

令和元年6月27日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09926

研究課題名(和文) Periostinによるマスト細胞の活性化とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of mast cell activation by periostin

研究代表者

布村 聡 (Nunomura, Satoshi)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：70424728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞外マトリクスとして知られるペリオスチンのマスト細胞活性化修飾作用についての解析を行った。その結果、ペリオスチンはIgEによるマスト細胞の脱顆粒反応を増強させる作用を持つことが明らかとなった。マスト細胞の脱顆粒は、アレルギー応答を惹起するするため、その応答を増強させるペリオスチンはアレルギー疾患の治療戦略にける分子標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、IgE受容体を介したマスト細胞の活性化の一つである脱顆粒応答がペリオスチンとの相互作用によって増強されることを見出した。アトピーなどの病的な炎症を起こしている組織では、ペリオスチンの沈着が顕著であり、炎症の現場ではペリオスチンがマスト細胞の活性化をさらに亢進させていると考えられる。本研究の成果により、ペリオスチンとマスト細胞の接着機構が、増大した炎症反応の新たな分子標的と成り得ることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have suggested that periostin, a matricellular protein, plays an important role in the development of allergic inflammation by interacting with its receptor α 4 β 1 integrin of fibroblasts and epithelial cells. However, the functions of periostin on immune cells are unclear. Mast cells are central effector cells of allergic reactions. Thus, we investigated whether periostin has the potential to induce or modulate mast cell activation via α 4 β 1 integrin. In this study, we demonstrated that periostin, immobilized on a culture plate, augments IgE-mediated degranulation response and LTC₄ production by adhering with murine mast cells. The amplifying effect of periostin on degranulation required Mg²⁺. However, CP4715, an α 4 β 1 integrin inhibitor, had no suppressive effects on adhesion and enhancement of degranulation, which suggests that other integrins are involved in periostin-mediated enhancement of mast cell activation as receptor.

研究分野：アレルギー炎症学

キーワード：ペリオスチン マスト細胞 脱顆粒 細胞外マトリクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Periostinは、我々がTh2サイトカインであるIL-4/IL-13の誘導遺伝子の一つとして同定した細胞外マトリックスタンパク質である(Yuyama, Cytokine, 2002)。Periostinとアレルギー性炎症への関与について解析した結果、Periostinは線維芽細胞や表皮細胞に作用し、アトピー性皮膚炎をモデルとしたアレルギー性炎症を慢性化させることを見出した(Masuoka, J Clin Invest, 2012; Taniguchi, J Invest Dermatol, 2014)。マスト細胞は、アレルギー性炎症の発症に係る重要な免疫細胞であり、線維芽細胞は、細胞間相互作用によりマスト細胞の分化・増殖、外界刺激に対する炎症反応を促進させることが示されている(Taketomi, Nat Immunol, 2013)。これらの知見は、線維芽細胞とマスト細胞がお互いの細胞応答に密接に影響を及ぼし合うことを強く示唆している。マトリセルラータンパク質とマスト細胞との関連については、Osteopontinが、FcεRIを介したマスト細胞の脱顆粒(Histamine放出)を亢進することが報告されている(Nagasaka, Eur. J. Immunol, 2008)。Osteopontinとは異なり、Periostinの免疫系細胞への作用は長らく不明であったが、好酸球の遊走を誘導することが近年報告された(Sherrill, Mucosal Immunity, 2014)。マスト細胞は、機能的なPeriostin受容体(αv Integrin)を発現していること(Oki, J Biol Chem, 2006) 組織構成細胞と密接な関係にあること(Taketomi, Nat Immunol, 2013)からPeriostinの標的となる可能性が考えられる。しかしながら、好酸球以外の免疫系細胞へのPeriostinの作用は報告されておらず、マスト細胞との係りも明らかではなかった。

2. 研究の目的

我々は、マトリセルラータンパク質であるPeriostinのIntegrinを介した組織構築細胞の活性化が、アレルギー性炎症の慢性化に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。しかしながら、Periostinによる免疫系細胞の活性化とアレルギー性炎症慢性化との関連については、明らかにされていない。本研究ではPeriostinのマスト細胞活性化能、責任分子(Integrin)の同定を目的とした。本研究により、Periostinを分子標的とした新たな治療戦略を見出すことが期待される。

3. 研究の方法

マウス骨髄由来の培養マスト細胞を用いて、Periostinの作用をin vitroで解析する。サイトカインの産生については、ELISAにより定量的にタンパク量の測定を行った。マスト細胞のPeriostin受容体となるαv Integrinの役割については、αv Integrin阻害剤の効果によって検証した。最終的に、生体内でのPeriostinのマスト細胞活性化への影響についてノックアウトマウスを用いた検証を行った。

