

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15122

研究課題名(和文) Non-canonical脂質代謝軸によるマスト細胞の新しい制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of mast cell function by non-canonical lipid pathway

研究代表者

武富 芳隆 (Taketomi, Yoshitaka)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40365804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管外組織常在性のマスト細胞は異物の排除応答に関わる一方、この過剰反応は即時型アレルギー性炎症として顕在化する。本研究では脂質の視点からマスト細胞の新規調節機構の解明に取り組んだ。従来のマスト細胞研究の主流であるマスト細胞の「活性化」ではなく、その前段階、すなわちマスト細胞の前駆細胞が組織微小環境との相互作用を通じて「増殖・成熟」し、適切な応答性を獲得するプロセスに着眼し、既成概念であるアラキドン酸代謝とは異なる複数のnon-canonical脂質経路(リゾリン脂質-GPR26経路、PLA2G7B-3エポキシド経路)が組織微小環境依存的なマスト細胞の量と質の調節に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase A2s (PLA2s) are a group of enzymes that hydrolyze phospholipids to yield fatty acids and lysophospholipids, which serve as precursors for a variety of lipid mediators. It is currently acknowledged that classical lipid mediators such as arachidonic acid metabolites produced by PLA2s modulate mast cell-associated immune response. Moreover, mast cells express a variety of PLA2s or lipid receptors and can alter the release and production of other mediators including histamine, cytokines and chemokines, and thereby homeostatic or pathophysiological responses. Our current studies on newly acknowledged functional aspects of individual PLA2s or lipid receptors in mast cell-mediated immediate-type allergy in relation to non-canonical lipid pathway revealed that (1) the novel regulation of mast cells by a lipid mediator other than classical arachidonate metabolites and (2) the novel PLA2-driven lipid mediator pathway in the regulation of mast cell quality.

研究分野：脂質生物学

キーワード：マスト細胞 アレルギー 脂質代謝 ホスホリパーゼA2 生理活性脂質 リピドミクス

1. 研究開始当初の背景

血管外組織常在性のマスト細胞は異物の排除応答に関わる一方、この過剰反応は即時型アレルギー性炎症として顕在化する。従来のマスト細胞研究の主流はマスト細胞の「活性化」にあり、生理活性脂質のマスト細胞からの産生やマスト細胞への作用について解析されてきた (*J Immunol* 2014, *J Biol Chem* 2011)。一方、マスト細胞活性化の前段階、すなわちマスト細胞の前駆細胞が組織微小環境との相互作用を通じて「増殖・成熟」し、適切な応答性を獲得 (priming) するプロセスは、サイトカインなどのタンパク質因子により調節されることが示唆されてきたものの、脂質の役割については未知であった。受給者らは、マスト細胞の前駆細胞由来の細胞外リン脂質代謝酵素 PLA2G3 がパラクリン因子として局所微小環境の生理活性脂質 (PGD₂) を動員することで、マスト細胞の成熟のプロセスを仲介することを世界に先駆け報告した (*Nat Immunol* 2013)。

受給者はこれらの実績を更に展開し、組織微小環境依存的なマスト細胞の量と質の調節に、従来とは別の複数の脂質代謝経路が関わる可能性が新たに浮上してきた。これを契機に、受給者はこの機能性脂質の実体とその動員経路を同定することを構想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、既成概念であるアラキドン酸代謝とは異なる non-canonical 脂質経路によるマスト細胞の新規調節機構を解明することである。マスト細胞微小環境における脂質代謝酵素・受容体群の網羅的発現解析、マスト細胞機能に対する各種脂質の作用の薬理的検証、および脂質関連分子の欠損マウスを用いたマスト細胞応答性に関する包括的スクリーニングを通じて、下記の予備的知見を得た。マスト細胞には機能不明の PLA₂ 分子種や脂質受容体が複数発現している。当該 PLA₂ や受容体の欠損マウスでは組織マスト細胞の機能が変容する。アラキドン酸代謝物以外の脂質が培養マスト細胞の機能に影響を与える。これらの発見は、生体内にはマスト細胞の機能を調節する未知の脂質経路がまだ複数隠れていることを示唆している。そこで本研究では、脂質関連分子のマスト細胞機能 (分化・遊走・成熟・活性化) における役割を解明するとともに、これに関わる新規脂質経路を同定することで、当該脂質経路の阻害あるいは賦活化によるアレルギー疾患の新規予防治療戦略を提唱する。

