

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16354

研究課題名(和文)慢性特発性蕁麻疹における皮膚マスト細胞のMrgX2発現上昇の機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of elevated expression of MrgX2 in skin mast cells in chronic idiopathic urticaria

研究代表者

藤澤 大輔 (FUJISAWA, Daisuke)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：70793644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを使用した研究では線維芽細胞とマスト細胞を共培養することでマスト細胞が成熟する。そこでヒト皮膚由来線維芽細胞と、ヒト由来の末梢血中マスト細胞や滑膜マスト細胞の共培養を行い、MrgX2のマスト細胞上でのmRNAレベルとタンパクレベルでの発現の上昇を確認した。有意な結果は得られなかった。単独でのマスト細胞の培養で、MrgX2の発現が上昇がみられるものもあり、共培養による変化でマスト細胞の成熟は確認できなかった。しかし単独でMrgX2の発現の上昇がみられたのは意味があると判断した。共培養にヒト由来皮膚マスト細胞を実験系に組み込むことが今後の課題と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性蕁麻疹患者では様々な原因で発症されることが今までの研究で示されているが、そのほぼ多くはまだ特定されていない。特に、疾患の重症度ごとに慢性特発性蕁麻疹は様々な薬剤が効果がなく、原因を究明することが課題となっている。今回のような解析をさらに発展させることは、蕁麻疹だけではなく慢性疾患である乾癬・アトピー性皮膚炎など新規治療戦略を開発する場合に極めて重要となり、新規治療により現在の治療法では難治な患者に恩恵をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In studies using mice, mast cells mature by co-culturing fibroblasts with mast cells. Therefore, human skin-derived fibroblasts were co-cultured with human-derived peripheral blood mast cells and synovial mast cells, and elevated expression of MrgX2 at the mRNA and protein levels on the mast cells was confirmed. No significant results were obtained. In some mast cell cultures alone, expression of MrgX2 was increased, and mast cell maturation could not be confirmed due to changes. By co-culture, however, it was considered significant that the expression of MrgX2 was increased by itself. Incorporating human-derived skin mast cells into the experimental system in co-culture seemed to be a future task.

研究分野：皮膚科学

キーワード：マスト細胞 慢性特発性蕁麻疹 MrgX2 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚マスト細胞にマスト細胞が産生する Group phospholipase A2 (PLA2G3)が線維芽細胞の L-type prostaglandin D2 合成酵素(L-PGDS)と結合し活性化させ PGD2 を産生させる。

この PGD2 受容体(DP1)に作用する。

また線維芽細胞の表面の発現している膜型 stem cell factor(SCF)がマスト細胞の KIT に作用する。

これによってマスト細胞は成熟する。

そこでヒト皮膚マスト細胞を皮膚線維芽細胞と 4~7 日間共培養し、成熟のマーカーとして、Hdc(histamine decarboxylase,ヒスタミン合成酵素)、Ptgds2(hematopoietic PGD2 synthase)、Cmal(cymase,結合織マスト細胞に発現しているプロテアーゼ)Mrgx1 および MrgX2 の蛋白レベルを指標に mRNA レベル(4 日間培養)と Mrgx2 の蛋白レベル(7 日間培養)を共培養なしの細胞と比較する。

予定していた DNA chip で網羅的発現解析を行う。

炎症を模倣するため TNF- 処理をした皮膚線維芽細胞を使用予定する。

また抗 PLA2G3 阻止抗体、DP1 拮抗薬および L-PGDS 抑制薬を用いて PGD2 の関与の検討をする。

また IL-31 と TSLP で皮膚マスト細胞刺激をする成熟に関与するかを確認する。

Mrgx2 の発現増強によっては substance P 刺激後の脱顆粒能、サイトカインの産生、脂質メダイエーターの産生が増強するか調べる。

2. 研究の目的

近年重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞に G タンパク質共役型受容体に属する Mas related gene X2 (MrgX2) の発現が健常者と比較して有意に増強していることを報告した。

MrgX2 は、脊髄後根神経節や感覚神経に発現し、substance P や dynorphin をリガンドとし、痛覚に関与する受容体として同定された。

substance P 刺激により MrgX2 を介して皮膚マスト細胞は、ヒスタミンの遊離の確認をした。今回

(1) 重症の慢性蕁麻疹患者のマスト細胞における MrgX2 の発現の増強の機序を解明し、

(2) 患者と健常人の血清中の MrgX2 発現を増強する因子の濃度を比較することにより、新規治療薬の開発に資する研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト皮膚マスト細胞とヒト皮膚線維芽細胞との共培養を共培養なしのものと比較し DNA chip で網羅的発現解析を行う。

フローサイトメトリーではヒト皮膚由来線維芽細胞とヒト臍帯血由来マスト細胞を分離する場合、二重染色で施行したが、今後トリプターゼで細胞を全て遊離させた後、洗浄しフラスコ内の medium に戻しヒト皮膚由来線維芽細胞のみ接着させ、ヒト臍帯血由来のマスト細胞を上清から抽出する。

成熟のマーカーとしての、Hdc(histamine decarboxylase,ヒスタミン合成酵素)、Ptgds2(hematopoietic PGD2 synthase)、Cmal(cymase,結合織マスト細胞に発現しているプロテアーゼ)を指標とし Mrgx2 の発現を評価する。

また様々なヒト由来マスト細胞で MrgX2 のマスト細胞上の発現を確認するため、ヒト皮膚マスト細胞の培養など得ることを考え、植皮術だけでなく、ヒフ腫瘍摘出術などでの腫瘍断片の余剰皮膚などがあれば承諾を得てヒト皮膚マスト細胞の培養に使用し n 数を増やす。

4. 研究成果

ケラチノサイトから放出される IL-31 と TSLP でヒト由来の皮膚マスト細胞を刺激し MrgX2 のマスト細胞上の発現を見たところ、マウス由来マスト細胞と異なり仮説ではあるが、ヒト皮膚由来のマスト細胞では刺激が入らない可能性が示唆された。

皮膚線維芽細胞とヒト末梢血由来マスト細胞の共培養を行ったところ、フローサイトメトリーでは Mrgx2 の発現上昇が明らかとなった。

フローサイトメトリー時にマスト細胞の MrgX2 の染色と測定に線維芽細胞が混入し何らかの影響を与えていることを想定していたが、技術的に線維芽細胞が混入せず施行できたため仮説通りの結果が出ている。

マウスを使用した研究では線維芽細胞とマスト細胞を共培養することでマスト細胞が成熟する。そこでヒト皮膚由来線維芽細胞と、ヒト由来の末梢血中マスト細胞や滑膜マスト細胞の共培養を行い、MrgX2 のマスト細胞上での mRNA レベルとタンパクレベルでの発現の上昇を確認したが今回の手法では有意な結果は得られなかった。

単独でのマスト細胞の培養で、MrgX2 の発現の上昇がみられるものもあり、共培養による変化

でマスト細胞の成熟は確認できなかった。

しかし単独で MrgX2 の発現の上昇がみられたのは意味があると判断した。

共培養にヒト由来皮膚マスト細胞を実験系に組み込むことや、今後 n 数を増やすよう工夫し研究することが今後の課題と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----