

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17890

研究課題名(和文) 脂肪組織・マスト細胞インタラクションを介した脂肪由来慢性炎症の解明

研究課題名(英文) Elucidation of adipose-derived chronic inflammation via adipose tissue-mast cell interaction

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・専攻医

研究者番号：30762174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞は、古典的にはアレルギー応答における最も重要な細胞の1つとして知られているが、近年脂肪組織における慢性炎症が関与する病態にも関係することが報告されており、脂肪組織とマスト細胞間での何らかのインタラクションが存在することが示唆される。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することで、BMMCがマクロファージ用の形質に転換し、通常のマスト細胞とは異なる炎症性フェノタイプを有することを見出している。また、そうした変化を担う液性因子を脂肪細胞培養上清から明らかにするべく解析したところ細胞外マトリックスを構成する蛋白質が候補として得られている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、肥満人口は我が国を含め世界規模で見ても増加の一途をたどっており、肥満関連疾患の制御は緊喫の課題となっている。本研究を通して得られた脂肪・マスト細胞相互作用という脂肪慢性炎症における新しいメカニズムは、激増している肥満関連疾患における新たなターゲットとして新規の治療戦略に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mast cells are classically known to be one of the most important cells in allergic responses, but recently they have also been reported to be involved in pathological states involving chronic inflammation in adipose tissue, suggesting that there is some interaction between adipose tissue and mast cells. We have found that mouse bone marrow-derived mast cells (BMMCs) can be transformed into macrophage-like cells by adding supernatant of mouse adipocytes to BMMCs, and have a different inflammatory phenotype from conventional mast cells. In addition, we analyzed adipocyte supernatants to identify the humoral factors responsible for such phenotypic changes, and found that proteins constituting the extracellular matrix were candidates.

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 マクロファージ 慢性炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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っていない。

(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。さらにこのマクロファージ様マスト細胞は脂肪培養上清に対する走化性を有し、また同細胞をマウス腹腔内へ移植したところ肥満や脂質プロファイルの増悪が示唆された。

(3) 上記(1)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。すなわちこれらの結果はマスト細胞がまさに脂肪慢性炎症における新たなキープレイヤーであることを示唆し、その制御は肥満関連疾患の制御につながる可能性がある。しかし脂肪由来のこういった液性因子がどのようにしてマスト細胞に働いているかは明らかでなく、このマクロファージ様マスト細胞の機能も明らかでない。

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、さらにこれらフェノタイプの転換が生じた細胞が具体的にこういった臓器で影響を及ぼすことによって 1 - (2) で述べたような形質への変化が生じるのかを明らかにする。さらに脂肪細胞の培養上清中のこういった液性因子がマクロファージ様の形質を獲得せしめるのかを明らかにすることを目的とする。

(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形態学的な変化を観察した。

(3) Conditioned medium 中の液性因子がマスト細胞に対し走化性を有しているか CytoSelect™ 細胞遊走アッセイキット (Cell Biolabs) を用いて検証した。ポイデンチャンバーのポアを通り遊走したマスト細胞数をカウントし、さらに CyQUANT 染色により DNA の総量を比較した。

(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) BMMC からマクロファージ様マスト細胞への変化には可塑性が有するか検討した。すなわち

BMMC に conditioned medium を作用させマクロファージ様マスト細胞へと変化させた後、standard medium に戻し 14 日間培養した。得られた細胞とマクロファージ様マスト細胞、BMMC を形態的に比較すると同時に、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。また、機能的な差異の有無については α -hexosaminidase の放出率を比色法により算出することで脱顆粒能についても比較をおこなった。

(6) マクロファージ様マスト細胞を XenoLight DiR によりラベリングし、 5×10^6 個づつ Balb/c マウス腹腔内に移植した。7 日が経過した後、各種臓器を摘出し、具体的にどの臓器に集積しているか IVIS imaging system により観察した。

(7) マウス脂肪細胞の培養上清を Superdex 200 (GE Healthcare) を用いてゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した。得られた分画を各々 BMMC に添加することでマクロファージ様マスト細胞へと変化が生じる活性分画を同定した。これを SDS-PAGE により展開し、銀染色をおこなった。standard medium と比較することで活性分画にのみ存在する band を同定し、これを LC-MS/MS に供し、マススペクトルデータを得た。