3. 研究の方法

脂質関連分子の欠損マウスが発症するマスト細胞関連の表現型について、IgE 依存的・非依存的な即時型アレルギー応答性 (全身性および皮膚受動感作アナフィラキシー)、組織マスト細胞の数や分化・成熟マーカーの発現、骨髓由来初代培養マスト細胞の活性化 (脱顆粒・脂質メディエーター産生、サイトカイン産生)、IgE-抗原依存的な高親和性 IgE 受容体 (FcεRI)

シグナリング、などを解析した。必要に応じ、マスト細胞と線維芽細胞を接触培養することで生体内におけるマスト細胞微小環境を再現した。

脂質関連分子の欠損によるマスト細胞の変容がマスト細胞に発現している当該分子に依存するかを検証すべく、マスト細胞欠損マウスに骨髓由来マスト細胞を移植再構成し、発症する表現型を全身性欠損マウスと比較した。マウスの解析により得られた結果がヒトにも当てはまるかについて、ヒト組織由来初代培養マスト細胞を用いて同様の検討を行った。脂質メタボローム解析 (リピドミクス) より、マスト細胞応答に伴い産生される脂質、あるいは野生型群と比べ欠損群の方で減少する脂質を探索した。

4. 研究成果

マスト細胞成熟に関わる新規脂質経路

リゾリン脂質受容体を対象とした即時型アレルギー応答の包括的解析により、GPR26 欠損マウスにおいて、IgE 依存的・非依存的な全身性および皮膚受動感作アレルギー応答が軽減した。欠損マウスの組織マスト細胞は FcεRIα の表面発現の低下と顆粒内ヒスタミン含量の低下を特徴とする成熟不全を生じていた。したがって、GPR26 欠損マウスでは、組織マスト細胞が未成熟であるためマスト細胞の活性化が減弱し、即時型アレルギー応答が改善したものと考えられる。

局所環境依存的なマスト細胞の成熟培養において、GPR26 は局所環境側 (線維芽細胞) に高く発現しており、これに続きマスト細胞側にも検出され、ともにマスト細胞と線維芽細胞の相互作用により発現が増加した。マスト細胞と線維芽細胞のそれぞれの GPR26 の欠損、あるいは GPR26 拮抗薬による阻害によってマスト細胞の成熟は不全を生じた。これらの結果から、LPA-GPR26 経路は局所環境依存的なマスト細胞の成熟に必要な不可欠であることが判明した。

GPR26 欠損の表現型は PLA2G3 欠損の場合と類似していることから、PLA2G3 によって GPR26 のリガンドであるリゾホスファチジン酸 (LPA) が産生され、これが GPR26 を介してマスト細胞の成熟を制御する可能性を想定した。PLA2G3 欠損マウスの皮膚中では、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) および LPA が減少していた。リゾリン脂質は LPA 産生酵素であるオートタキシン (ATX) により LPA へと変換される。このことから、未成熟マスト細胞から分泌される PLA2G3 は細胞外リン脂質 (エクソソームなど) を代謝し、産生された LPE が ATX により LPA へと変換され、線維芽細胞 (あるいはマスト細胞) の GPR26 に作用することで、マスト細胞は成熟へと導かれるものと推測される。今後、sPLA₂-III による LPA の動員プロセスおよび線維芽細胞における LPA-GPR26 シグナルが制御するマスト細胞成熟の動作原理を解明する。

