

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08999

研究課題名(和文)炎症・疼痛制御における肥満細胞、マクロファージ高硫酸化プロテオグリカンの機能解明

研究課題名(英文) Study on the role of proteoglycans of mast cells and macrophages in the control of inflammation and pain

研究代表者

羽瀧 脩躬 (Habuchi, Osami)

愛知医科大学・公立大学の部局等・客員教授

研究者番号：90024067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：モノヨード酢酸誘起マウスOA膝関節に骨髄由来肥満細胞(BMMC)を移入すると、痛みが再発した。正常関節にBMMCを移入しても痛みが発生しないので、OA関節内でBMMCが脱顆粒し疼痛因子を放出したと考えられる。プロテアーゼ活性化受容体2のアンタゴニスト存在下でBMMCを移入すると痛みが発生しないことは、脱顆粒により放出されたトリプターゼが疼痛因子として働くことを示す。ATP分解酵素アピラーゼはBMMCによる痛み再発を低減するので、BMMCの脱顆粒に細胞外ATPが関与する可能性がある。BMMCによる痛み再発はIL-1b, IL-6, CXCL2, CCL2, MMP9の遺伝子発現上昇を伴っていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)は最も多い慢性関節疾患であり、高齢者の移動能を損なう最も大きな原因である。疼痛はOAの主要症状であるが、X線観察に基づく疾患の重篤度との間には関連が少ない。疼痛の起きる原因としくみを解明することは症状を緩和し機能改善の治療法開発に重要である。OAの疼痛に肥満細胞が関係する可能性は報告されているが、分子機構はまだほとんど未解明である。本研究では培養肥満細胞をOAの関節に移入する実験系を開発し、疼痛発生に肥満細胞トリプターゼが関与すること、肥満細胞の脱顆粒に細胞外ATPが関与することを示唆する結果を得た。これらの成果は新たな治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that bone marrow derived mast cells (BMMCs) elicited pain when injected into monoiodoacetic acid (MIA)-induced osteoarthritic mouse knee joint. No pain induction was observed when BMMCs were injected into the MIA-untreated mice, indicating that the injected BMMCs are thought to be activated within the osteoarthritic joint and release some pain-inducible factors. When BMMCs were injected in the presence of a protease activated receptor-2 (PAR2) antagonist peptide, they failed to induce pain, suggesting that a mast cell protease, tryptase released from BMMC on their degranulation might participate in the pain induction through activation of PAR2 receptor. When apyrase that degrades extracellular ATP was injected into MIA-induced osteoarthritic joint before injection of BMMCs, pain was not induced, suggesting that ATP may play a role in the activation of BMMCs. Injection of BMMC to MIA-induced osteoarthritic joints stimulate expression of IL-1b, IL-6, CXCL2, CCL2, and MMP9 gene.

研究分野：生化学

キーワード：変形性関節炎 モノヨード酢酸 肥満細胞 痛み トリプターゼ PAR2 ATP アピラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満細胞はアレルギー反応に中心的な役割を果たすだけでなく、炎症と痛みの病理にも深く関係する。変形性関節炎(OA)に伴う痛みの発生に肥満細胞が関与していることが報告されている(1)。種々の原因で起きるヒトの OA では、一旦弱くなった痛みが再度増強することが臨床的に知られている。また OA の滑液には正常関節よりも肥満細胞が多く含まれることが知られており、肥満細胞が痛みを引き起こす可能性が考えられるが、その分子メカニズムはほとんど未解明である。実験的に OA を引き起こす方法としてモノヨード酢酸(MIA)の関節内投与がある。一方骨髄由来肥満細胞(BMMC)は骨髄細胞の培養により得られる分化段階の未熟な肥満細胞と考えられ、マウス体内に移入すると結合組織肥満細胞、または粘膜系肥満細胞に分化できることが知られている。MIA 誘起 OA の実験系と BMMC を組み合わせれば肥満細胞が痛みを引き起こす分子メカニズムを解明できると期待された。肥満細胞にはヘパリンやコンドロイチン硫酸 E が含まれており、特異的スルホトランスフェラーゼを欠損するマウスから調製した肥満細胞を用いることにより、これらの分子が肥満細胞特異的プロテアーゼの顆粒内への保持に機能に果たすことを私たちは明らかにした(2)。コンドロイチン硫酸 E を欠損する BMMC を用いれば、CS-E が炎症に伴う痛みの発生に関与するかどうか調べることができると考えられた。骨髄細胞の培養により種々の分化段階にあるマクロファージを得ることができ、このようなマクロファージを用いて OA の痛みへの影響を調べるのが可能となると考えられた。

