

1 研究テーマ

運動誘発性アナフィラキシーの病態解明

2 研究の背景・目的

現代社会において、アレルギー疾患は広く蔓延しており、日本では花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎などに苦しむ患者が国民の半数以上に及ぶとされている（図1）。なかでも、生命予後に関わる最も重篤な疾患がアナフィラキシーであり、本邦では毎年50~70人の死亡例が報告されている。アナフィラキシーの主な原因は食物アレルギーであり、原因食品を除去することで発症を予防できる。しかし、経口摂取のみでは症状が出ず、運動やNSAIDsの内服などの要因が加わることで発症する「運動誘発性アナフィラキシー」と呼ばれる特殊な病態も存在する。重要なことに、なぜ運動時にのみアナフィラキシーが発症するのか、その詳細な機序はいまだ解明されておらず、病態解明は、新たな予防法や治療法の開発につながる可能性がある。我々は、これまで圧力を感知する受容体PIEZ01とマスト細胞の関係性に着目し、アレルゲンとの結合がなくても、マスト細胞が直接的に圧力に応じて脱顆粒を引き起こすことを発見した。この圧力による脱顆粒には、アレルギー病態の誘因・増悪因子として知られるサイトカインIL-33が重要であり、興味深いことに、アナフィラキシーにおいてもIL-33が増悪因子として関与することが知られている。運動時には、腹圧の上昇、腸管蠕動の低下による食物の停滞、さらに腸管血流の低下による浮腫性変化などにより、腸管内圧が上昇すると考えられる。そのため、腸管マスト細胞とPIEZ01の関与が、運動誘発性アナフィラキシーの病態に寄与していることを証明することを目的に研究を行った（図1）。

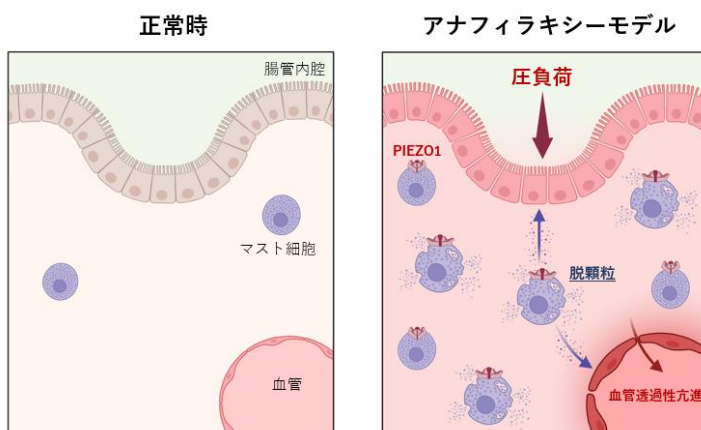


図1) 腸管におけるマスト細胞とアナフィラキシーの仮説

IL-33の全身的な上昇により、腸管内のマスト細胞が増加し、圧受容体PIEZ01の発現も亢進する。腸管内圧の上昇がマスト細胞の脱顆粒を引き起こし、アナフィラキシーを発症する可能性がある。

3 研究の方法

STEP1: IL-33投与マウスモデルにおけるアナフィラキシーの観察

マウスにIL-33を皮下注射し、腸管マスト細胞の増加並びにPIEZ01の共発現を確認するモデルを作成する。モデルの確立後、PIEZ01特異的アゴニスト(Yoda1)の全身投与を行い、体温低下や下痢などのアナフィラキシー症状の定量並びに、腸管蠕動の定量化(カルミンやガラスビーズを用いた計測)を行う。

STEP2: 食物アレルギーマウスモデルにおける PIEZO1 関与の確認

卵白アルブミン (OVA) をマウスに腹腔投与により感作させ、その後 OVA を経口投与することでアナフィラキシーを引き起こす食物アレルギーモデルを作成し、腸管マスト細胞の増加並びに PIEZO1 の発現を確認する。PIEZO1 アンタゴニスト (Dooku1, GsMTx4) の投与により、アナフィラキシー症状の変化を検討する。

