

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380175

研究課題名(和文) 組織再構築に関わるマスト細胞の新機能

研究課題名(英文) A novel physiological function of mast cells on tissue remodeling

研究代表者

汾陽 光盛 (Kawaminami, Mitsumori)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：00153007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：顕著な成果を要約すると1) 離乳後退縮期の乳腺にそれまで認められないGnRH受容体発現が増加することを明らかにした。2) ラットの性周期を通して卵巣内マスト細胞が大きく変動し、GnRH発現パターンはマスト細胞数の変動に一致することを明らかにした。3) 精巣摘出後、経時的に、前立腺内にマスト細胞が急増すること、これに伴ってGnRHとアネキシンA5合成の増加することを明らかにした。4) GnRH受容体下流で働く細胞内因子を解析することで、新規のペプチドを明らかにした。本研究によって、他の免疫系細胞に比べて、その動態や機能がよく分かっていないマスト細胞の新規生理機能の存在を明らかにし得たと言える。

研究成果の概要(英文)：Remarkable results are summarized as following. 1) The expression of GnRH receptor in the mammary gland is augmented after weaning. 2) The number of ovarian mast cells varies during an estrous cycle with two peaks. Those peaks matched with the variation of ovarian expression of GnRH mRNA. 3) As a tissue remodeling model, the changes in histology and mast cell number of prostate were examined after orchidectomy. Mast cell, GnRH and annexin A5 all were increased in the prostate gland after orchidectomy. 4) We found two new signaling agents in the gonadotropes whose expression was increased by GnRH. By this research the existence of a novel physiological function at tissue remodeling of mast cell was demonstrated.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：マスト細胞 組織リモデリング 卵巣 前立腺 乳腺

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞(肥満細胞)は、造血幹細胞由来の免疫系細胞で、ヒスタミンを始めとする活性物質を分泌し、炎症や免疫反応で重要な役割を演じていることはよく知られている。申請者は、このマスト細胞が視床下部ホルモンである「性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)」を生産し、乳腺上皮細胞のアポトーシスを誘導することを発見した。マスト細胞は、この機能によって泌乳後乳腺の退縮に一義的役割を演じていると考えられる。この発見は、組織の退行・萎縮の機序や、その時のマスト細胞の意義を解明する突破口になると考えられた。一方、一般で行われていたマスト細胞の機能解析研究は、従来のパラダイムを出るものではなく、炎症やアレルギー反応の実行細胞として解析されていた。この事情は現在でも大きく変わっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、このような背景の下で、マスト細胞の組織再構築(リモデリング)やアポトーシス誘導への関与とその分子機序を解明し、マスト細胞の新たな生理機能を提示することにある。組織リモデリング時のマスト細胞の動態を明らかにし、末梢組織におけるGnRHの作用を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、「マスト細胞が組織再構築に働くメカニズム」、更に「組織リモデリングに普遍的に関与するか否か」、「アポトーシス誘導の分子機序」について明らかにすることを旨とした。具体的には、当初4項目を研究到達目標として設定した。

- 1) GnRHが乳腺上皮細胞にアポトーシスを起こす機序
- 2) 卵巣に集積するマスト細胞の機能
- 3) 心臓、胸腺、前立腺における組織リモデリングへのマスト細胞の関与
- 4) GnRHのアネキシンA5を介する機能

4. 研究成果

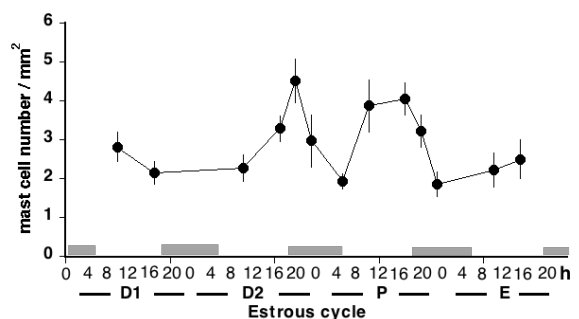
1) GnRHが乳腺上皮細胞にアポトーシスを起こす機序

乳腺上皮細胞の細胞株HC11を導入してGnRHの細胞増殖に対する影響を調べた。また、強制離乳後に乳腺局所にGnRH拮抗薬を投与すると、退縮の抑制されることを観察した。HC11細胞を用いて増殖関連の細胞内シグナル分子について解析を行った。一通りの結果を得ているが、現在確認実験を進めている。GnRHが乳腺上皮細胞に作用することは確実で、この事実は全く知られていなかった。なぜなら、GnRH発現が知られているのに対して、乳腺組織にGnRH受容体は存在しないとされてきたからである。本研究では、離乳後退縮期の乳腺にそれまで認められないGnRH受容体発現が増加すること、即ち時期特異的に受容体発現の調節されていることが明らかにされた。GnRH受容体遺伝子発現を増やすシグナルが何か、検討を続けている。

2) 卵巣に集積するマスト細胞の機能

ラットの性周期を通して卵巣を採取し、組織切片を作製した。性周期中の各時刻(13ポイント)でマスト細胞を数えた。

性周期を通してその数が大きく変動すること、発情休止期夕刻と発情前期夕刻の2回ピークのあることが明らかになった(下図)。これらの時刻は、性周期黄体が退行を開始する時期、及び排卵されない卵巣が退行する時期に一致している。



卵巣のGnRH発現量を測定すると、やはり

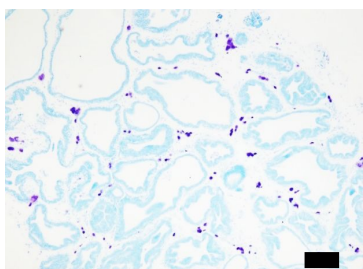
大きく変動し、そのパターンはマスト細胞数の変動に一致した。内容について現在投稿準備中である。一部は繁殖生物学会で発表した。

