

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790100

研究課題名 (和文) 免疫応答のモジュレーターとしての成熟マスト細胞

研究課題名 (英文) Immune modulatory functions of mature mast cells

研究代表者

田中 智之 (TANAKA SATOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40303846

研究成果の概要 (和文) : マスト細胞は全身に分布する免疫細胞の一種であり、その性質は分布する組織によって異なることが知られている。本研究では従来検証が困難であった成熟マスト細胞の機能を、新たな培養系を構築することにより検討した。成熟マスト細胞モデルでは IgE 非依存性の刺激に対する応答性が亢進する一方で、IgE 依存性の抗原抗体反応の応答は低下していた。この成果は、組織におけるマスト細胞による免疫応答の調節機構を解明する上で、適切な組織マスト細胞モデルを構築することの重要性を示している。

研究成果の概要 (英文) : Mast cells are a kind of immune cells, which are widely distributed throughout the body, and are different in character depending on where they are resident. The functional roles of mature mast cells were investigated in this study using a novel culture model for mature mast cells. Mature mast cells were found to acquire the ability to respond to non-IgE stimuli, whereas they exhibited lower responses to IgE-dependent antigen stimulation. These findings suggest that appropriate culture models for tissue mature mast cells should be required for clarification of their immune modulatory functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：マスト細胞、線維芽細胞、細胞分化、脱顆粒、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

従来、マスト細胞は即時型アレルギーや寄生虫疾患における主要なエフェクター細胞

として認識されてきたが、近年の研究を通じて、微生物の感染応答や樹状細胞の機能の制御、免疫寛容といった幅広い現象に関わるこ

とが次第に明らかとなっている。こうした背景のもと、研究対象としてのマスト細胞は注目を集めているが、マスト細胞が組織中に散在し単離することが困難であることや、成熟マスト細胞の性質を反映する培養系が確立されていないことなどが障害となって、細胞レベルのマスト細胞研究の進展は遅れている。マスト細胞は造血幹細胞に由来するが、その最終分化は浸潤した組織で起こると考えられており、組織のマスト細胞はそれぞれの環境に応じたヘテロ性を有している。代表者は従来の骨髄由来培養マスト細胞の系をもとに皮膚に分布する成熟マスト細胞の性質をよく反映する培養系の開発に成功したことから、この系を用いて組織の成熟マスト細胞による免疫応答の制御機構を明らかにすることを構想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく二つに分類されるが、いずれも従来の未成熟なマスト細胞モデルを用いることでは困難であり、成熟マスト細胞モデルにより検討可能となった課題である。

(1)免疫寛容の成立におけるマスト細胞の機能の解明

制御性T細胞のエフェクターとしてマスト細胞が機能するという報告をもとに、組織マスト細胞の免疫寛容における機能を明らかにする。

(2)成熟マスト細胞における非IgE刺激による活性化メカニズムの解明

これまで詳細が不明であった非IgE刺激によるマスト細胞の活性化応答についてその反応性の変化、および機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)成熟マスト細胞培養系

マウス骨髄細胞を IL-3 存在下 1 ヶ月間培養することにより未成熟マスト細胞(BMMC)を調製し、これを stem cell factor 存在下、線維芽細胞株 Swiss 3T3 と共培養することにより成熟マスト細胞モデルを得た。

(2)成熟マスト細胞の活性化応答の検証

顆粒内酵素である β -hexosaminidase あるいはヒスタミンを指標に、脱顆粒応答を検討した。また、IL-6、MCP-1、TNF- α といったサイトカイン産生を測定した。

(3)成熟マスト細胞における遺伝子発現の解

析

マスト細胞の成熟過程で発現変化が見られる遺伝子を抽出し、その機能を解析した。

4. 研究成果

(1)成熟マスト細胞培養系の改良

代表者はこれまでにヒアルロン酸受容体 CD44 がマスト細胞の成熟過程の増殖に必要であり、CD44 欠損マウスの皮膚組織ではマスト細胞数が減少することを見いだしている。そこで、共培養系において線維芽細胞が産生するヒアルロン酸の機能について検討を行ったところ、ヒアルロニダーゼ処理や合成酵素の RNAi によるヒアルロン酸量の低下は、むしろマスト細胞の増殖を促進することを見いだした。ヒアルロン酸を中心としたマトリックスの形成は、マスト細胞の増殖を拘束している可能性が考えられた。一方、系のヒアルロン酸量の低下は成熟過程には殆ど影響を与えなかった。ヒアルロン酸はマスト細胞の増殖を正負に制御する複雑なメカニズムが存在することが推察される。一方で、この発見は従来の系で得られる成熟マスト細胞の収量を約3倍に増大させるものであり、成熟マスト細胞の研究をさらに進展させる発見である。

(2)マスト細胞の成熟による遺伝子発現変化

成熟過程で発現変化する遺伝子について検証したところ、IL-17 受容体の発現亢進が認められたことから、IL-17 刺激による活性化について検討を行ったが脱顆粒応答は認められなかった。

また、Fc γ RIIb や CD33 といった ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)をもつ抑制性受容体、あるいは CD81、RabGEF1 といった抗原抗体反応を抑制することが知られている因子の発現が亢進しており、IgE を介する抗原抗体反応による脱顆粒レベルは成熟過程で有意に減少した。