2. 研究の目的

肥満細胞がどのような分子メカニズムで痛みを誘起するかを解明するため、マウスの実験的 OA を痛み発症の系として取り上げ、肥満細胞として均質な細胞集団を再現性良く調製できる骨髄由来肥満細胞 (BMMC) を用いて実験を行う。痛み発症に CS-E が寄与するか調べるため、CS-E 欠損マウスを OA マウスあるいは BMMC 供与マウスとする実験を行う。肥満細胞の実験に続いて骨髄由来マクロファージを用いた実験を行う。

3. 研究の方法

(1) マウスの処理方法

使用したマウスは8週齢 C57BL/6J。A-H のグループに分け、図1示すようにマウスを処理した。イソフランで麻酔後以下の試料を図1に従って右膝関節内に注射した：1 mg MIA を含む 20 μ L PBS, 20 または 10 μ L PBS, 1 x 10⁶ BMMCs を含む 20 μ L PBS, 1 x 10⁶ BMMCs と 10 nmol PAR2 アンタゴニスト (FSLRLY-NH₂) を含む 20 μ L PBS, 20 nmol PAR2 アゴニスト (SLIGKV-NH₂) を含む 20 μ L PBS, 0.2 unit アピラーゼを含む 10 μ L PBS。注射はポリエチレンチューブを介してマイクロシリンジにつないだ 30G 注射針で行った。図に示した日に痛み行動を観測した。21 日目に膝蓋下脂肪体(FP)から RNA を抽出した。

(2) 痛み行動の観察と痛みの定量化

ケージ内で自由行動させたマウスは両前肢を壁に当てて後肢で立ち上がる(rearing)。MIA を注射すると時々左後肢で立ち上がる(図2b)。これは右後肢を痛みから保護するための行動と考えられる。そこで次式で表される SPS (Single paw standing)を求め痛みを示す数値として使用した。

$$SPS = 100 \times (a-b) / (a+b+c)$$

ここで a は左後肢で立つ回数; b は 右後肢で立つ回数; c は両後肢で立つ回数。

(3) BMMC の培養

9-14 週齢 C57BL/6 マウスの 大腿骨から骨髄細胞を調製し専用培養液 (10% 牛胎児血清、50% WEHI-3 培養液を含む RPMI 1640) で5週間培養した。

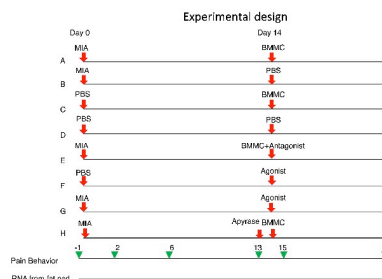


図 1



図 2a 両後肢で立つマウス



図 2b 左後肢で立つマウス

(4) ATP 処理で BMMC から放出されたトリプターゼ活性の測定

5 週間培養した BMMCs (1x10⁶ cells) を 96 穴培養皿に播き、ATP (100 μl PBS 中 10 μM または 1 mM) と 37°C で 1 h 保温した。保温後 細胞懸濁液を遠心 (1500 rpm, 5min) し、200 μl の溶解液 (2 M NaCl, 0.5% Triton X-100 を含むリン酸バッファー) で溶解する。反応液 (最終体積 120 μl) には 5-μl 溶解液または 30μl の培養上清, 20 μl の 1.8 mM 基質色素(S-2288)が含まれる。37°C で保温し、405 nm の吸収をマイクロプレートリーダーでモニターする。酵素活性は抽出後直ちに測定する。

(5) 滑液中の ATP 定量

膝関節滑液を濾紙片 (2 mm x 10 mm) で吸収する。20 μl の蒸留水で溶出し ATP をルシフェラーゼキット (Cayman Chemical) で測定する。