マスト細胞クオリティ制御に関わる新規脂質経路 (*Nat Med* 2017)

マスト細胞は IgE-抗原刺激によってアラキドン酸代謝物 (PGD₂, LTB₄, LTC₄ など) を産生する

一方、 ω 3 高度不飽和脂肪酸である EPA や DHA の ω 3 位にエポキシ環を持つ ω 3 エポキシド (17,18-EpETE や 19,20-EpDPE) を常時産生していた。この ω 3 エポキシドの産生は、マスト細胞に高発現している PLA₂ 分子群のうち PLA2G7B の欠損によってのみ著減した。リポドミクスにより、マスト細胞の細胞膜には *sn*-2 位に ω 3 エポキシドを含有するエポキシ化リン脂質が存在し、PLA2G7B はそこから ω 3 エポキシドを直接切り出した。

PLA2G7B の欠損もしくは特異的阻害剤の投与によって、IgE-抗原依存的なマスト細胞の活性化およびアレルギー応答は軽減した。一方、PLA2G7B の欠損または阻害は組織マスト細胞の数や成熟度、IgE 非依存的なアレルギー応答には影響を及ぼさなかった。IgE-抗原依存的な Fc ϵ R1 シグナリングについて、PLA2G7B 欠損マスト細胞では、刺激に伴う Src ファミリーキナーゼ Lyn や Fyn, Fc ϵ R1 β 鎖のリン酸化が十分に起こらず、そのため全てのエフェクター機能が低下した。ここに ω 3 エポキシドを連日にわたり添加すると、PLA2G7B 欠損マスト細胞の活性化は野生型マスト細胞と同等にまで回復した。したがって、PLA2G7B 欠損マウスでは、マスト細胞の膜リン脂質プールからの ω 3 エポキシドの遊離が低下することで Fc ϵ R1 依存的な活性化が低減し、即時型アレルギーが改善するものと考えられる。

ω 3 エポキシドの作用が酸化脂肪酸をリガンドとし得る核内受容体と関連することを想定した。核内受容体 PPAR γ の拮抗薬は、 ω 3 エポキシドと同様に PLA2G7B 欠損マスト細胞の活性化や即時型アレルギー応答を正常レベルにまで回復させた。網羅的遺伝子解析の結果、PLA2G7B 欠損マスト細胞に ω 3 エポキシドを添加した場合に発現変動する 70% 以上の遺伝子は、PPAR γ 拮抗薬の添加によっても同様に発現変動したことから、 ω 3 エポキシドの作用の少なくとも一部は PPAR γ 経路の遮断によるものと推察される。

これらの遺伝子のうち、 ω 3 エポキシドにより発現が減少する遺伝子として Srcin1 (Src ファミリーキナーゼは C 末端領域がチロシンキナーゼ Csk によりリン酸化されると不活性化されるが、Srcin1 は Csk と Fyn, Lyn を同時にリクルートすることで Fyn, Lyn の活性を抑制する) が同定された。Srcin1 をノックダウンすると PLA2G7B 欠損マスト細胞の応答性は回復した。すなわち、 ω 3 エポキシドは PPAR γ 経路を遮断することにより Srcin1 の発現を低下させ、Lyn や Fyn のリン酸化の亢進を通じてマスト細胞の活性化を促すものと考えられる。

以上より、PLA2G7B は構成的にマスト細胞内のエポキシ化リン脂質を分解して ω 3 エポキシドを切り出し、これが PPAR γ 依存的に Srcin1 の発現を減少させ、Fc ϵ R1 シグナルを亢進することによってマスト細胞の活性化を適正化するものと結論づけた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 16 件)

