

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19607

研究課題名(和文) マスト細胞のフェノティピック・コンバージョンと慢性脂肪炎症を繋ぐ分子シグナル

研究課題名(英文) Role of mast cells in adipose-derived chronic inflammation

研究代表者

藤岡 数記(Fujioka, Kazuki)

京都府立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：30762174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織が慢性炎症という観点で種々の疾患に関与していることが知られている。これらの病態において脂肪組織中のマクロファージが重要な役割を担っていることが明らかになってきているが、近年マスト細胞の関与についても知られるようになった。しかしその具体的なメカニズムは明らかではない。我々は脂肪細胞がマスト細胞に与える影響を検証し、マスト細胞の性質がマクロファージ様に変化し、慢性脂肪炎症におけるエフェクター機能を有しうることを明らかにした。本研究は脂肪・マスト細胞相互作用という新しいメカニズムの解明に繋がり、脂肪由来慢性炎症の理解と制御に大きなインパクトを与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is well known that adipose tissues relating factors are involved in the pathogenesis of many diseases in terms of chronic inflammation. Among these diseases, macrophages in adipose tissue play a significant role, while the involvement of mast cells has become known recently. However, precise molecular mechanisms between mast cells and adipose tissue relating inflammation are remained to be fully understood. We examined influence of adipose tissue on mast cells, and clarify the phenotypic conversion of mast cells to macrophage-like cells which have the effector function in adipose tissue relating inflammation. This findings lead to the elucidation of a new mechanism of fat and mast cell interaction, and it is expected to have a great impact on understanding and control of adipose-derived chronic inflammation.

研究分野：自己免疫疾患、アレルギー

キーワード：マスト細胞 脂肪組織 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪組織が慢性炎症という観点でアレルギー性気道炎症や糖尿病や動脈硬化等の疾患に関与していることは広く知られている。これらの病態において脂肪組織中のマクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかになってきているが、近年マスト細胞の関与についても報告されるようになった。しかし具体的に脂肪組織がどのようなメカニズムでマスト細胞と慢性炎症性疾患を結び付けるのかは明らかにはなかった。

(2) そこで我々は、マウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) にマウス脂肪細胞の培養上清を添加し培養する実験を行った。その結果、細胞の形態が劇的に変化し、浮遊細胞が減少し、一方で接着性細胞が出現し増加した。この接着細胞の表面抗原を解析したところ、F4/80 と CD11b を発現しており、また貪食能等のマクロファージ様の機能を有していることを見出した。

(3) 上記の如くマクロファージは脂肪慢性炎症の病態形成において重要な役割を担っており、脂肪細胞の影響によりマスト細胞がマクロファージ様機能を獲得することは、マスト細胞と脂肪慢性炎症の繋がりを示唆していると考えられる。しかしこうしたフェノタイプの変化をもたらす機序は明確でなく、またこのマクロファージ様マスト細胞の種々疾患への関与もまだ明らかではない。

## 2. 研究の目的

(1) 本プロジェクトでは脂肪細胞の影響によりマクロファージ様フェノタイプを獲得したマスト細胞についてそのキャラクターをさらに明確化し、またそうした変化が生じるメカニズムを解明する。さらにこれらフェノタイプの転換が生じた細胞が糖尿病や肥満、喘息といった疾患モデルにおいてどのような役割を担うものであるかを明らかにすること目的とする。

(2) 脂肪組織における慢性炎症に対するマスト細胞の関与を分子レベルで直接的に証明した報告はなく、我々が見出した脂肪細胞由来の新規液性因子を同定し、作用機序を解明すれば、脂肪・マスト細胞相互作用という新しいメカニズムの解明に繋がり、脂肪由来慢性炎症の理解と制御に大きなインパクトを与えるであろう。

## 3. 研究の方法

(1) マウス皮下脂肪を採取し collagenase と trypsin-EDTA で処理することにより ADSC を

得る。これらを StemXVivo Adipogenic Supplement を含有させた StemXVivo Osteogenic/Adipogenic Base Media により培養し、脂肪細胞に分化させる。これらを標準培地 (10%FBS, 100mM non-essential amino acids, 100U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 25mM HEPES を添加した RPMI-1680 培地) で 48 時間培養し、得られた上清を再度標準培地と 1:1 で混合することにより conditioned medium とする。