Periostinによるマスト細胞活性化能解析

我々がこれまでに行ってきた方法(Nunomura, BBRC, 2015)に従って、BALB/cマウスの大腿骨髄からIL-3存在下で培養したマスト細胞(BMMC)の調製を行った。培養プレートに固相化したPeriostin上にBMMCを接種し、Periostinとマスト細胞との細胞間接着を評価した。Periostinとの特異的な接着を確認後、培養上清中のメディエーター産生量を解析した。IL-13およびIL-6の産生量をELISAにより測定した。LTC4はEIAにより測定した。脱顆粒については-hexosaminidaseの遊離を指標にして評価を行った。

FcεRI刺激によるマスト細胞活性化修飾作用

Periostin と TNP 特異的 IgE+TNP-BSA との共刺激を行った際の脱顆粒, IL-13 および IL-6 産生について解析を行った。培養プレートに固相化した Periostin 上に BMMC を接種し, 培養上清中サイトカイン量(IL-13 および IL-6), LTC4 量, α -hexosaminidase の遊離率を解析した。

マスト細胞の Periostin 受容体の機能解析

α v Integrin 阻害薬(CP4715)で BMMC を前処理した後に, 培養プレートに固相化した Periostin 上に細胞を接種し, α v Integrin 阻害薬による前処理を行わなかった BMMC との違いについて検討を行った。検討した項目は, Periostin への接着能, Fc ϵ R1 刺激による脱顆粒応答であった。

ノックアウトマウスを用いた検証

BALB/c 系統の Periostin KO マウスおよび野生型マウスの皮内に TNP 特異的 IgE を投与した後に, TNP-BSA をエバンスブルーとともに静脈注射し, マスト細胞による PCA 反応における違いの有無について検討を行った。

4. 研究成果

Periostin によるマスト細胞活性化能解析

Periostin とマスト細胞との特異的な細胞間接着を評価した。この接着には Mg²⁺イオンの要求性が認められた。しかしながら, 培養上清中の IL-13 および IL-6 の産生量, LTC4 産生量, α -hexosaminidase の遊離率に接着による変化を認めなかったことから, Periostin は直接的にマスト細胞の活性化を誘導しないことが明らかとなった。

Fc ϵ R1 刺激によるマスト細胞活性化修飾作用

そこで次に, Fc ϵ R1 を介したマスト細胞の活性化を誘導した際に Periostin との接着が影響をおよぼすか解析を行なった。その結果, ペリオスチンとの接着 Fc ϵ R1 刺激による LTC4 産生, α -hexosaminidase の遊離(脱顆粒反応)が有意に増強された。特に脱顆粒については, 脱顆粒を惹起に必要な抗原量を顕著に減少させたことから, 抗原に対する感受性を亢進させる作用を持つものであった。この増強作用には, Mg²⁺イオンの要求性が認められ, また単に可溶化させた Periostin を添加しただけでは増強されなかったことから固相化した Periostin との接着が重要であることが明らかとなった。この事は, 生体内においては組織に沈着した Periostin とマスト細胞が接着により相互作用する際に, その作用を発揮する可能性を示唆している。

マスト細胞の Periostin 受容体の機能解析

Periostin との接着は, マスト細胞上の α v Integrin を介しているのか明らかにするために, α v Integrin 阻害薬(CP4715)の活性化増強におよぼす効果を解析した。CP4715 の前処理にもかかわらず, 接着, 脱顆粒増強ともに非前処理群との有意な差を認めなかった。この結果は, Periostin と BMMC との接着および脱顆粒増強作用は, α v Integrin 以外の Integrin が関与していることを示すものであった。

ノックアウトマウスを用いた検証

生体内における Periostin がマスト細胞の脱顆粒を増強しているのかを確認するために, KO マウスを用いて IgE による PCA 反応を解析した。Periostin KO マウスにおいても野生型マウスと同様の PCA 反応が誘導された。この結果は, 定常状態における Periostin の

組織沈着レベルではマスト細胞の活性化を増強できないことを示すものであり、病的に Periostin が過剰発現した状態を模倣する状況下においての検証が今後必要となると考えられた。

本研究により、Periostin が組織に沈着した状態を模倣すると（固相化）、FcεRI を介したマスト細胞の活性化をさらに増強し、脱顆粒誘導刺激の閾値を下げる事が明らかとなった。これらの結果は、Periostin とマスト細胞間の接着機構が新たな分子標的となる可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1: Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, Ono J, Takai M, Kawaguchi A. Periostin: An emerging biomarker for allergic diseases. Allergy. 2019 in press. doi: 10.1111/all.13814.

2: Nunomura S, Ejiri N, Kitajima M, Nanri Y, Arima K, Mitamura Y, Yoshihara T, Fujii K, Takao K, Imura J, Fehling HJ, Izuhara K, Kitajima I. Establishment of a Mouse Model of Atopic Dermatitis by Deleting Ikk2 in Dermal Fibroblasts. J Invest Dermatol. 2019;139(6):1274-1283. doi: 10.1016/j.jid.2018.10.047.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：出原 賢治

ローマ字氏名：Izuhara Kenji

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00270463

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。