(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。

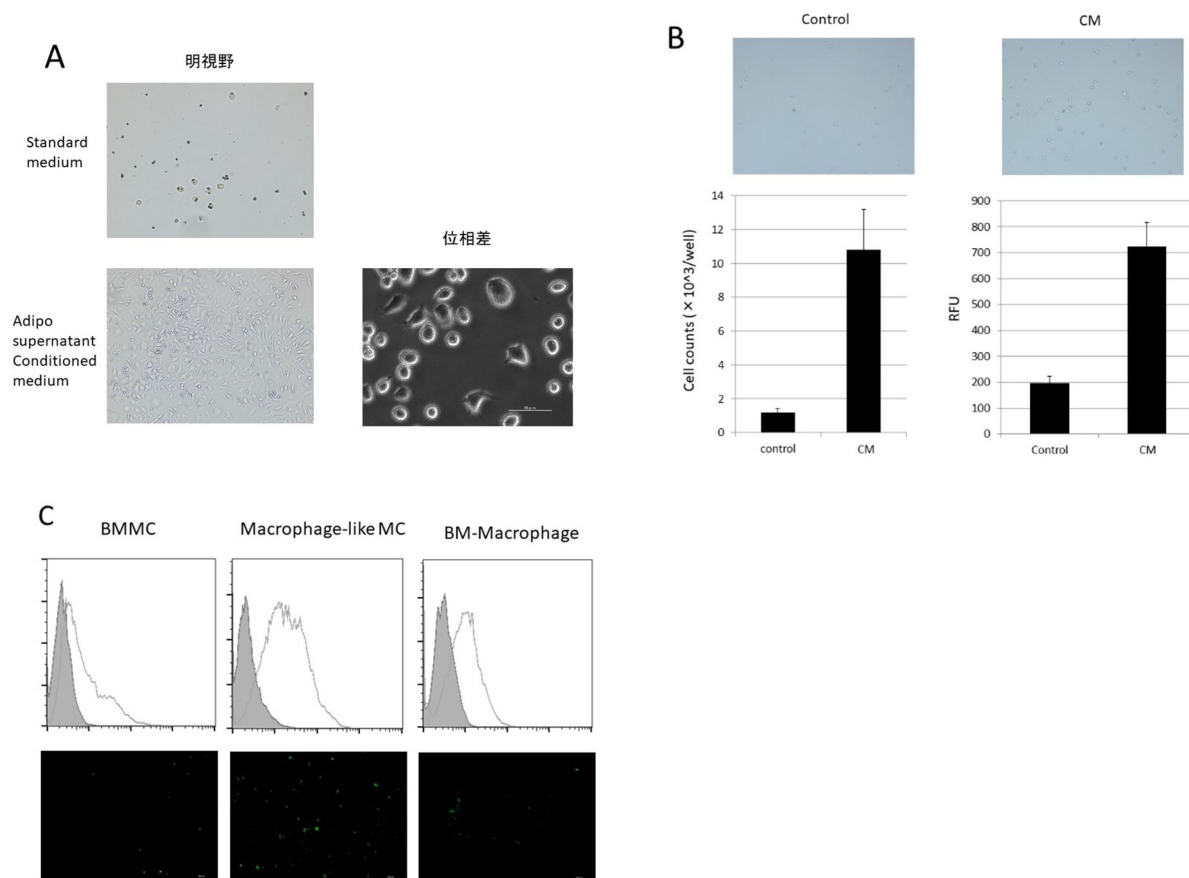


図 1 ADSC 由来脂肪細胞の培養上清と標準培地を混和することで得た Conditioned Medium (CM) を添加することで BMMC からマクロファージ様マスト細胞を誘導した。A: 標準培地では接着細胞はほとんど観察されないが、conditioned medium では多数の BMMC 由来接着細胞が出現している。B: ボイデンチャンバーの上段に BMMC を入れ、下段を CM およびコントロールとしての標準培地で満たした。24 時間後に下層中の細胞数並びに総 DNA 量を計測したところ、CM を入れた場合、標準培地に比べ多くの細胞存在しており CM が BMMC に対して遊走能を有していることが分かる。C: BMMC, マクロファージ様マスト細胞、骨髄由来マクロファージに FITC でラベルしたラテックスビーズを投与し、フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡で解析した。接着マスト細胞で取り込みが確認できる。

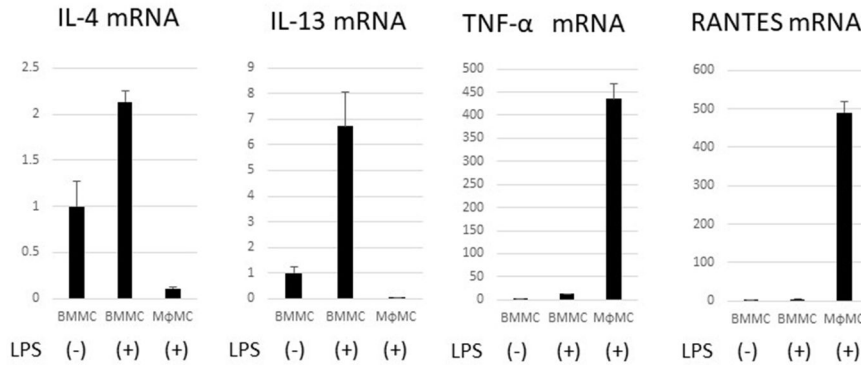


図2 BMMCおよびマクロファージ様マスト細胞(MφMC)をLPS(100ng/ml, 2hr)で刺激し、各種サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現をそれぞれの遺伝子に特異的な probe と primer を用いて「研究の方法」(4)に記載した方法で real time PCR 解析を行った。数値は アクチン遺伝子の mRNA レベルで補正した相対値である。BMMC では IL-4 や IL-13 など Type2 炎症関連サイトカイン遺伝子の発現を認めるが、マクロファージ様マスト細胞では TNF- α 、RANTES といった炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子の強い発現を認める。

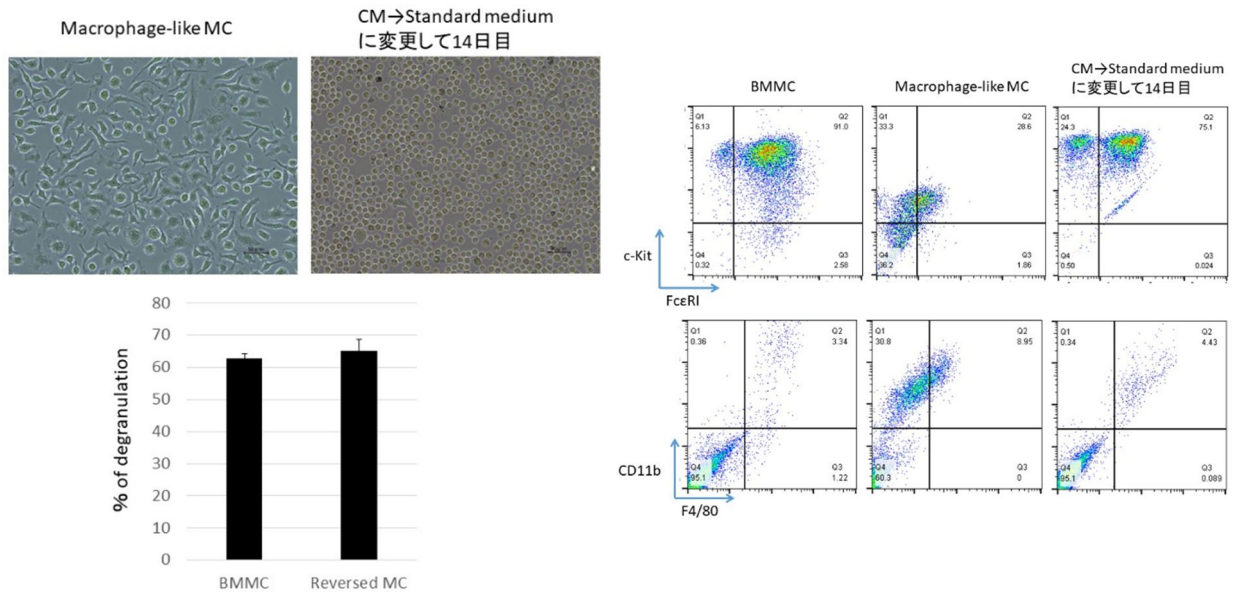


図3 マクロファージ様マスト細胞を誘導した後、標準培地に戻し 14 日間培養したところ、接着細胞は消失し多数の浮遊細胞に変化した。本細胞についてマスト細胞、マクロファージのそれぞれ代表的なマーカーである Fc RI、c-Kit、CD11b、F4/80 の発現をフローサイトメトリーで比較した。マクロファージ様マスト細胞から標準培地に戻して得た細胞は Fc RI と c-Kit を高率に発現しており、一方 CD11b や F4/80 は発現しておらず BMMC と同様の表面マーカー発現パターンであった。また、 α -hexosaminidase の放出率を算出することで脱顆粒率を比較したところ、BMMC と有意な差は生じなかった。したがってマクロファージ様マスト細胞は培地の変化により元の BMMC へと戻る可塑性を有していると推定された。