(2) マウス骨髄細胞を IL-3 10ng/mL を添加した標準培地で 30 日間培養することにより BMMC を誘導する。BMMC に IL-3 10ng/mL を添加した conditioned medium を 10 日間作用させマクロファージ様マスト細胞に変化させた。

(3) ギムザ染色、トルイジンブルー染色などにより形態学的な変化を観察した。また、誘導した細胞を BMMC、骨髄由来樹状細胞、骨髄由来マクロファージとフローサイトメトリーに供し、各種表面抗原の発現を比較検討した。

(4) mRNA 発現の定量を行った。細胞から ISOGEN II (Nippon Gene) を用いて mRNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT-Master Mix (Toyobo) を用いて逆転写した後、目的の遺伝子および アクチン遺伝子に特異的な probe/primer mix と TaqMan Fast Advanced Master Mix を用いて StepOnePlus real time PCR system (Applied Biosystems) により real time PCR 解析を行った。アクチン遺伝子の mRNA レベルを対照とした相対発現量を算出した。

(5) DNA microarray により類縁細胞集団との網羅的遺伝子発現プロファイルの比較を行った。上記と同様の方法により mRNA を抽出し、cDNA を得た。これを Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array に供し、GeneSpring により解析した。

(6) 上記(4)(5)を通してマクロファージ様マスト細胞への分化に関わると推定された転写因子の遺伝子について、それぞれ pMX に組み込んだレトロウイルスベクタープラスミドをパッケージング細胞 Plat-E に X-treme Gene9 を用いて導入した。得られたレトロウイルスベクター液をポリエチレングリコール沈殿により 10 倍に濃縮し、4 μg/mL polybrene の存在下にマクロファージ様マスト細胞に感染させた。24 時間後に培地を IL-3(10ng/mL) を含むフレッシュな conditioned medium 及び標準培地に交換し、7 日後にマクロファージ様マスト細胞数を比較した。また、この結果から分化への影響が強いと考えられた転写因子の遺伝子についてはさらに siRNA を合成し、HiPerFect

Transfection Reagent 用いてマクロファージ様マスト細胞に導入した。7 日後に細胞数を評価した。

(7) マクロファージ様マスト細胞を accutase を用いて dish より回収し、14 日間の感覚を開けて  $2 \times 10^6$  個づつマウスに養子移植した。これを非移植群と共に通常餌および高脂肪餌を与え体重変化、血清脂質プロファイル、インスリン抵抗性などを比較した。

(8) 本研究の遺伝子組み換え実験はすべて認可を得て行った。

#### 4. 研究成果

研究成果の一部を図に示す。

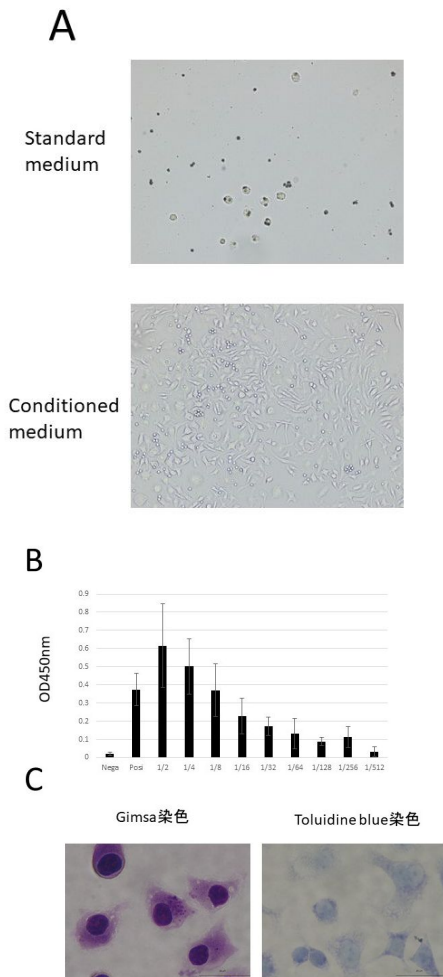


図 1 ADSC 由来脂肪細胞の培養上清を添加することで BMMC からマクロファージ様マスト細胞を誘導した。A: 標準培地では接着細胞はほとんど観察されないが、conditioned medium では多数の BMMC 由来接着細胞が出現している。B: conditioned medium を段階的に希釈し、活性を検討した。希釈が進むにしたがって、接着細胞数は減少した。C: マクロファージ様マスト細胞の Gimsa 染色像と

