

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 10 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22634

研究課題名(和文)血管透過性を抑制するマスト細胞の新たな機能の解明

研究課題名(英文) Novel inhibitory roles of mast cells in the regulation of vascular permeability

研究代表者

倉島 洋介 (Kurashima, Yosuke)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30729372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は各組織のマスト細胞に特異的に発現している遺伝子を網羅的に解析したところ、ペア型レセプターの一つで免疫受容体抑制性チロシンモチーフを有する受容体が皮膚組織中のマスト細胞で高く発現していることを見出した。そこで、本研究では皮膚マスト細胞に発現するペア型レセプターの機能について明らかにする目的で、ペア型レセプターの発現誘導機構と機能解析を進めた。その結果、当該ペア型レセプターを介したマスト細胞と線維芽細胞及び血管内皮細胞との相互作用は、マウス細胞のキマーゼの発現を調整していることが示された。以上から、皮膚組織において血管透過性を制御するマスト細胞機能調整機構の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚マスト細胞に発現するペア型レセプターを介した線維芽細胞及び血管内皮細胞との相互作用は、マスト細胞のキマーゼの発現を制御していることが示され、ペア型レセプターが欠損すると皮膚炎が重症化することが明らかとなった。つまり、本研究から得られた新たなペア型レセプターの機能を標的とすることは、治療抵抗性の慢性特発性蕁麻疹、抗ヒスタミン薬抵抗性のコリン性蕁麻疹や接触性皮膚炎の新たな創薬起点となる応用性が期待される。さらに、他の組織で発症する炎症性疾患に対しても「血管透過性の抑制を介した新たな病態制御法」という革新的な治療戦略を打ち立てることができ、新視点からのヒト疾患治療の架け橋となる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：Mast cell (MC) progenitors leave the bone marrow as immature cells and enter the blood circulation and migrate to various target tissues. Here, we found inhibitory receptor possessing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) is highly expressed in skin MCs and the inhibitory receptor expression is mediated by skin resident fibroblasts via PI3K-Akt-mTORC1 pathways. Furthermore, possible ligands of the inhibitory receptor are expressed on fibroblasts and vascular endothelial cells in skin. Coculture with the inhibitory receptor-deficient MCs with fibroblasts induces higher levels of chymase, indicating the inhibitory roles of the inhibitory receptor in chymase dependent vascular permeability in skin. Indeed, the inhibitory receptor deficient mice showed enhanced ear swelling responses. These results suggest structural cell circuits tune skin MCs to control vascular permeability via induction of the inhibitory receptor for the maintenance of tissue homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：マスト細胞 線維芽細胞 血管内皮細胞 接触性皮膚炎 血管透過性

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は活性化すると蕁麻疹、アトピー、接触皮膚炎などの皮膚疾患を導くヒスタミンやロイコトリエン、プロテアーゼをはじめとする様々な因子を放出することから、マスト細胞が過度に活性化しないよう何重もの調整メカニズムが皮膚をはじめとする組織の恒常性維持のために存在する (Karra L et al., Adv Exp Med Biol 2011)。申請者らは、これまでに過度なマスト細胞の活性化を抑制する皮膚組織特異的な機構を見出し、間葉系細胞の一種の線維芽細胞がマスト細胞と相互作用することで制御していることを見出している (Kurashima Y et al., Immunity 2014)。つまり、このマスト細胞 間葉系細胞によるマスト細胞活性化抑制機構に関わる分子機序を紐解くことは、マスト細胞に関わるアレルギー・炎症疾患の発症機構の解明と予防・治療法の開発の一助になると考えられる。

2. 研究の目的

このような研究背景から、我々は各組織のマスト細胞に特異的に発現している遺伝子群を網羅的に解析したところ、ペア型レセプターの一つで免疫受容体抑制性チロシンモチーフ (ITIM) を有する受容体が皮膚組織中のマスト細胞で高く発現していることを見出した。他のITIM分子群の発現には組織特異性が見られないことから、当該ペア型レセプターのみが皮膚マスト細胞に特異性を示した。そこで、本研究では皮膚マスト細胞に発現する皮膚特異的なペア型レセプターの機能について明らかにするとともに、細胞間相互作用という観点からペア型レセプター誘導機構並びに炎症における役割について解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、