3) 心臓、胸腺、前立腺における組織リモデリングへのマスト細胞の関与

組織リモデリングとマスト細胞の関係に普遍性があるか否かを検討するために心筋の線維化、胸腺の退縮、去勢後の前立腺退縮をモデルとしてマスト細胞と GnRH の関与を調べた。

イソプロテレノール投与後の心筋の線維化は、心筋リモデリングの実験モデルとしてよく利用される。そこで本研究でもラットにイソプロテレノールを投与し、その後線維化開始後に心臓を採取し、アザン染色を行うと共にマスト細胞の分布を調べた。心筋の線維化部分はアザン染色で容易に区別できる。マスト細胞は確かに病変部に観察されたが、卵巣や乳腺ほど多くなく、処置後の観察時期を含めて検討を続けている。胸腺にもマスト細胞が観察され、胸腺細胞が GnRH 投与によってアポトーシスを起こすことを観察した。但しその効果はコルチゾールに比べると低かった。

精巣摘出後、経時的に前立腺を観察すると、前立腺内にマスト細胞が急増すること、これに伴って GnRH とアネキシン A 5 合成の増加することを明らかにした。これらの変化は、前立腺退縮という組織リモデリングとマスト細胞、及び GnRH の関与を強く示唆するものだが、その機序は分かっていない。この研究の一部を獣医学会で発表した。下はマスト細胞が増加した去勢後 4 日目の前立腺。



GnRH を用いたケモタキシス実験で GnRH がマスト細胞のケモアトラクタントとして作用し得ること、遺伝的にマスト細胞を持たない Wsh マウスの卵巣 GnRH 発現量が対象マウスと大きく変わらなかったことなどから、現時点では組織再構築を伴う変化として局所での GnRH 合成の増加がおり、GnRH によってマスト細胞が浸潤すると考えている。但し、生理的条件によってマスト細胞の寄与が増大する可能性も捨てきれず検討を続けている。

4) GnRH のアネキシン A5 を介する機能

GnRH は細胞膜にある GPCR である特異的受容体を介して作用する。GnRH 受容体のシグナルトランスダクションは Gq/11 を主に介するもので、ホスホリパーゼ C の活性化によるプロテインキナーゼ C の活性化、細胞内カルシウムの増加を引き起こす。更に引き続いて MAPK 系の活性化が誘導される。しかし、cAMP 産生を促進する系や抑制する系の関与も知られており、実体は未だ不明の部分が多い。これらのシグナルを受けて細胞内に起こる変化は、更によく分かっていない。そこで本研究では、GnRH 受容体下流で働く細胞内因子を解析することで、新規のペプチドを明らかにした。現在までにアネキシン A5 に加えて Mx1 の新規バリエーションと Nr4a3 が新たに GnRH 受容体下流で誘導されることを明らかにした。Mx1 について、その内容を元に平成 26 年度から科研費の挑戦的萌芽研究を受領している。

以上のごとく本研究によって、マスト細胞が乳腺以外にも GnRH と深く関係していること、リモデリングを伴う生理的变化時に局所に集まってくる例が明らかにされた。特に卵巣では、周期的に黄体退行、余分な卵胞の退行が起こっており、マスト細胞の機能を調べる良いモデルであることが明らかにされた。

他の免疫系細胞に比べて、その動態や機能がよく分かっていないマスト細胞の新規生理機能の存在を明らかにし得たと言える。

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 12 件)

Ueki H, Mizushina T, Laharatchathanin T, Terashima R, Nishimura Y, Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Brachyogel B, Poschl E, Kawaminami M. Loss of maternal annexin A5 increases the likelihood of Placental platelet thrombosis and foetal loss. Scientific reports 2012, 2:827 DOI: 10.1038/srep00827 査読有

〔学会発表〕(計 42 件)

空 純子, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 去勢後のラット前立腺退縮に伴うマスト細胞の浸潤とGnRH-アネキシンA5系の変化 第156回日本獣医学会 岐阜市(岐阜県) 2013/9/20

寺島涼太, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 ゴナドトロフにおける Myxovirus resistance 1(Mx1)のイントロン複合型 mRNA の発現 第28回日本下垂体研究会 花巻市(岩手県) 2013/8/8

Terashima R, Laoharatchathanin T, Yonezawa T, Kurusu S, Kato, T, Kato Y, Kawaminami M. Interferon (IFN) -alpha stimulates the accumulation of Myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1) pseudo-gene transcripts including an intron-containing transcript in mouse pituitary gonadotropes: possible relation to intra-pituitary action of IFN-alpha (San Francisco,USA) 2013/6/15

寺島涼太, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)による抗ウイルス遺伝子 myxovirus resistance 1(Mx1) mRNA 発現の変動 第154回日本獣医学会 盛岡市(岩手県) 2012/9/15

ラウハラツチャダタニン ティタリー, 寺島涼太, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 Changes in number of ovarian mast cells during estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy of rats: implications for the expression of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the ovary. 第104回日本繁殖生物学会 盛岡市(岩手県) 2011/9/16

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称:細胞増殖抑制剤

発明者:汾陽光盛

権利者:学校法人北里研究所

種類:特許

番号:特許5320719号

取得年月日:2012/7/6

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/physiology/Lab_of_Vet_Physiology/Welcome.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

汾陽 光盛(KAWAMINAMI, Mitsumori)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号:00153007

(2)研究分担者

米澤 智洋(YONEZAWA, Tomohiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号:10433715

橋本 統(HASHIMOTO, Osamu)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号:90317058

(3)連携研究者

長谷川 喜久(HASEGAWA Yoshihisa)

北里大学・客員教授

研究者番号:40092001