Toluidine blue 染色像を示す。マスト細胞由来と想定される顆粒を有する細胞も存在していることが分かる。一方 toluidine blue 染色ではマスト細胞と異なり異染性が生じない。

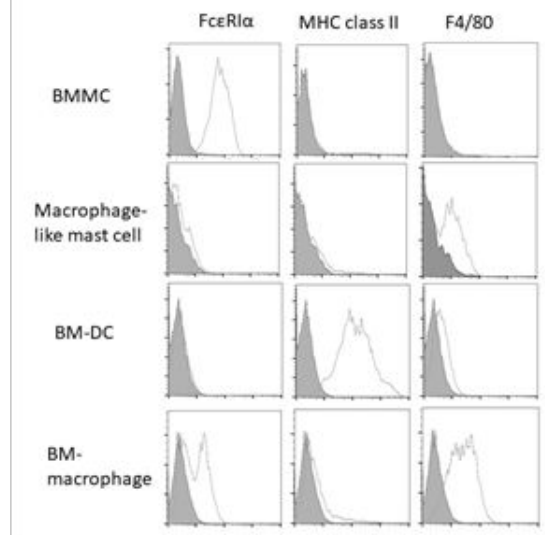


図 2 マクロファージ様マスト細胞と BMMC、骨髄由来樹状細胞、骨髄由来マクロファージについてマスト細胞、樹状細胞、マクロファージのそれぞれ代表的なマーカーである Fc RI、MHC class II、F4/80 の発現をフローサイトメトリーで比較した。マクロファージ様マスト細胞は Fc RI と MHC class II は発現しておらず、一方 F4/80 を発現しておりマクロファージに近い集団であると推定された。

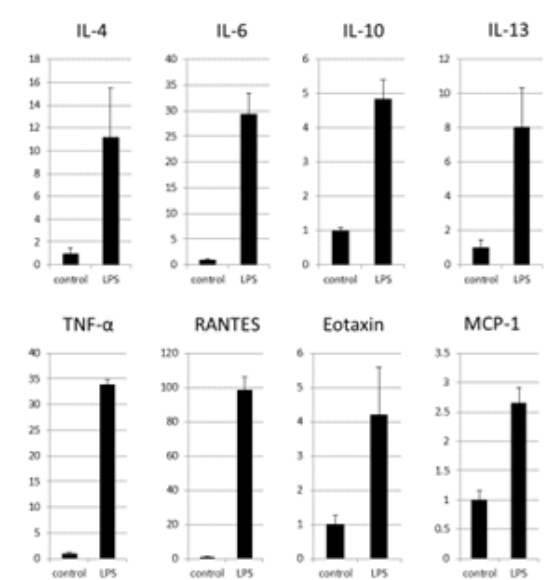


図 3 マクロファージ様マスト細胞を LPS(100ng/ml, 2hr)で刺激し、各種サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現をそれぞれの遺伝子に特異的な probe と primer を用いて「研究の方法」(4)に記載した方法で real time PCR 解析を行った。数値は アクチン遣

伝子の mRNA レベルで補正した相対値である。IL-6, TNF- $\alpha$ , RANTES といった炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子の強い発現を認める。

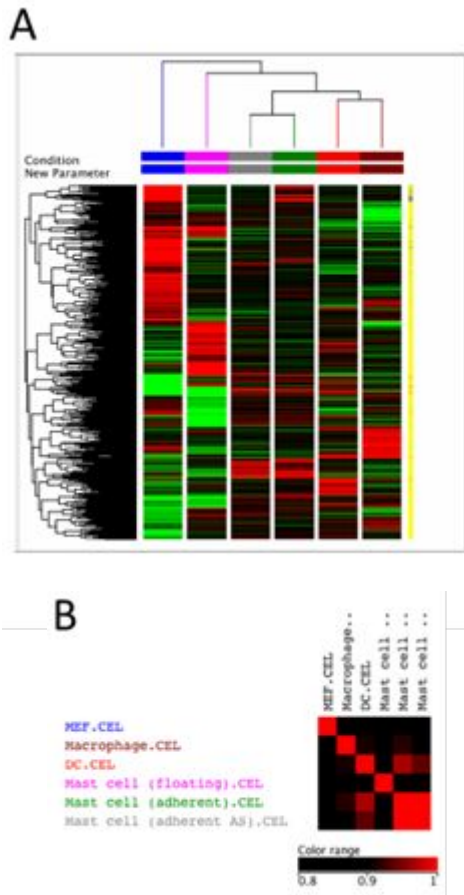


図 4 A:マクロファージ様mast細胞と類縁細胞について DNA microarray を用いて網羅的遺伝子発現プロファイルと比較した。B: 遺伝子発現の類似性についてプロットしたものである。マクロファージ様mast細胞 (adherent と標記) はBMMC(floating と標記) よりも樹状細胞やマクロファージと類似した遺伝子発現プロファイルであることが分かった。