皮膚マスト細胞にペア型レセプターの発現を誘導する皮膚線維芽細胞解析

ペア型レセプター会合分子を発現する細胞の同定と機能解析

という2つの解析を実施した。

マウス各臓器由来の線維芽細胞と骨髄誘導マスト細胞(BMMC)の*in vitro*・*ex vivo*培養系を活用し、様々な組織由来の線維芽細胞の遺伝子発現を比較することで、皮膚線維芽細胞に特異的に発現する遺伝子群を抽出した。さらに、阻害剤並びに遺伝子改変マウス由来の線維芽細胞を用いてペア型レセプターの誘導機構について解析を進めた。

一方で、マスト細胞上の皮膚特異的なペア型レセプターを介して相互作用する細胞と分子の同定を進めることで皮膚組織におけるペア型レセプターの役割について解析した。

4. 研究成果

皮膚マスト細胞特有のペア型レセプターの発現を誘導する皮膚線維芽細胞解析

ITIM受容体のうち、皮膚特異的なペア型レセプターのみが皮膚マスト細胞に特異的な発現を示すことから、皮膚の線維芽細胞との共培養により皮膚特異的なペア型レセプターが誘導されると考え、マウス骨髄誘導マスト細胞(BMMC)ならびにマウス皮膚由来の線維芽細胞との共培養後のBMMC、マウス皮膚マスト細胞の3者間で遺伝子解析を行った。皮膚線維芽細胞との共培養で誘導される遺伝子を調べたところ皮膚特異的なペア型レセプターが誘導されてくることが示された。このことから、皮膚マスト細胞に特異的なペア型レセプター発現は皮膚線維芽細胞により

制御されていることが示された。

次に我々は、マウスの皮膚、小腸、大腸、肝臓、腎臓、肺などの組織から線維芽細胞を単離培養し、BMMCとの共培養を行い皮膚特異的なペア型レセプターの発現についてフローサイトメトリ解析を行ったところ、皮膚線維芽細胞との共培養の条件下に限り、4日以内にマスト細胞上に皮膚特異的なペア型レセプターの発現が誘導された。そこで、これらの線維芽細胞についてRNA-Seqによる遺伝子発現解析を行ったところ、皮膚線維芽細胞に特異的に発現する遺伝子群を同定した。複数の候補遺伝子から分泌もしくは細胞膜上に発現する分子に着目し、阻害剤（Wortmannin、LY294002、Rapamycin、PD98059、SP600125）や欠損マウス由来線維芽細胞を用いた共培養実験を行った。その結果、PI3K-Akt-mTORC経路を介した皮膚線維芽細胞由来の分子Xとその受容体がマスト細胞上の皮膚特異的なペア型レセプターの発現を誘導することが明らかとなった。

皮膚特異的なペア型レセプター会合分子を発現する細胞の同定と機能解析

皮膚特異的なペア型レセプター欠損マウスでは野生型に比べ、接触性皮膚炎の発症に伴う血管透過性（浮腫）の亢進が見られ、皮膚特異的なペア型レセプターが血管透過性に対して抑制的に働いていることが示唆された。しかしながら、皮膚特異的なペア型レセプター欠損マウスにおいて、マスト細胞の組織浸潤数、脱顆粒反応、TNF等の炎症性サイトカイン産生については野生型と相違がなく、他の機序によって皮膚特異的なペア型レセプターが血管透過性の制御に寄与している可能性が示された。

そこで、細胞間相互作用という観点からマスト細胞の局在について $Mcpt5^{Cre}Rosa^{tdTomato}Col1a2-GFP$ マウスを作製し、皮膚組織におけるマスト細胞の局在解析を行ったところマスト細胞はCOL1a2陽性の線維芽細胞・血管内皮細胞と共局在していることが示された。さらに、皮膚特異的なペア型レセプターの融合タンパクを用いた解析から、線維芽細胞と血管内皮細胞のどちらにも皮膚特異的なペア型レセプターの会合分子が発現していることが示され、線維芽細胞-マスト細胞-血管内皮細胞の相互作用が皮膚特異的なペア型レセプターを介した血管透過性の抑制に寄与していることが示された。次に、皮膚特異的なペア型レセプターが血管内皮細胞に及ぼす影響について明らかにするため、透過性関連遺伝子（*Icam1*、*P-selectin*、*Vcam1*、*E-selectin*、*Slp1*、*Vegfr2* など）の発現について *in vitro* で皮膚特異的なペア型レセプターを作用させ解析を行った。しかしながら、これらの発現への影響は見られず他の機序が関わっていることが示唆された。