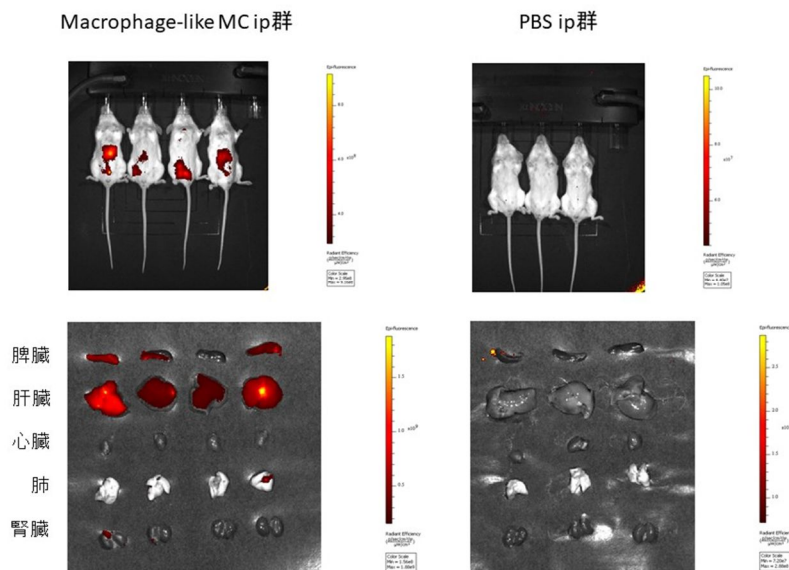


図4 マクロファージ様マスト細胞に XenoLight DIR を添加し(320 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30min)、ラベリングしたものを 5×10^6 個ずつ Balb/c マウスの腹腔内に移植した。7 日後に IVIS imaging system により観察したところ、細胞はマウス内に残存していた。また、臓器別に分け観察したところ肝臓および脾臓において集積が見られ、これらの臓器で生着している可能性が示唆された。

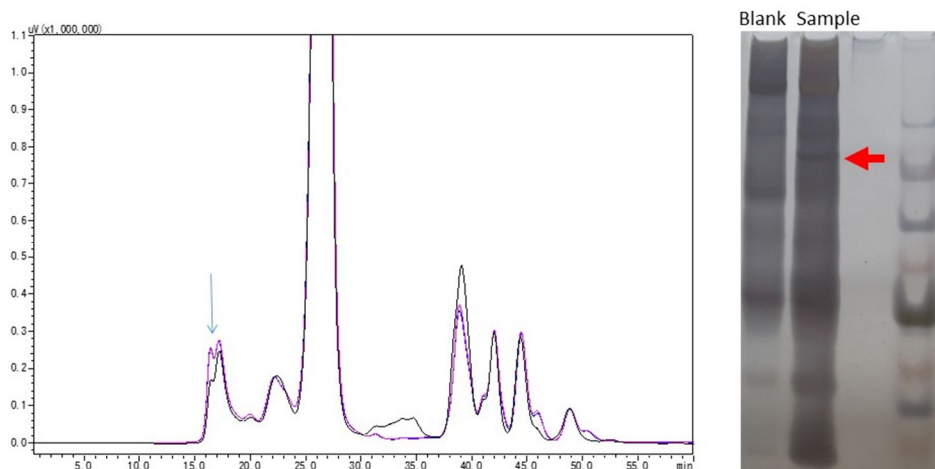


図5 脂肪細胞培養上清をゲル濾過クロマトグラフィーで分画化した(赤: sample=培養上清 青: blank=標準培地)。以前の研究から 100kDa 程度の高分子量において活性を有していることが分かっており、高分子量側で培養上清のみに存在しているピークを青矢印でしめした。この分画を SDS-PAGE に供し銀染色を行ったところ、右図の如く培養上清中にのみ存在している band が認められ、これが BMMC に対しマクロファージ様マスト細胞へと変化をさせる液性因子であると推定された。さらに LC-MS/MS による分析を行ったところ細胞外マトリックスを構成する蛋白質が候補として得られている。

他のデータは割愛するが、本研究により脂肪細胞からの影響をうけて BMMC が分化したマクロファージ様マスト細胞のキャラクターと、その生体内での分布、また分化の責任となる液性因子について解析ができた。この結果は脂肪組織とマスト細胞の相互作用という新たな病態の存在を示唆するものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuki Fujioka, Akiko Kasahara, Makoto Wada, Masataka Kohno, Yutaka Kawahito
2. 発表標題 Efficacy and safety of allergen immunotherapy for allergic rhinitis with autoimmune disease
3. 学会等名 JSA/WAO joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
研究協力者	松田 修 (Mazda Osam) (00271164)	京都府立医科大学・免疫学・教授 (24303)	
研究協力者	岸田 綱郎 (Kishida Tsunao) (00370205)	京都府立医科大学・免疫学・准教授 (24303)	
研究協力者	川人 豊 (Kawahito Yutaka) (50336731)	京都府立医科大学・免疫内科学・准教授 (24303)	
研究協力者	河野 正孝 (Kohno Masataka) (60405256)	京都府立医科大学・免疫内科学・講師 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------