(6) RNA の抽出、qRT-PCR による mRNA 発現の測定

Total RNA は右膝の膝蓋下脂肪体から Trizol kit with DNA Eraser (Takara)により行った。qRT-PCR は表 1 に示した特異的プライマーを用い、TB Green Premix Ex TaqII (TliRNase H Plus) (Takara, Shiga, Japan)を用い ABI Prism 7300 で行った。独立した 3 以上の試料についてトリPLICATEで行った。

gene name	F primer	R primer
b-actin	CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
Cxcl2	GCGC GTGCAATGCCTGAAG	TTTGACCGCCCTTGAGAGT
Ccl2	AGCAGCAGGTGTCCCAAAGA	GTGCTGAAGACCTTAGGGCAGA
NGF	TGCCAAGGACGCAGTTC	TGAAGTTAGTCCAGTGGGCTCAG
IL-1b	AAGCTCTCCACCTCAATGA	TGC TTGTGAGTGCTGATGT
IL-6	CCACTTACAAAGTCGGAGGCTTA	GCAAGTGCATCATGTTGTTCATAC
TNF-α	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	CGGACTCCGAAAGTCTAAG
P2x4	GCAGAAAACCTCACCCCTTGG	AGGTAGGAGTGGTAATGTTGG
P2x7	GCAGGGGAACCTGATCTTTGTG	TCCACCCCTTTTACAACGG
MMP9	CCATGCAC TGGGCTTAGATCA	GGCCTTGGGTCAGGCTTAGA
MMP13	GTGCCTGATGTGGTGAATACAA	CAC TTCAGAATGGACATATCAGGA
CGRP	TTGTCAGCATCTTGCTCTGTACC	TTGATCTGCATATAGCTCGCACCA

表 1

(7) 膝関節の組織化学的解析

膝関節を 0.5M EDTA で 5 日間室温で脱灰しその後 10% ホルムアルデヒドで固定した。固定試料

をパラフィンで包埋し 4 μm の切片を作製した。軟骨および肥満細胞中の硫酸化 GAG の染色は 0.05% トルイジンブルー, pH2.5 で行った。GFP または mMCP6(トリプターゼ)の蛍光免疫染色のために脱パラ後 0.1% トリプシンで 37°C、30 min 消化した。5% 正常ヤギ血清 (GFP) または 5% 正常ロバ血清 (MCP6)でブロック後抗 GFP 抗体または抗 MCP6 抗体と 4°C 一晚反応した。洗浄後 AlexaFluor546-標識抗ウサギ IgG 抗体(GFP) または AlexaFluor488-標識抗ヤギ IgG 抗体 (MCP6)で染色した。核染は DAPI で行った。PAR2 の免染ではトリプシン消化を省略した。画像は KEYENCE BZ-9000 顕微鏡で取得した。

4. 研究成果

(1) 移入した BMMC は関節内に存在する

GFP トランスジェニックマウスから調製した BMMC を膝関節に移入し、BMMC 移入 24 時間後 GFP の蛍光免疫染色を行い、細胞の局在を調べた (図 3)。TB, GFP, mMCP のいずれでも染色される細胞集団が滑膜に近接して存在していた。この細胞集団は移入した BMMC と考えられる。内在性の肥満細胞と思われる細胞 (GFP では染色されず mMCP で染色される細胞) が A(MIA 注射後 BMMC 注射)の切片で観察されるが C (PBS 注射後 BMMC 注射) の切片では観察されない。

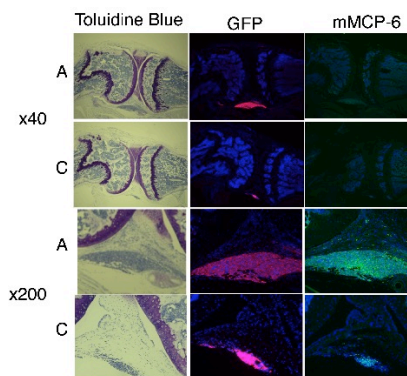


図 3

MIA 誘起 OA では内在性肥満細胞が炎症部にリクルートされることを示すと考えられる。

(2) BMMC は MIA 誘起 OA で痛みを再発させた。

MIA を注射後 2 日で痛みが強くなるが、13 日後には低下する (図 4 A, B)。14 日目に BMMC を移入すると痛みが再発する (図 4 A)。MIA を注射しなかった関節に BMMC を移入しても痛みは発生しなかった (図 4 C)。この結果は OA の関節に移入された BMMC は何らかの機序で活性化されたことを示す。