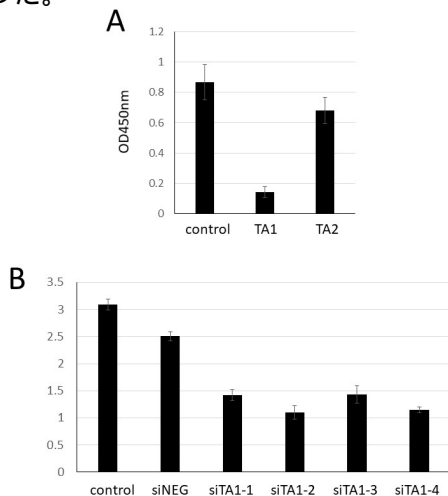


図 5 A:図 4 の結果からmast細胞がマクロファージ様にコンヴァートする上で変化が大きかった遺伝子のうち重要であると考えられた2つの転写因子について「研究の方法」(6)に記載の方法によりマクロファージ様mast細胞に強制発現させると、これらは従来接着細胞であるが転写因子1において接着細胞数が著名に減少した。B: また、転写因子1について siRNA を合成し、ノックダウンしたところ同様に接着細胞数が減少した。これらの結果から転写因子1の発現量によりmast細胞からマクロファージ様細胞へのコンヴァートが制御されていることが分かった。

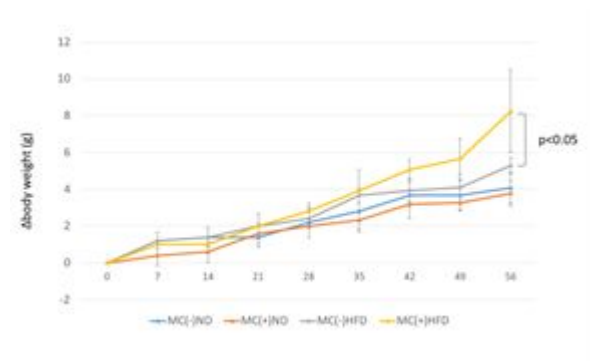


図 6 マクロファージ様mast細胞(MC)をマウス腹腔内に養子移植し、通常食(ND)および高脂肪食(HFD)を与え経時的に体重変化を観察した。細胞を移植し、かつ高脂肪食を与えた群で有意に体重増加が観察され、これらの細胞が肥満において影響を及ぼしている可能性が示唆された。

他のデータは割愛するが、本研究によりマクロファージ様mast細胞が脂肪組織からの影響をうけてmast細胞から分化するメカニズムと、その細胞としてのキャラクターについて in vitro および in vivo での解析ができた。この結果は脂肪慢性炎症が関わるアレルギーや肥満、糖尿病といった、まさに現代において激増している疾患群の病態の一翼を解明する手立てとなる可能性がある。

## 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 2 件)

Roles of high-mobility group box 1 and thrombin in murine pulmonary fibrosis and the therapeutic potential of thrombomodulin.

Kida T, Seno T, Nagahara H, Inoue T, Nakabayashi A, Kukida Y, Fujioka K, Fujii

W, Wada M, Kohno M, Kawahito Y.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2018  
Mar 1;314(3):L473-L483. (査読あり)

Role of allograft inflammatory factor-1 in  
bleomycin-induced lung fibrosis.

Nagahara H, Seno T, Yamamoto A, Obayashi  
H, Inoue T, Kida T, Nakabayashi A, Kukida  
Y, Fujioka K, Fujii W, Murakami K, Kohno  
M, Kawahito Y.

Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jan  
8;495(2):1901-1907. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤岡数記 (FUJIOKA, Kazuki)  
京都府立医科大学・医学研究科・研究員  
研究者番号: 30762174

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者

松田 修 (Mazda, Osam)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 00271164

岸田綱郎 (KISHIDA, Tsunao)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 00370205

川人 豊 (KAWAHITO, Yutaka)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 50336731

河野正孝 (KOHNO, Masataka)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 60405256