

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：31304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592099

研究課題名(和文)自己組織化ナノテクノロジー技術を用いた細胞外マトリックスによる肥満細胞の制御

研究課題名(英文)Regulation of mast cells by extracellular matrix using self-organizing nano-technology method

研究代表者

杉本 是明(Sugimoto, Koreaki)

東北福祉大学・総合福祉学部・教授

研究者番号：30361158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ハニカムフィルム(Honeycomb film: HCF)上で培養すると、肥満細胞の増殖と機能が制御されるか検討した。用いた肥満細胞は、非腫瘍性の新規肥満細胞NCL-2 cellと、疑似肥満細胞であるラット好塩基球性白血病細胞RBL-2H3 cellである。同じ材質のフィルムでもハニカム構造があると肥満細胞の増殖の仕方・形態・分泌顆粒に変化が起こった。また、細胞の違いにより、HCFによる制御に違いが見られた。ヒト粘膜型肥満細胞に近いNCL-2 cellは、HCF上では細胞分裂が増えるものの、de novo に合成されるTNF- $\alpha$  やロイコトリエンB4の分泌は減少することがわかった。

研究成果の概要(英文)：We studied mast cell proliferation and regulation by honeycomb film (HCF). We used two types of mast cells, NCL-2 cell (new non-tumor mast cell line) and RBL-2H3 cell (rat basophilic leukemia cell line). Both of the cells cultured on 3, 5, and 10 microm pore size of HCF revealed changing of proliferation rate, cell formation, and mediator release from mast cell though the quality of HCF is same. And then HCF regulation depended on the difference of a kind of cell. NCL-2 cell that is similar to human mucosal mast cell proliferated on the HCF, but reduced the release of TNF-alpha and leukotriene B4, which are de novo synthesized cytokines in mast cell.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学 歯科放射線学

キーワード：肥満細胞 炎症 アレルギー ヒスタミン ナノテクノロジー バイオマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎や気管支喘息などのアレルギー疾患，あるいは多くの炎症性疾患には肥満細胞が深く関与している．アトピー性皮膚炎や気管支喘息はステロイド治療が主たる対症療法だが，効果がある一方，副作用も強く多く．アレルギー疾患や炎症性疾患の患者は極めて多く，新たな治療法が求められている．

2007年11月，京都大学の山中らが，世界で初めてヒトの皮膚細胞から万能細胞(iPS細胞)を作ること成功した(*Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72).このiPS細胞の登場で，再生医療は次世代の治療法にbreak throughしうる新しい治療法として注目されている．現在，世界で行われている再生医療は，遺伝子導入など，細胞内の遺伝子を操作することで成功している．今回我々は，細胞外マトリックスを操作することで，肥満細胞を特異的に増殖/抑制することを目指した．

肥満細胞を細胞外マトリックスで制御することが出来れば，薬物療法・手術療法・放射線療法に続く全く新しい独創的な治療法として，細胞外刺激で肥満細胞の機能を抑制し，アレルギー疾患や炎症性疾患の治療につながると考えた．

## 2. 研究の目的

我々は，自己組織化ナノテクノロジーの技術を駆使した「ハニカムフィルム(Honeycomb film: HCF)を用いた組織再生」の研究に手がけ，技術開発してきた．

再生医療の実現のためには，細胞接着のための足場(細胞外マトリックス)，細胞(幹細胞，iPS細胞など)，細胞増殖・分化誘導因子(サイトカイン，遺伝子操作等)を適切に組み合わせる必要があるが，我々は微細加工された足場(HCF)を用いて細胞機能を制御することに世界で初めて成功した(*Colloids and Surfaces A:*

*Physicochemical and Engineering Aspects*, 284-285, 464-469, 2006; *Physicochemical and Engineering Aspects*, 313-314, 515-519, 2008; *J. Nanosci. Nanotech*, 7, 763-772, 2007).つまり，を必要とせずに，のみで種々の細胞増殖の制御を可能にした．

肥満細胞は，アレルギー疾患や炎症性疾患を増悪させる原因細胞で，ヒスタミンやサブスタンスPなどの顆粒物質を開口分泌することで症状を悪化させる．そこで，このHCFを用い，肥満細胞の増殖を抑え，肥満細胞から放出されるヒスタミンやロイコトリエンなどの炎症・アレルギーmediatorsを抑制できないか実験した．

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍細胞でない肥満細胞株NCL-2

(Japanese patent [J-STORE] 2006; Patent code #P06A009473, [http://jstore.jst.go.jp/nationalPatentDetail.html?pat\\_id=13154&lang=en](http://jstore.jst.go.jp/nationalPatentDetail.html?pat_id=13154&lang=en))の培養方法を確立した．

(2) 肥満細胞(NCL-2, RBL-2H3 [疑似肥満細胞であるラット好塩基球性白血病細胞])の増殖と機能が抑制されるようなHCFの条件(孔径，3次元構造，基盤の素材など)を探すため，各種HCFを作成した．

(3) NCL-2, RBL-2H3 cellを7日間，3，5，10 $\mu$ m HCF上，および，flat film，そして素材を変えたHCF上で培養し，以下の検討を行った．

NCL-2 cellに分化する特異的受容体(C-kit受容体)抗体で免疫染色して観察した．

核やアクチン，接着因子などの抗体処理したNCL-2 cellを，共焦点レーザー顕微鏡で観察した．

走査型電子顕微鏡(SEM)でNCL-2 cellを観察した．

培養7日後のNCL-2 cellの細胞数と大きさを測定した。

HCF上で培養した時の、NCL-2 cellの細胞周期をKi-67で確認した。

HCF上で培養した時の、NCL-2 cellのアポトーシスをTunel染色で確認した。

浮遊液中のヒスタミン・ロイコトリエンB4・サブスタンスP・TNF-を酵素免疫アッセイ法にて測定した。

1~7の実験をRBL-2H3でも同様に実験し、比較検討した。

1~7の実験を、HCFの素材を変えて、実験した。

#### 4. 研究成果

(1) NCL-2 cellはc-kit受容体を持ち、肥満細胞であることが確認された。NCL-2 cellは、粘膜型肥満細胞の性格を持ち、高親和性IgE受容体(FcRI)を持つ(図1)。

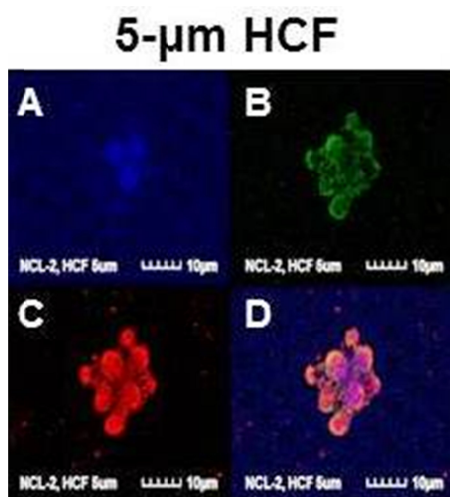


図1. 共焦点レーザー顕微鏡による観察(3重免疫染色)。

A: 核, B: actin, C: c-kit receptor, D: 合成

(2) 3および5 µm HCF上では、一部のNCL-2 cellが膜構造に一致して房状に多核構造をなし、増殖することがわかった(図2)。

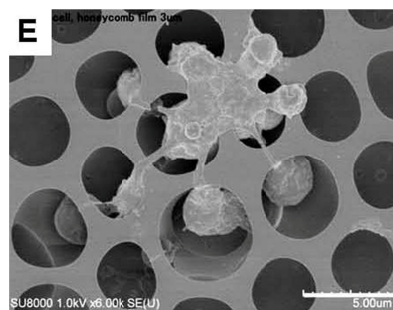


図2. 多核構造を示すNCL-2 cell(5 µm HCF上)走査型電子顕微鏡(SEM)による観察。

(3) NCL-2 cellは高分子ポリスチレンのフィルム上で培養すると、平幕よりハニカム構造の方が接着細胞が増加することがわかった。一方、NCL-2 cellの大きさは5 µm HCF上では大きく、10 µm HCF上では小さくなることがわかった。