そこで、野生型および皮膚特異的なペア型レセプター欠損マウス由来のBMMCを皮膚特異的なペア型レセプターの会合分子を発現する皮膚線維芽細胞と共培養し遺伝子発現解析を行ったところ、共培養後では血管透過性の亢進に関わるキマーゼの発現が皮膚特異的なペア型レセプター欠損BMMCにおいて発現が増強することが示された。マスト細胞のキマーゼは皮膚組織中で線維芽細胞によって発現誘導される一方で、皮膚特異的なペア型レセプターを介した線維芽細胞及び血管内皮細胞との相互作用は、キマーゼの発現を調整していることが示された。以上のことから、皮膚組織において、マスト細胞を軸とする血管透過性を制御する機構の一端が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Joo S., Suwanto A., Sato A., Nakahashi-Ouchida R., Mori H. Uchida Y., Sato S., Kurashima Y. et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A role for the CCR5-CCL5 interaction in the preferential migration of HSV-2-specific effector cells to the vaginal mucosa upon nasal immunization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-019-0203-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishida K., Hasegawa A., Yamasaki S., Uchida R., Ohashi W., Kurashima Y., Kunisawa J., Kimura S. et al.,	4. 巻 9
2. 論文標題 Mast cells play role in wound healing through the Znt2/GPR39/IL-6 axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47132-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashizume-Takizawa T., Shibata N., Kurashima Y., Kiyono H., Kurita-Ochiai T., Fujihashi K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Distinct roles for Peyer's patch B cells for induction of antigen-specific IgA antibody responses in mice administered oral recombinant Salmonella	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 531 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurashima Y., Tokuhara D., Kamioka M., Inagaki Y., Kiyono H	4. 巻 10
2. 論文標題 Intrinsic Control of Surface Immune and Epithelial Homeostasis by Tissue-resident Gut Stromal Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura S., Kurashima Y., Murasaki S., Morimoto M., Arai F., Saito Y., Katayama N., Kim D., Inagaki Y., Kudo T., Ernst P., Shimizu T., Kiyono H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Stratified layer analysis reveals intrinsic leptin stimulates cryptal mesenchymal cells for controlling mucosal inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75186-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takasato Y., Kurashima Y., Kiuchi M., Kiyoshi Hirahara K., Murasaki S., Arai F., Nakamura M., Fujisawa K., Kunisawa J., Kubo M., Takemura N., Uematsu S., Akira S., Takahashi T., Nakayama T., Kiyono H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Orally desensitized intestinal mast cells acquire regulatory characteristics for food allergy control	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-020-00358-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurashima Y., Kigoshi T., Murasaki S., Arai F., Shimada K., Natsumi Seki N., Kim Y. G., Hase K., Ohno H., Kawano K., Ashida H., Suzuki T., Morimoto M., Saito Y., Sasou A., Goda Y., Yuki Y., Inagaki Y., Iijima H., Suda W., Hattori M., Kiyono H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pancreatic glycoprotein 2 is a first line of defense for mucosal protection in intestinal inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21277-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yosuke Kurashima
2. 発表標題 Bringing mucosal mast cells over to our side to overcome allergy
3. 学会等名 World Allergy Congress (WAC) 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Kurashima
2. 発表標題 Elucidation of novel pathways in the mucosal protection in the gut
3. 学会等名 CU-UCSD Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Kurashima
2. 発表標題 Novel roles of accessory digestive organ in mucosal protection
3. 学会等名 JSPS-Crick Symposium on Gut Circuits (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉島 洋介, 清野 宏
2. 発表標題 腸内細菌の制御を担う新たな「膵臓」の役割
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yosuke Kurashima
2. 発表標題 Pancreatic-Gut Axis for the Mucosal Protection
3. 学会等名 Joint Seminar of 'Chiba University Tenure Track Seminar Program and International Research and Development Center for Mucosal Vaccines (IMSUT) Vaccine Center Seimnar' (招待講演)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------