

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461498

研究課題名(和文)生物毒や毒性物質に対するマスト細胞による生体防御調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mast cell-mediated host defense mechanism against animal venoms and toxic components

研究代表者

赤星 光輝 (AKAHOSHI, Mitsuteru)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40391841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞のクモ毒やフグ毒に対する生体防御の働きは示されなかったため、次に「全身性強皮症におけるマスト細胞および生理活性物質の役割」について検討した。エンドセリン-1やヒスタミンの血中濃度は強皮症患者において健常者より高い傾向が見られ、ヒスタミン値は間質性肺炎合併例で特に高く、肺機能との相関が認められた。強皮症皮膚組織にもマスト細胞の数の増加や活性化が認められた。強皮症モデルマウスの解析ではマスト細胞欠損マウスで強皮症病態がより軽微であった。以上より強皮症病態形成におけるマスト細胞の役割が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A role of mast cell (MC)-mediated host defense against spider venom and fugu toxin was unclear. Then, we examined a role of MCs and their related bioactive peptides in the pathophysiology of systemic sclerosis (SSc). The blood levels of endothelin-1 and histamine were elevated in patients with SSc than those of healthy donors. Among them, the serum levels of histamine were especially high in SSc patients with interstitial pneumonia, and the values of histamine showed correlation with their lung function parameters. Increased numbers and activation (degranulation) of MCs were found in skin of our SSc patients. Bleomycin-induced dermal fibrosis was less severe in MC-deficient C57BL/6-Kit(W-sh/W-sh) mice than that in wild-type B6 mice. Taken together, a role of MCs was indicated in the pathological mechanism of SSc.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：マスト細胞 生物毒 生体防御 全身性強皮症 生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

(1) マスト細胞はその細胞表面に発現した高親和性 IgE 受容体と IgE および抗原との架橋によりヒスタミンなどの化学伝達物質の放出や脂質メディエーター、サイトカインの合成・分泌を生じ、アレルギー反応を惹起することが知られている。これは特定の抗原に対する IgE 抗体を介する獲得免疫であるが、1996 年の Nature 誌に発表された 2 報の論文により、マスト細胞の自然免疫における重要な役割も認識されるようになった (*Echtenacher B, et al. Nature 1996;381:75. Malaviya R, et al. Nature 1996;381:77.*)。その後多くの研究において細菌など様々な病原微生物への宿主の抵抗性にマスト細胞が不可欠な役割を担っていることが明らかにされ、自然免疫・生体防御におけるマスト細胞の重要性が示されている。

(2) 一方で Higginbotham らはマスト細胞由来のヘパリンがヘビ毒やハチ毒への抵抗性を高めている可能性をそれぞれ 1965 年と 1971 年に提唱していたが (*Higginbotham RD. J Immunol 1965;95:867. Higginbotham RD and Karnella S. J Immunol 1971;106:233.*)、実際に近年、マスト細胞が特定のヘビ毒やハチ毒への抵抗性を増強させる働きが証明され (*Metz M, et al. Science 2006;313:526.*)、マスト細胞の持つ多様なエフェクター機能の新たな一面が明らかにされた。その生体保護作用のメカニズムとしては、イスラエルヘビ毒の場合、マスト細胞由来のプロテアーゼ (カルボキシペプチダーゼ A3, CPA3) が、内因性ペプチドであるエンドセリン-1 (ET-1) と相同性の高い、主要なトキシンであるサラフォトキシン 6b (S6b) を分解し毒性を減弱させることで抵抗性を発揮していることが強く示唆されている (*Metz M, et al. Science 2006;313:526. Schneider LA, et al. J Exp Med 2007;204:2629.*)。