(3)マスト細胞の成熟過程における応答性の変化

IgE を介する抗原抗体反応による IL-6、MCP-1、TNF- α の産生はいずれも成熟過程で顕著に減弱したが、thapsigargin 刺激によるこれらのサイトカイン産生レベルは大きく変化しなかった。

一方、成熟マスト細胞では compound 48/80 による脱顆粒が起こるが、この際に細胞外からの Ca²⁺の流入が起こること、また細胞内チ

ロシンリン酸化レベルが増大していることを確認した。

以上の結果は、マスト細胞では成熟に伴い劇的な刺激応答性の変化が起こることを示唆しており、組織マスト細胞の機能を検証する上では、成熟マスト細胞モデルが必須であることを示している。特に成熟マスト細胞では、IgE を介する抗原応答の全体的な減弱と非 IgE 刺激による活性化の亢進という傾向が認められた。マスト細胞の生理的な機能の本質については未だ不明な点が数多く残されており、今回の知見は今後のマスト細胞研究の方向性を考察する上で重要な手がかりを与えるものである。

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 11 件) 全て査読有

1. 田中 智之、西田 圭吾、マスト細胞研究の新たな展開、薬学雑誌、131, 59-61, 2011.
2. 田中 智之、皮膚型マスト細胞モデルの確立とその解析、薬学雑誌、131, 63-71, 2011.
3. Sakanaka, M., Furuta, K., Ichikawa, A., and Tanaka, S. Impaired activation of mast cells upon IgE-mediated antigen stimulation in a stroke-prone spontaneously hypertensive rat strain, *SHRSP.Z. Immunol. Lett.* 128, 74-79, 2010.
4. Matsuura, J., Sakanaka, M., Sato, N., Ichikawa, A., and Tanaka, S. Suppression of CXCR4 expression in mast cells upon IgE-mediated antigen stimulation. *Inflamm. Res.* 59, 123-127, 2010.
5. Goto, T., Sarker, M. M. R., Zhong, M., Tanaka, S., and Gohda, E. Enhancement of IgM production in B cells by the extract of red bell pepper. *J. Health Sci.* 56, 304-309, 2010.
6. Ushio, H., Ueno, T., Kojima, Y., Komatsu, M., Tanaka, S., Yamamoto, A., Ichimura, Y., Ezaki, J., Nishida, K., Komazawa-Sakon, S., Niyonsaba, F., Ishi, T., Yanagawa, T., Kominami, E., Ogawa, H., Okumura, K., and Nakano, H. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* in press, 2011.
7. Tanaka, S. Targeting CD44 in mast cell regulation. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 31-43, 2010.
8. Ichikawa, A., Sugimoto, Y., and Tanaka, S.

Molecular biology of histidine decarboxylase and prostaglandin receptors. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, 86, 848-866, 2010.

9. 田中 智之、マスト細胞の分化に伴う機能制御、生化学、82, 1021-1031, 2010.

10. Sato, N., Tanaka, S., Matsuura, J., Takasu, Y., and Ichikawa, A. Interleukin-4-mediated suppression of histamine synthesis in a murine mast cell line, BNU-2c13. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1800-1802, 2009.

11. Yamaoka, K., Yano, A., Kuroiwa, K., Morimoto, K., Inazumi, T., Hatae, N., Tabata, H., Segi-Nishida, E., Tanaka, S., Ichikawa, A., and Sugimoto, Y. Prostaglandin EP3 receptor superactivates adenylyl cyclase via the $G_q/PLC/Ca^{2+}$ pathway in a lipid raft-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 678-682, 2009.

[学会発表] (計 8 件)

○田中 智之、栗宗 由樹、阪中 麻利子、夏原 麻由子、抗原刺激による脱顆粒レベルのIgEによる制御、第 83 回日本生化学会、2010 年 12 月 10 日、神戸

○Tanaka, S. Establishment of a model culture system for cutaneous mast cells. 2010 XIII PHRS (第 13 回ポーランドヒスタミン研究会)、2010 年 10 月 23 日、ポーランド (招待)

○Tanaka, S. CD44-mediated proliferation of mast cells. Hyaluronan 2010 (第 8 回国際ヒアルロン酸学会)、2010 年 6 月 6 日、京都 (招待)

○田中 智之、皮膚型マスト細胞モデルの確立とその解析 (シンポジウム「マスト細胞研究の新たな展開」)、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山 (招待)

○田中 智之、合田 榮一、マスト細胞の分化過程における CD44 を介した増殖応答、日本組織培養学会第 83 回大会、2010 年 5 月 20 日、岡山

○田中 智之、高野 裕嗣、木全 弘治、中山 和久、杉本 幸彦、市川 厚、CD44 を介したマウス組織結合型マスト細胞の増殖制御、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸

○田中 智之、マスト細胞の機能制御に関わる分子機構の解析 (日本生化学会奨励賞受賞講演)、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21 日、神戸 (招待)

○田中 智之、阪中 麻利子、古田 和幸、市川 厚、高血圧モデルラットマスト細胞に

おける抗原抗体反応の減弱機構、第13回日本ヒスタミン学会、2009年10月8日、仙台

〔図書〕(計1件)

Tanaka, S., and Ichikawa, A. Chapter 2, Biomedical Aspects of Histamine: Current Perspectives (ed. Khardori, N., Shahid, M., Khan, RA, and Tripathi, T) Springer, 2010, 350

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~tanaka-s/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 智之 (TANAKA SATOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40303846

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし