

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20883

研究課題名（和文）アレルギー疾患における生体内マスト細胞の量・空間・時間的解析

研究課題名（英文）Quantitative analysis of mast cells in allergic diseases

研究代表者

チャンゲン クオクブーン（Vtran, Nguyen）

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：30961346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、マスト細胞を可視化する最新技術を用いることで、定常状態およびアレルギー疾患時のマスト細胞数を定量化することである。申請者らは蛍光タンパク質によってマスト細胞を可視化する遺伝子改変マウス（Mcpt5-TdTomatoマウス）を作成して、その皮膚組織を、最新の組織透明化技術（Nat Protoc 14:3506, 2019）を使い透明化し、3次元蛍光イメージングを行ってマスト細胞の空間的・時間的分布の把握を試みた。その結果Mcpt5-TdTomatoマウス皮膚におけるマスト細胞は定常状態で皮膚真皮に可視化されKIT阻害剤投与後にはその大部分が消失することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を元にして、マスト細胞の空間的・時間的な状態を生体内で可視化することによって、アレルギー疾患のみならず自己免疫疾患や癌、線維化疾患などにおけるマスト細胞の役割が明らかになる。さらにマスト細胞を標的とした抗アレルギー作用を持つ薬剤の開発既存の抗アレルギー薬の作用を再評価することなどが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Visualization of mast cells using tissue-clearing technology²¹ in Mcpt5-Cre TdTomato^{fl/fl} mice enable us to better understand spatial and temporal distribution of mast cells in various organs such as skin and will be useful to evaluate therapeutic effects of allergy drugs on mast cells in vivo. In this study, we found the reduction of skin mast cells spatially in 3D after 7-week treatment with 100 mg/kg of MOD000001, a selective KIT inhibitor by using the fluorescence microscope-based findings in Mcpt5-Cre TdTomato^{fl/fl} mice. These findings suggest that visualization of mast cells by this technology will help us understand the mechanisms behind mast cell-targeted therapy in allergic diseases.

研究分野：アレルギー学

キーワード：マスト細胞 アレルギー 透明化技術

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、蕁麻疹、花粉症や喘息、食物アレルギーなどのアレルギー疾患の形成に中心的な役割を果たしている細胞である。マスト細胞は皮膚、気道粘膜、腸管粘膜など生体が外界と接する組織に多数存在する。この空間的配置により環境中アレルギーの侵入を検知し、アレルギー反応を始動、増強、制御する役割を担っている。

マスト細胞は、ヒト体内で1兆個近くあると言われるが正確な数は不明である。またマスト細胞は喘息や食物アレルギー、蕁麻疹などの病変部で増加すると考えられている。しかしこの知見は病理染色といった古い方法を使って、病変部のマスト細胞増加を観察し得られたもので組織全体や全身の動態は不明である。例えばマスト細胞が病変組織の一部に集積しているだけの可能性もある。したがって21世紀の現在でも個体・組織レベルでマスト細胞数を正しく評価することは未だ出来ていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マスト細胞を可視化する最新技術を用いることで、定常状態およびアレルギー疾患時のマスト細胞数を定量化することである。本研究により、マスト細胞についての定量的な理解が進み、アレルギー疾患の形成や治療効果に対する理解が飛躍的にアップデートすることが期待される。既存の抗アレルギー薬のマスト細胞への作用も捉えられ、想定外の薬の作用の発見にも繋がる。アレルギー疾患は日本では3人に1人が罹患しており我が国の健康・福祉の増進に貢献する。

3. 研究の方法

1) 蛍光タンパク質によってマスト細胞を可視化する遺伝子改変マウスの作成

マスト細胞は生体内で大きく結合組織型、粘膜型の2つに大別される。結合組織型マスト細胞は皮膚、腹腔、脂肪組織、脳などに存在し、粘膜型マスト細胞は気道、腸管、生殖器などに存在する。

本研究では結合組織型マスト細胞にフォーカスした。蛍光タンパク質によって結合組織型マスト細胞を可視化するために、結合組織型マスト細胞に特異的に発現する Mcpt5 (mast cell specific protease-5) のプロモーター領域に Cre タンパク質が結合したマウス (Mcpt5-Cre) と蛍光タンパク質である TdTomato が Flox 領域と結合したマウス (Floxed-Tdtomato) を交配し、結合組織型マスト細胞特異的に TdTomato を発現するマウスを作成した (Mcpt5-TdTomato)。

2) 組織透明化技術と3次元蛍光イメージングを用いたマスト細胞の数や分布の解析

現在、生体組織から高屈折率成分を除いたり、溶媒を高屈折率液体へ置き換えることにより光散乱を低減し固定組織を透明化する技術が注目され、基礎生物学分野や製薬分野でこの技術導入が少しずつ広がっている。この技術は、従来二次元を主体として行われてきた組織学を三次元に拡張し組織学における新たな視野を得るための方法の一つ

となる。

Mcpt5-TdTomato の皮膚組織を、最新の組織透明化技術 (Nat Protoc 14:3506, 2019) を使い透明化し 3次元蛍光イメージングを行い、画像解析によりマスト細胞数の定量を試みた。

4 . 研究成果

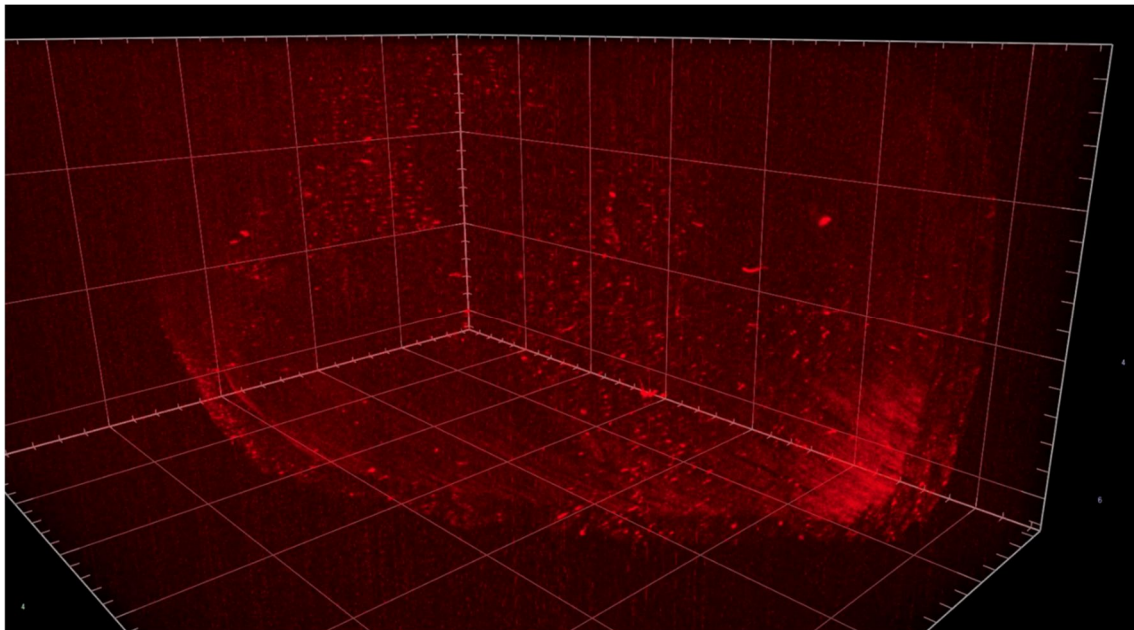
Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織を透明化し、3次元蛍光イメージングを行い、画像解析によりマスト細胞数を同定、定量化を試みた。Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織、特に真皮中に赤色に染色される多数のマスト細胞を同定することに成功した (図 1)。

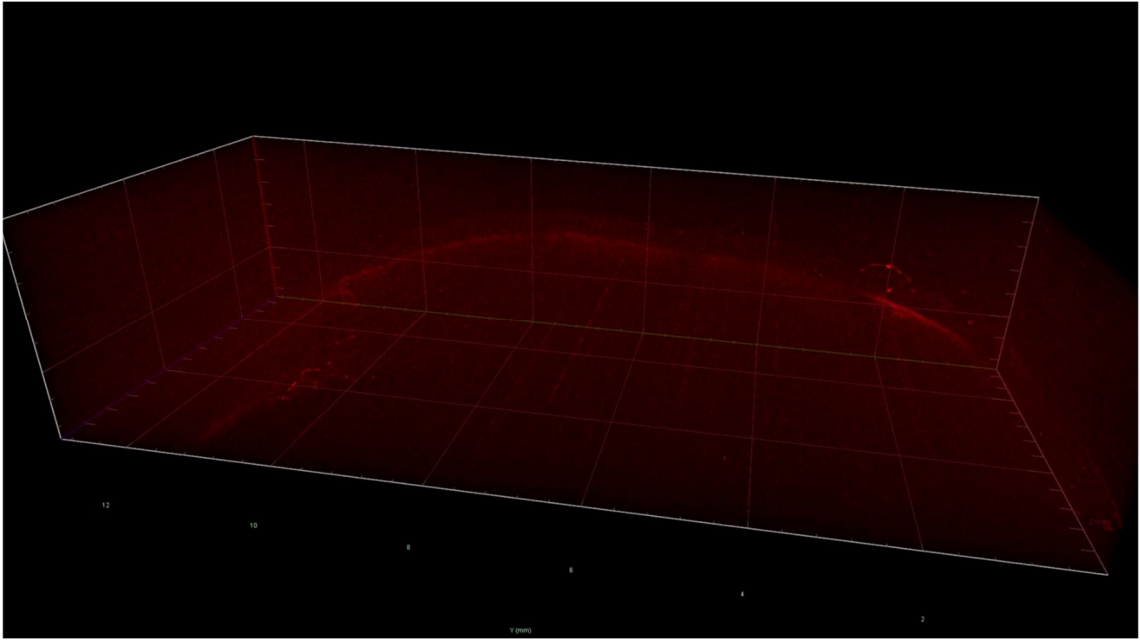
図 1 : マウス皮膚における組織透明化技術を用いたマスト細胞可視化

上パネル : MCPT-5-TdTomato マウス皮膚における組織透明化技術を用いたマスト細胞可視化

下パネル : コントロールマウス皮膚

赤く染色された粒様に見えるのが結合組織型マスト細胞で、
コントロールマウス皮膚では認められない





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tran Nguyen Quoc Vuong, Le Minh-Khang, Nguyen Thuy-An, Kondo Tetsuo, Nakao Atsuhito	4. 巻 24
2. 論文標題 Association of Circadian Clock Gene Expression with Pediatric/Adolescent Asthma and Its Comorbidities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7477 ~ 7477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24087477	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 Nakamura Yuki, Urakami Takeo, Ishimaru Kayoko, Vuong Tran Nguyen Quoc, Shimizu Takafumi, Sinko William, Takahashi Taisuke, Marappan Sivapriya, Narayanan Kishore, Poddutoori Ramulu, Terada Yoh, Nakao Atsuhito	4. 巻 3
2. 論文標題 A highly selective KIT inhibitor MOD000001 suppresses IgE-mediated mast cell activation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology: Global	6. 最初と最後の頁 100249 ~ 100249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacig.2024.100249	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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