(3) さらに最近我々は、CPA3 以外にもマスト細胞由来の別のプロテアーゼである chymase (マストセルプロテアーゼ 4, MCTP4) も同様の作用を有していることを示した。すなわちマスト細胞は主に MCTP4 依存性のメカニズムにより、Gila monster と呼ばれるトカゲ毒、その主要な毒性物質である helodermin、helodermin と構造的相同性を持った内因性ペプチドで神経ペプチドの一種である vasoactive intestinal polypeptide (VIP)、さらに 2 種類のサソリ毒に対する宿主の抵抗性を増強させることを明らかにした (*Akahoshi M, et al. J Clin Invest 2011;121:4180.*)。このようにマスト細胞は多様な毒性化学物質を含んだ外来性の生物毒に対し、蓄えられた多量のプロテアーゼを迅速に放出しその毒性物質を分解解毒することで innate な生体防御反応に寄与していることが示されている。

2. 研究の目的

(1) これまでの報告から生物毒に対するマスト細胞のポジティブな生体防御の役割が示唆されたが、本研究ではさらに解析対象を広げ、これまで未解析の種々の生物毒やトキシンに対するマスト細胞の解毒分解作用の有無を検討する。

(2) さらにこれまでマスト細胞による分解調節作用が明らかとなっている内因性ペプチドの ET-1 が、関連するヒトの疾患である全身性強皮症の病態形成にどのように関与するのかを検討する。ET-1 はイスラエルヘビ毒の主要なトキシンである S6b と高い相同性を持ち、マスト細胞プロテアーゼ CPA3 によって分解される (*Schneider LA, et al. J Exp Med 2007;204:2629.*)。ET-1 は強皮症の病態、とくに肺高血圧症への関与が示されており、ET-1 受容体拮抗薬は肺高血圧症の有効な新規治療薬として臨床応用されている。また皮

膚硬化や肺高血圧などの強皮症病態におけるマスト細胞の関与を示唆した報告もある (Yukawa S, et al. *Jpn J Clin Immunol* 2010;33:81.)。本研究ではヒト強皮症患者や強皮症モデルマウスにおける血中 ET-1 濃度あるいはマスト細胞の質的量的変化を評価し、ET-1 などの生理活性物質を介したマスト細胞の強皮症病態への関与を検討する。

(3) 本研究では、マスト細胞の持つ生物毒や毒性物質に対する分解解毒・生体保護作用についてのさらに幅広い評価を行うことで、マスト細胞の本来備える生理的な生体防御における役割についての理解を深めることを目的とする。内因性外因性毒性物質に対する生体防御におけるマスト細胞の新たな機能を明らかにする事で、動物毒素自体に対する治療やマスト細胞が病態形成に関与する免疫アレルギー疾患への予防・治療応用にも何らかの手がかりを与える知見が得られるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 生物毒のマウスに及ぼす *in vivo* での反応性の比較: 種々の生物毒投与時の野生型マウス (C57BL/6J) と *Kit* 遺伝子変異をもつマスト細胞欠損マウス (C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}) での反応性を比較する。野生型マウスとマスト細胞欠損マウスで毒物に対する生体反応性 (体温変化や致死性) を比較し、両者で明らかな差が認められた場合、さらにマスト細胞ノックインマウス (野生型マウス由来の培養マスト細胞を移入したマスト細胞欠損マウス) を作成し、反応性を比較する。

マスト細胞による生物毒の毒性減弱効果が確認された場合、マスト細胞由来のプロテアーゼを介した機序によるものかどうかを確かめるため、特定のプロテアーゼ欠損マウスあるいは不活化マウスを用いて同じ条件下で毒物投与を行い、その生体反応を野生型と