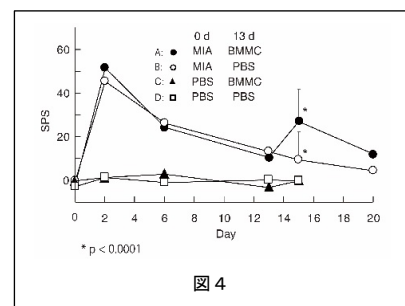


図 4

(3) MIA 誘起 OA の関節に移入された BMMC による痛み発症は PAR2 を介して起きる

トリプターゼは肥満細胞の顆粒内に含まれる主要なプロテアーゼで脱顆粒により細胞外に放出される。BMMC はトリプターゼを持つことが知られている。PAR2 はトリプターゼのようなセリンプロテアーゼにより活性化されシグナルを細胞内に伝える。PAR2 の活性化が BMMC による痛み発症に関与するかどうかを調べるため、MIA 誘起 OA に BMMC と PAR2 アンタゴニストを移入する実験を行った (図 1 E)。PAR2 アンタゴニスト (FSLRLY-NH₂)存在下で BMMC を移入すると、痛み発症は起きなかった (図 5)。このことは BMMC から放出されたトリプターゼが痛み発症に関与していることを示す。痛み発症に PAR2 が関与する可能性は、BMMC の代わりに PAR2 アゴニストを投与する実験 (図 1 G) でも示された。MIA 誘起 OA 関節に PAR2 アゴニスト (SLIGKV-NH₂) を注射すると、BMMC 不在下でも有意な痛み上昇が観察された (図 6)。

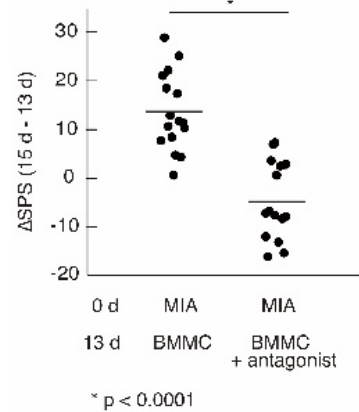


図 5

(4) BMMC の移入は PAR2 を介した炎症関連遺伝子の発現を促進する。

MIA 誘起 OA 関節の FP における種々の遺伝子の発現を MIA 注射後 21 日目で測定した。MIA 注射後 14 日目に BMMC を移入したマウスの FP における IL-1b, IL-6, TNF-a, CCL2, CXCL2, MMP9 の発現は BMMC の代わりに PBS を注射したときよりも高かった(図 7)。一方 MIA 注射後 14 日目に BMMC と PAR2 アンタゴニスト(FSLRLY-NH₂)を移入したマウスの FP におけるこれらの遺伝子発現は、BMMC のみを注射したときよりも低くなった (図 8)。これらの観察は脱顆粒により BMMC から放出されたトリプターゼが PAR2 を介してこれらの遺伝子発現を促進することを示す。MMP-13 の発現はそれ以外の遺伝子の発現とは逆方向に変化していた。

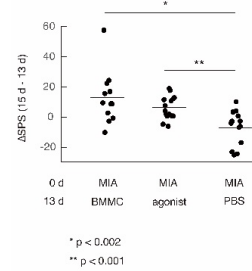


図 6

(5) PAR2 は MIA 誘起 OA 関節に発現している

トリプターゼの受容体で PAR2 であるが実際に関節組織に発現していることを確認するため、PAR2 を免疫染色した (図 9)。陽性シグナルは A(MIA 注射後 14 日目に BMMC を移入)の半月板と骨端軟骨表層、および軟骨下骨に検出された。C(PBS 注射後 14 日目に BMMC を移入)の試料ではシグナルは著しく弱くなった。

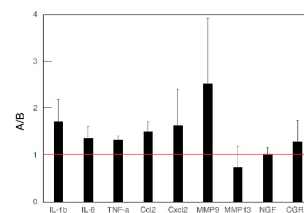


図 7

(6) MIA 誘起 OA 関節における BMMC の活性化には ATP が関与する可能性がある

滑液中の ATP 濃度は OA で増加することが知られている。また ATP は肥満細胞の脱顆粒を促進し、肥満細胞の化学誘引物質として働く。これらのことから MIA 誘起 OA 関節内で ATP が BMMC の脱顆粒を引き起こす因子として働く可能性がある。この可能性を確かめるため、BMMC による疼痛発症に及ぼすアピラーゼの影響を調べた。アピラーゼは植物由来の ATP 分解酵素である。MIA 注射後 13 日目でアピラーゼを注射し、14 日目に BMMC を注射した(図 1 H)と

