	2週間後に死亡

GFP の発現領域をもとに VTA へのウイルススペクターの注入条件を検討したところ、1000 nL のウイルススペクター注入により VTA を含む広い範囲に GFP の発現が見られたものの(図8)、すべてのマウスがウイルススペクター注入後2週間程度で死亡した。また 500~700 nL のウイルススペクターを注入した際にはマウスは死亡しないものの左半身の異常がみられた。100~200 nL のウイルススペクターを注入した際には特に異常は観察されなかったため 200 nL 程度のウイルススペクター注入が適していると考えられた。

3.15 mm/0.48 mm/-4.0 mm (1000 nL)

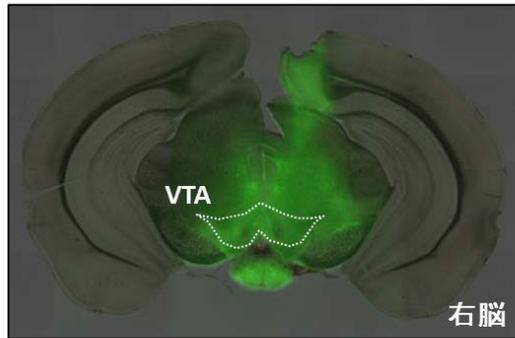


図8. 1000nLのウイルスベクター注入

また深さ-4.8 mm では VTA 領域への GFP の発現はほとんど見られず、主に乳頭核に GFP の発現が観察され、深さ-4.0 mm では VTA を含む領域に GFP が発現していることが観察された(図9)。

-3.15 mm; 0.48 mm; -4.8 mm (100 nL) -3.15 mm; 0.48 mm; -4.0 mm (100 nL)

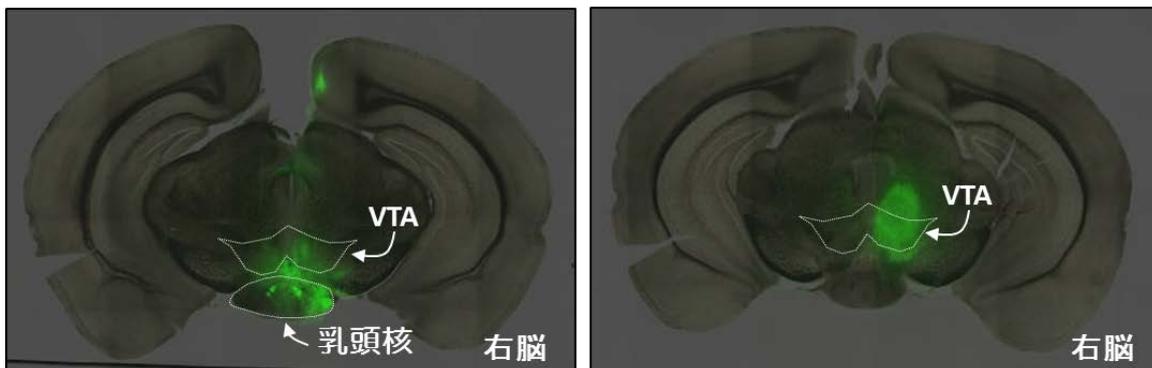


図9. ウイルスベクター注入深度に関する検討

これらの結果よりウイルスベクターの注入位置はブレグマから-3.15 mm、両側±0.5 mm、深さ-4.0 mm が最適であると決定した。

5 今後の展望

1) サッカリン水給水による VTA 活性化の検討

サッカリン水の給水により VTA 領域の神経細胞が活性化するか否かを検討する必要がある。水-サッカリン水の2ボトルケージで C57BL/6J マウスを飼育後、脳凍結切片を作成し神経細胞の活性化マーカーである c-Fos を指標に蛍光免疫染色を行う。ドーパミン作動性ニューロンのマーカーである TH と c-Fos の両方を発現する細胞を測定し VTA 領域のドーパミン作動性ニューロンの活性化の割合を検討する。

また報酬経路の活性化により社会的相互作用(ソーシャルインタラクション)の増加が見られることが報告されている。そこで水-サッカリン水の2ボトルケージで飼育後、社会的相互作用の変化を観察する。

2) Th-Cre マウスへのウイルスベクター注入と VTA 活性化の確認

野生型 C57BL/6J マウスを用いて決定したウイルスベクターの注入条件をもとに Th-Cre マウスに DREADD を発現するウイルスベクターを注入し、DREADD の発現を観察する。また実際に VTA ドーパミン作動性ニューロンが活性化されているか否かを検討するため、ウイルスベクターを注入した Th-Cre マウスに対し DREADD のリガンドを腹腔投与し VTA ドーパミン作動性ニューロンが活性化されているか否かを c-Fos の発現をもとに検討する。

3) VTA ドーパミン作動性ニューロンの活性化が I 型アレルギー反応に与える影響の検討

研究方法にも記載した通りである。Th-Cre マウスの VTAドーパミン作動性ニューロンに DREADD を発現させ報酬経路を人工的に活性化する。その際 PCA 反応を行うことで報酬経路の活性化が I 型アレルギー反応を抑制するか否か検討を行う。

6 研究成果の発信方法(予定を含む)

論文発表および学会・研究会(日本免疫学会、米国アレルギー学会等)における発表を介して研究成果を積極的に外部に発信する。また山梨大学医学部ホームページおよび申請者の所属する講座のホームページを利用して社会や国民に向けて研究成果の開示を積極的に行う。

<参考文献>

1. Wainwright NW, Surtees PG, Wareham NJ and Harrison BD. Psychosocial factors and incident asthma hospital admissions in the EPIC-Norfolk cohort study. *Allergy* **62**:554-560, 2007.
2. Rod NH, Kristensen TS, Lange P, Prescott E and Diderichsen F. Perceived stress and risk of adult-onset asthma and other atopic disorders: a longitudinal cohort study. *Allergy* **67**:1408-1414, 2012.
3. de la Fuente-Fernández R, Ruth TJ, Sossi V, Schulzer M, Calne DB and Stoessl AJ. Expectation and dopamine release: mechanism of the placebo effect in Parkinson's disease. *Science* **293**:1164-1166, 2001.
4. Scott DJ, Stohler CS, Egnatuk CM, Wang H, Koeppe RA and Zubieta JK. Placebo and nocebo effects are defined by opposite opioid and dopaminergic responses. *Arch Gen Psychiatry* **65**:220-231, 2008.
5. Dudek M, Abo-Ramadan U, Hermann D, Brown M, Canals S, Sommer WH and Hyttiä P. Brain activation induced by voluntary alcohol and saccharin drinking in rats assessed with manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Addict Biol* **20**:1012-1021, 2015.
6. Paxinos-G and Franklin-K. The mouse brain in stereotaxic coordinates, compact, third edition: The coronal plates and diagrams. Academic Press Cambridge, MA, 2008.