STEP3: 運動誘発アナフィラキシーモデルの確立

速度調整が可能なトレッドミルの作成を山梨大学工学部附属ものづくり教育実践センターに依頼する。OVA 感作マウスにおいて、アナフィラキシーを生じさせない OVA の投与量を検討し、運動誘発によってアナフィラキシーを引き起こすか検討を行う。

4 研究の成果

STEP1:

IL-33 マウスモデルのプロトコルを確立し、免疫染色を用い、腸管のマスト細胞の増加並びに PIEZO1 の共発現を確認した (図 2A)。IL-33 投与後 Yoda1 を投与したマウス (IL-33/Yoda1) では、体温低下の増悪を認め、またマスト細胞欠損マウス ($KIT^{w-sh/w-sh}$) や抗ヒスタミン薬 Olopatadin の投与で減少したことから、マスト細胞の PIEZO1 を介した脱顆粒が寄与していることが考えられた (図 2B-D)。下痢症状も同様に IL-33/Yoda1 マウスでは増悪し、またカルミンを用いた小腸蠕動やガラスビーズでの直腸蠕動の定量でも IL-33/Yoda1 マウスで亢進していることを確認した (図 2E-G)。このことから、この実験系では、IL-33 で上昇したマスト細胞の PIEZO1 の脱顆粒によって体温低下、ならびに下痢のアナフィラキシー症状が誘発されることが示唆された。