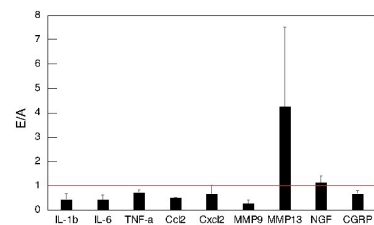


図 8

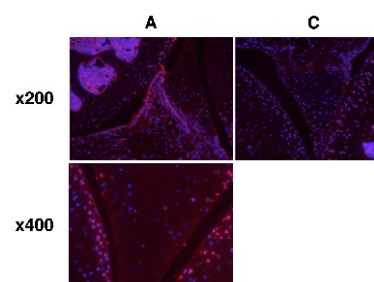


図 9

きの痛みはアピラーゼの代わりに PBS を注射した対照に比べ有意に低かった (図 10)。ATP に対する受容体である P2X7 と P2X4 の mRNAs は BMMC で発現していた (図 11)。ATP は BMMC からのトリプターゼの放出を促進した (図 12)。これらの観察から、ATP が MIA 誘起 OA 関節に移入された BMMC の脱顆粒を促進する可能性が支持される。

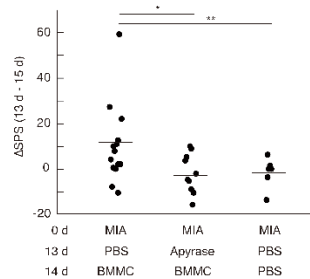


図 10

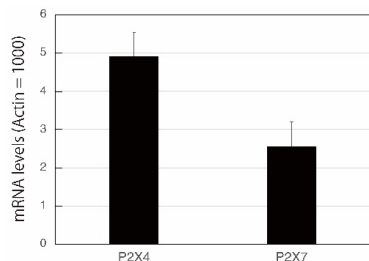


図 11

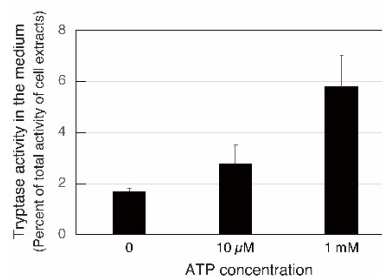


図 12

追記: 本研究期間内では骨髄由来マクロファージから培養系で M1 および M2 マクロファージに分化させる実験系は確立したが、これらのマクロファージが痛み発症に及ぼす影響を調べるには到らなかった。また CS-E 欠損マウスを用いて痛み発症に及ぼす CS-E の役割を調べることは、再現性ある結果を得るに到らなかった。

[引用文献]

1. Initiating pain in osteoarthritis (OA): is it the mast cell? Ioan-Facsinay A. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018 Jan;26(1):1-3
2. Ohtake-Niimi, S., Kondo, S., Ito, T, Kakehi, S., Ohta, T., Habuchi, H., Kimata, K., and Habuchi, O. (2010) Mice Deficient in N-Acetylgalactosamine 4-Sulfate 6-O-Sulfotransferase are Unable to Synthesize Chondroitin/Dermatan Sulfate containing N-Acetylgalactosamine 4, 6-Bissulfate Residues and Exhibit Decreased Protease Activity in Bone Marrow-Derived Mast Cells. *J. Biol. Chem.* 285, 20793-20805

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Habuchi H, Ushida T, Habuchi O.	4. 巻 2
2. 論文標題 Mice deficient in N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase exhibit enhanced liver fibrosis and delayed recovery from fibrosis in carbon tetrachloride-treated mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Heliyon2	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） 10.1016/j.heliyon.2016.e00138	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽瀧弘子、泉仁、團隼兵、牛田享宏、池内昌彦、羽瀧脩躬
2. 発表標題 変形性関節症モデルマウスにおけるマスト細胞の疼痛誘起作用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 羽瀧弘子、泉仁、團隼兵、牛田享宏、池内昌彦、羽瀧脩躬
2. 発表標題 MIA誘起OAマウスへの骨髄由来マスト細胞（BMMC）移入による疼痛発症にはトリプターゼの受容体であるPAR2活性化が関与する
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉仁、羽瀧弘子、羽瀧脩躬、池内昌彦、牛田享宏
2. 発表標題 変形性関節症モデルにおけるマスト細胞の役割
3. 学会等名 第9回運動器疼痛学会
4. 発表年 2016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
研究 分担 者	羽瀨 弘子 (Habuchi Hiroko) (90329821)	愛知医科大学・公私立大学の部局等・客員研究員 (33920)	