(4) HCF上でもNCL-2 cellはアポトーシスを起こしておらず、細胞分裂期にあった。

(5) HCF上では、NCL-2 cellから分泌されるTNF-やロイコトリエンB4は減少するが、ヒスタミンの分泌は不変で、サブスタンスPも顕著な減少がなかった。前者は刺激によって肥満細胞内で即時合成されるサイトカインであり、後者はあらかじめ肥満細胞内の顆粒に貯蔵されているサイトカインである。

(6) 接着細胞であるRBL-2H3 cellは、浮遊細胞であるNCL-2 cellと違い、高分子ポリスチレンのフィルム上で培養すると、平幕よりハニカム構造の方が浮遊細胞が減少し、接着細胞が増加した。

(7) ガラス上よりも高分子ポリスチレンのフィルム上の方が、NCL-2浮遊細胞は増加するが、RBL-2H3浮遊細胞は逆に減少した。

(8) RBL-2H3 cellは、NCL-2 cellと違い、ガラスや高分子ポリスチレン平幕上では、偽

足を多く出していた。また、高分子ポリスチレン HCF 上では、NCL-2 cell のように多核化することなく、むしろ丸い形状のままで、少量の偽足をだしていた。

(9) RBL-2H3 cell は、NCL-2 cell と違い、HCF 上ではヒスタミン分泌量が増加した。またロイコトリエン B4 はむしろ増加傾向であった。

## 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3件)

Hyunmi Choi, Masaru Tanaka, Takaaki Hiragun, Michihiro Hide, Koreaki Sugimoto. Non-tumor mast cells cultured in vitro on a honeycomb-like structured film proliferate but downregulate with multinucleated formation. *Nanomedicine*, 査読有, Vol.10, 2014, 213-219.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.08.011>

Koreaki Sugimoto, Hyunmi Choi, Masaru Tanaka. Honeycomb-like structured film regulates mediator release from non-tumor mast cells.

*European Journal of Inflammation*, 査読有, 2014, in press.

Hyunmi Choi, Masaru Tanaka, Koreaki Sugimoto. Differences in cell proliferation and spontaneous mediator release between two mast cell lines (NCL-2 cells and RBL-2H3 cells) on honeycomb-like structured film. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 2014, in press.

### [学会発表](計5件)

杉本 是明, 崔 賢美, 田中 賢.

ハニカムフィルム上で培養された非腫瘍性肥満細胞 (NCL-2 cell) の多核化と機能低下について.

日本薬理学会, 2014年3月20日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).

崔 賢美, 田中 賢, 杉本 是明.

新規の自己増殖性正常肥満細胞 (NCL-2 cell) のハニカム構造フィルム上での増殖と分裂.

日本再生医療学会, 2013年3月21日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

K. Sugimoto, H. Choi, M. Tanaka, T. Hiragun, M. Hide.

Morphology and biochemical differences of mast cells (NCL-2 cells, RBL-2H3 cells) on the new extracellular matrix; Honeycomb Film. 10<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research.

2012年6月15日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

H. Choi, M, K. Sugimoto.

Morphology and biochemical differences of mast cells (NCL-2 cells, RBL-2H3 cells) on honeycomb-patterned polymer film.

Asian Science Seminar 2012, 2012年2月14日, ソウル大学 (韓国ソウル市)

杉本 是明.

Honeycomb film を用いた肥満細胞の制御に関する予備的研究.

日本歯科心身医学会, 2010年7月17日, 広島大学広仁会館 (広島県広島市).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉本 是明 (SUGIMOTO, Koreaki)  
東北福祉大学・総合福祉学部・教授  
研究者番号：30361158

(2)研究分担者

田中 賢 (TANAKA, Masaru)  
山形大学・理工学研究科・教授  
研究者番号：00322850  
(平成22年度のみ)