・原著論文

1. Shimanaka Y, Kono N, Taketomi Y, Arita M, Okayama Y, Tanaka Y, Nishito Y, Mochizuki T, Kusuhara H, Adibekian A, Cravatt BF, Murakami M, Arai H. Omega-3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation. *Nat Med* 23, 1287-1297, 2017. (doi: 10.1038/nm.4417. Epub 2017 Oct 9) 査読あり、プレス発表 1, 2
2. Murase R, Taketomi Y, Miki Y, Nishito Y, Saito M, Fukami K, Yamamoto K, Murakami M. Group III phospholipase A₂ promotes colitis and colorectal cancer. *Sci Rep* 7, 12261-12273, 2017. (doi:10.1038/s41598-017-12434-z. 2017 Sep 25) 査読あり
3. Aikawa S, Kano K, Inoue A, Wang J, Saigusa D, Nagamatsu T, Hirota Y, Fujii T, Tsuchiya S, Taketomi Y, Sugimoto Y, Murakami M, Arita M, Kurano M, Ikeda H, Yatomi Y, Chun J, Aoki J. Autotaxin-lysophosphatidic acid-LPA₃ signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways. *EMBO J* 36, 2146-2160, 2017. (doi: 10.15252/embj.201696290. Epub 2017 Jun 6) 査読あり
4. Shigematsu M, Koga T, Ishimori A, Saeki K, Ishii Y, Taketomi Y, Ohba M, Jo-Watanabe A, Okuno T, Harada N, Harayama T, Shindou H, Li JD, Murakami M, Hoka S, Yokomizo T. Leukotriene B₄ receptor type 2 protects against pneumolysin-dependent acute lung injury. *Sci Rep* 6, 34560, 2016. (doi: 10.1038/srep34560. 2016 Oct 5) 査読あり
5. Tanigawa H, Miyata K, Tian Z, Aoi J, Kadomatsu T, Fukushima S, Ogata A, Takeda N, Zhao J, Zhu S, Terada K, Endo M, Morinaga J, Sugizaki T, Sato M, Morioka MS, Manabe I, Mashimo Y, Hata A, Taketomi Y, Yamamoto K, Murakami M, Araki K, Jinnin M, Ihn H, Oike Y. Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis. *Sci Rep* 6, 34690, 2016. (doi: 10.1038/srep34690. 2016 Oct 4) 査読あり
6. Yamamoto K, Miki Y, Sato H, Nishito Y, Gelb MH, Taketomi Y, Murakami M. Expression and function of group IIE phospholipase A₂ in mouse skin. *J Biol Chem* 291, 15602-15613, 2016. (doi: 10.1074/jbc.M116.734657. Epub 2016 May 23) 査読あり
7. Miki Y, Kidoguchi Y, Sato M, Taketomi Y, Taya C, Muramatsu K, Gelb MH, Yamamoto K, Murakami M. Dual roles of

group IID phospholipase A₂ in inflammation and cancer. *J Biol Chem* 291, 15588-15601, 2016. (doi: 10.1074/jbc.M116.734624. Epub 2016 May 21) 査読あり

・総説論文

8. Yamamoto K, Miki Y, Sato H, Murase R, Taketomi Y, Murakami M. Secreted phospholipase A₂ specificity on natural membrane phospholipids. *Methods Enzymol* 583, 101-117, 2017. (doi: 10.1016/bs.mie.2016.09.007. Epub 2016 Nov 22) 査読あり
9. Murakami M, Yamamoto K, Miki Y, Murase R, Sato H, Taketomi Y. The roles of the secreted phospholipase A₂ gene family in immunology. *Adv Immunol* 132, 91-134, 2016. (doi: 10.1016/bs.ai.2016.05.001. Epub 2016 Jun 11) 査読あり
10. Sato H, Taketomi Y, Murakami M. Metabolic regulation by secreted phospholipase A₂. *Inflamm Regen* 36, 7, 2016. (doi: 10.1186/s41232-016-0012-7. Published: 2016 May 21) 査読あり