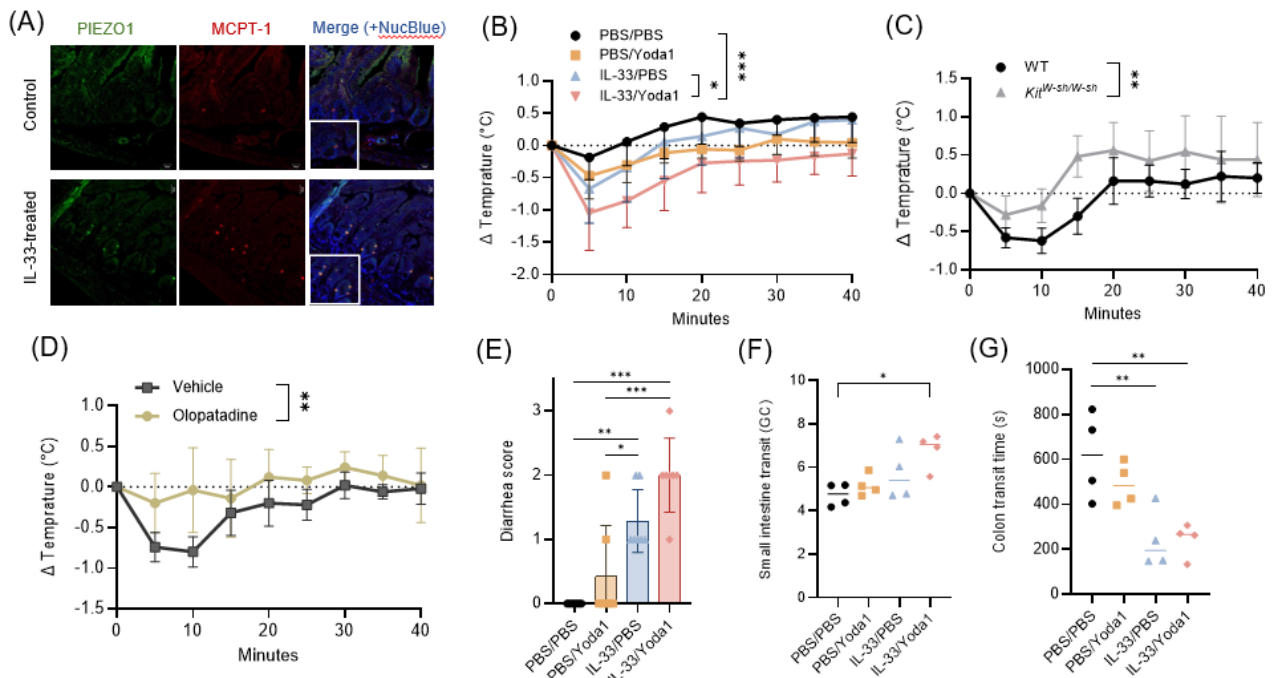


図 2) 図 2) IL-33 投与マウスにおける腸管マスト細胞 (MCPT-1 赤色) と PIEZO1 (緑) の免疫染色 (A) と体温低下の図 (マスト細胞欠損: $KIT^{w-sh/w-sh}$ 、抗ヒスタミン薬: Olopatadine) (B-D)、下痢症状 (E) と小腸 (F)、大腸 (G) の蠕動速度の定量図

STEP2:

食物アレルギーモデルでも同様に、腸管マスト細胞の増加並びに PIEZO1 の共発現を来していること確認した (図 3A)。Dooku1, GsMTx4 の PIEZO1 アンタゴニスト投与マウスでは体温低下は軽減し、下痢症状も軽快していた (図 3B, C)。このことから、PIEZO1 はアナフィラキシー症状の増悪に寄与していたことが示唆された。

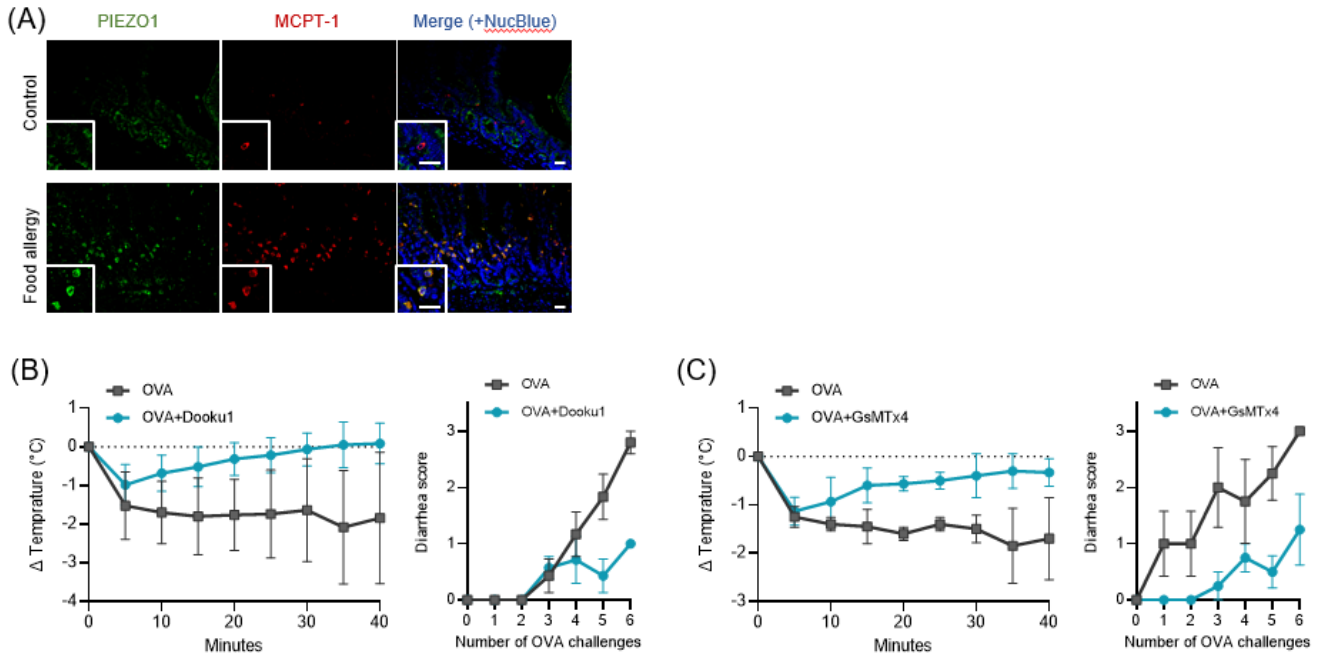


図 3) マウスにおける腸管マスト細胞 (MCPT-1 赤色) と PIEZO1 (緑) (A) と PIEZO1 アンタゴニスト投与による体温低下、下痢症状の図 (B, C)