比較する。

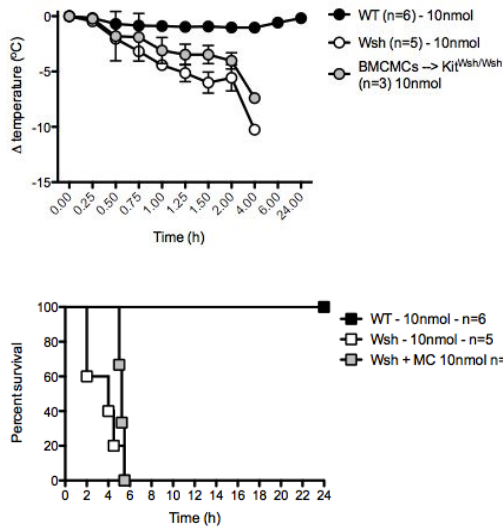
(2) 生物毒に対するマスト細胞の脱顆粒の評価: 毒物投与局所でのマスト細胞の脱顆粒の評価を行うために投与部位組織 (耳介や胃) をホルマリン固定し、パラフィン包埋後切片を作成しトルイジンブルーで染色を行い、マスト細胞の数および脱顆粒の程度を定量的に評価する。

(3) 強皮症病態形成におけるエンドセリン-1 (ET-1) およびマスト細胞の意義: 九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科に入院・通院中で同意の得られた全身性强皮症患者より末梢血を採取し、血中 ET-1 濃度、マスト細胞活性化マーカーである血中ヒスタミン濃度を ELISA 法にて測定する。それらのマーカー値や皮膚のマスト細胞数と、臨床病態 (皮膚硬化の分布・程度、間質性肺炎や肺高血圧合併の有無、自己抗体の有無) や肺機能検査との比較を行い ET-1/マスト細胞の病態への関与を検討する。また強皮症モデルマウス (ブレオマイシン誘導モデルマウス) を用いて同様に野生型マウス (C57BL/6J) と *Kit* 遺伝子変異をもつマスト細胞欠損マウス (C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}) での皮膚硬化など強皮症病態の重症度を比較する。血中 ET-1/ヒスタミン濃度の測定、皮膚のマスト細胞数などでマスト細胞の数や活性化状態を評価し、ET-1 を介したマスト細胞の強皮症病態への関与を検討する。

4. 研究成果

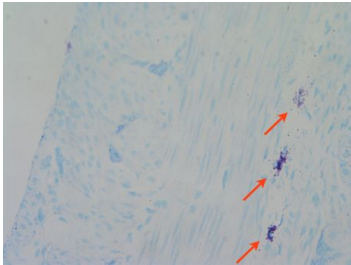
(1) 「マスト細胞の生物毒に対する生体防御機構の役割」についての解析の結果、クモ毒の一部に対してはマスト細胞の生体防御の働きは示されず、また、*Kit* 遺伝子変異マウスは、マスト細胞非依存的にフグ毒に対する抵抗性・防御反応が低下している可能性が示唆された (図 1)。

(図 1)



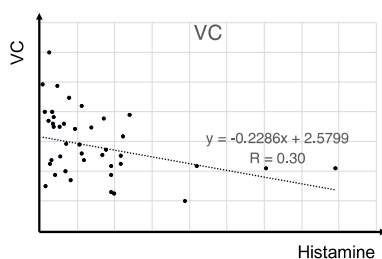
(2) フグ毒 (テトロドトキシン) にて胃マスト細胞の脱顆粒が認められた (図 2)

(図 2)



(3) 血中 ET-1、ヒスタミン濃度いずれも全身性強皮症患者において健常者や他の膠原病患者より高い傾向が認められた。血清ヒスタミン値については強皮症患者、とくに間質性肺炎合併例で高い傾向がみられ、血中ヒスタミン値と肺機能・間質性肺炎マーカーとの相関が認められた (図 3)

(図 3)



(4) 強皮症皮膚の生検組織においてマスト細胞の発現亢進・活性化が認められた。

(5) 代表的な強皮症モデルであるブレオマイシン誘導強皮症モデルを用いて、野生型とマスト細胞欠損マウスとの比較を行った。これまでの検討ではマスト細胞欠損マウスで強皮症病態が軽減しており強皮症病態形成におけるマスト細胞の関与が示唆された。今後、生理活性物質について評価を行う予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤星 光輝 (AKAHOSHI, Mitsuteru)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 40391841

(2)研究分担者

有信 洋二郎 (ARINOBU, Yojiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号： 90467928