・邦文総説

11. 武富芳隆, 村上誠. 脂質代謝と喘息. *分子呼吸器病* 22, 18-21, 2018. 2018年3月1日発刊
12. 武富芳隆, 村上誠. PLA₂とアレルギー. *アレルギー・免疫* 25, 44-53, 2018. 2018年2月25日発刊
13. 武富芳隆, 村上誠. 分泌性ホスホリパーゼ A₂と炎症性疾患. *医学のあゆみ* 264, 137-143, 2018. 2018年1月13日発刊
14. Taketomi Y, Murakami M. Immunological regulation by bioactive lipids. *Yakugaku Zasshi* 137, 503-515, 2017. doi: 10.1248/yakushi.16-00239-2. 2017年5月1日発刊
15. 武富芳隆, 村上誠. 脂質代謝による自然免疫・アレルギーの制御. *アレルギーの臨床* 37, 58-62, 2017. 2017年3月20日発刊
16. 武富芳隆, 村上誠. 肥満細胞と脂質メディエーター. *皮膚アレルギーフロンティア* 14, 19-24, 2016. 2016年7月15日発刊

[学会発表] (計11件)

1. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. 脂質代謝によるアレルギー性疾患制御. アレルギー治療 update フォーラム. 2018年3月30日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
2. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. 脂質代謝によるアレルギー性疾患の制御. 三重ピラニア錠発売1周年記念講演会. 2018年1月18日, プラザ洞津(三重県津市)
3. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. 脂質代謝による炎症・アレルギーの制御. 第41回星薬科大学大学院研究科助手会・大学院自治会合同公開セミナー. 2017年10月7日, 星

薬科大学(東京都品川区)

4. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. 生理活性脂質代謝と免疫アレルギー疾患. 第19回応用薬理シンポジウム. アレルギー疾患と創薬. 2017年9月16日, 明治薬科大学(東京都清瀬市)
5. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. アレルギーと脂質メディエーター. 第22回那須ティーチン. 2017年7月29日, ホテルマリナーズ東京(東京都中央区)
6. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. 表皮の脂質代謝とアレルギー疾患. 第38回日本炎症・再生医学会. 2017年7月18日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
7. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. 生理活性脂質による炎症・アレルギーの制御. 第66回日本アレルギー学会. 2017年6月16-18日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
8. 武富芳隆, 宮崎拓郎, 三木寿美, 佐藤弘泰, 村上誠. III型分泌性ホスホリパーゼ A₂は動脈硬化の新規増悪因子である. 第89回日本生化学会大会. 2016年9月25-27日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)
9. 招待講演:武富芳隆, 村上誠. 脂質によるアレルギー制御の新機軸. 第65回日本アレルギー学会. 2017年6月17-19日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
10. 武富芳隆, 砂川アンナ, 入江敦, 山本圭, 三木寿美, 佐藤弘泰, 小林哲幸, 村上誠. マスト細胞を制御する第二の Anaphylactic sPLA₂の同定. 第58回日本脂質生化学会. 2016年6月9, 10日, にぎわい交流館 AU(秋田県秋田市)
11. 武富芳隆. 脂質代謝による免疫アレルギー疾患制御の新機軸. 第5回 TOBIRA 交流研究フォーラム. 2016年5月23日, ソラシティカンファレンスセンター(東京千代田区)

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

・プレス発表

1. 体に優しいオメガ3脂肪酸の意外な側面: オメガ3脂肪酸を動かしてアレルギーを促す酵素の発見. 国立研究開発法人日本医療研究開発機構. 2017年10月10日 (http://www.amed.go.jp/news/release_2017_1010-01.html)
2. 嶋中雄太, 河野望, 村上誠, 新井洋由. エポキシ化 3脂肪酸は免疫グロブリン E に依存的なマスト細胞の活性化を制御する. ライフサイエンス 新着論文レビュー. 2017年11月6日

(<http://first.lifesciencedb.jp/archives/17335#more-17335>)

・ホームページ

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門(村上研究室)
http://lmmhs.m.u-tokyo.ac.jp/home_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武富 芳隆 (TAKETOMI, Yoshitaka)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40365804

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

村上 誠 (MURAKAMI, Makoto)