STEP3:

マウスをトレッドミル (山梨大学工学部附属ものづくり教育実践センター制作) で段階的に速度の上昇を行い、既報と同様の 12m/s で走行可能なことを確認した。

次に、OVA を感作させたマウスに、OVA を腹腔投与したのみでは体温低下を来さない条件を検討した。この条件下で、トレッドミルで運動させた (12m/s 10 分間) マウスでは、体温低下が誘発されることを確認した (図 4)。

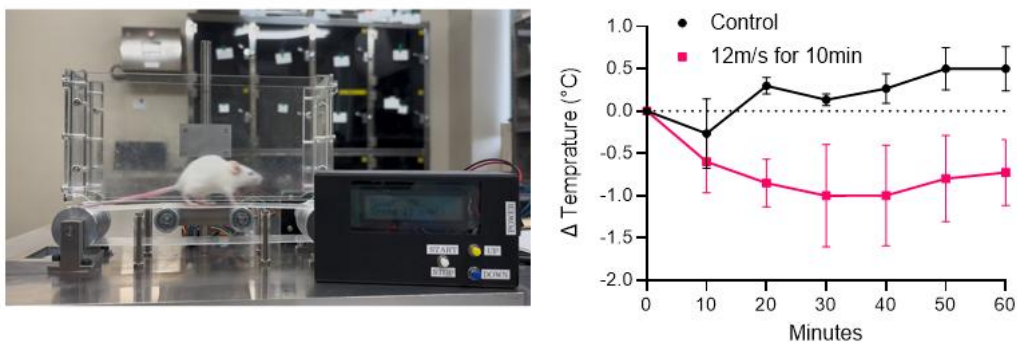


図 4) トレッドミルによるマウスの運動の様子 (左) と体温低下の図 (赤線が運動したマウス)

5 今後の展望

本研究では、IL-33 が腸管マスト細胞を増殖させるのみならず PIEZO1 の発現も亢進させること、ならびに、PIEZO1 の刺激によりアナフィラキシーを引き起こすことが確認できた。また食物アレルギーモデルにおいても、PIEZO1 の阻害により、アナフィラキシー症状が軽減することが証明できた。一方で、STEP3 である運動誘発アナフィラキシーモデルは概ね確立できたが、この系において前途した IL-33 マウスモデルや食物アレルギーモデルにおける検討は未だできていない状況である。この実験系をさらに検証し、運動誘発アナフィラキシーの臨床に沿ったモデルを作成していきたいと考えている。腸管の蠕動は定量化することができたが、実質的な腸管内圧力と PIEZO1 の関係性はまだできていない。こちら蠕動による圧力変化を定量化できる装置を山梨大学工学部附属ものづくり教育実践センターと協力しながら検証していきたい。

また、本研究では全身的に PIEZO1 のアゴニスト、アンタゴニストを投与して検証した。実際、PIEZO1 は腸管上皮細胞や神経にも発現しているため、薬剤投与の実験のみでは、他の細胞の関与が否定できていない。今後、マスト細胞特異的 PIEZO1 ノックアウトマウスの作成により、より明確にアナフィラキシーにおけるマスト細胞と圧負荷の関係性が証明できるものと期待される。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

前途した結果に加え、追加の検証も行い、論文投稿準備中である。アクセプト後は、山梨大学のプレスリリース、SNS を活用して、新聞、テレビ、雑誌、ネットなどの媒体を通じて広く世界へ発信する予定である。