

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590077

研究課題名(和文) 環境因子によるマスト細胞の刺激応答の調節

研究課題名(英文) Regulation of mast cell responses by environmental factors

研究代表者

田中 智之(Tanaka, Satoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40303846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は周辺の細胞や細胞外マトリックス、IgEといった微小環境因子がマウス組織マスト細胞の分化や機能獲得を制御するメカニズムを解明することを目的として行った。マスト細胞は成熟に伴い非IgE刺激に対する応答性を増大させるが、炎症性サイトカイン産生能は減弱する。一方、IgEレベルの増大は一過性のサイトカイン産生を誘導するが、その後の抗原刺激による脱顆粒や炎症性サイトカイン産生は低下させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to clarify the mechanism under which microenvironmental factors, such as neighboring cells, extracellular matrices, and IgE, regulate the terminal differentiation of murine tissue mast cells. Sensitivity to non-IgE stimulus was augmented during the maturation of mast cells, whereas the potentials to produce inflammatory cytokines were decreased in matured mast cells. Higher concentrations of IgE induced a transient increase in cytokine production but suppressed antigen-induced degranulation and inflammatory cytokine production.

研究分野：医歯薬学

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 共培養 IgE サイトカイン 炎症 アレルギー ヒスタミン

### 1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は全身の様々な組織に分布する血球系細胞であり、即時型アレルギーや寄生虫感染防御において機能することが知られている。近年では、より広範な炎症応答とその制御に関わることが報告されており、組織のマスト細胞の機能に注目が寄せられている。マスト細胞は造血幹細胞に由来し、その最終分化は浸潤した組織において起こる。そのため、組織マスト細胞には分布組織によるヘテロ性があるが、周辺環境がマスト細胞の成熟や機能にどのような影響を与えているかについては不明であった。従来のマスト細胞研究では、細胞株や未成熟な初代培養モデルが主に利用されており、マスト細胞欠損マウスに代表される個体レベルにおける知見を *in vitro* で検証することが困難であった。マスト細胞が関与する疾患における新たな治療法を確立するためには、動物モデルに加えて、細胞レベルでの評価系が必須である。申請者はマウスにおいて未成熟な初代培養モデルである骨髄由来培養マスト細胞を幹細胞因子(SCF)存在下、線維芽細胞株と共培養することにより、皮膚組織の成熟マスト細胞に類似した成熟マスト細胞モデルを確立することに成功していた。そこで、このモデルをベースに、微小環境の変化がマスト細胞の性質や機能に与える作用を評価するという本研究テーマを着想した。

### 2. 研究の目的

周辺の細胞や細胞外マトリックス、IgE といった微小環境因子が、組織に分布するマスト細胞の分化、機能獲得を制御するメカニズムを解明し、マスト細胞が関与する慢性炎症性疾患や代謝疾患の治療法の開発に資する基礎的知見を得ることを目的とした。

具体的な目標は以下の通りである。

- (1)皮膚型マスト細胞の分化過程における刺激応答性の変化の解析と、そのメカニズムの解析
- (2)ヒアルロン酸-CD44 複合体によるマスト細胞の増殖制御機構の解明
- (3) 皮膚型マスト細胞の分化過程を制御する転写因子の同定とその機能解析
- (4)高レベルのIgE 存在下のマスト細胞の機能変化の解析

### 3. 研究の方法

- (1)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得られる未成熟マスト細胞モデル(BMMC)をさらに SCF 存在下、マウス線維芽細胞株 Swiss 3T3 と 16日間共培養することにより組織結合型マスト細胞モデル(CTMC-like MC)を得た。このモデルは、サフラニン染色陽性でポリカチオンやサブスタンス P により脱顆粒応答を起こすという性質を有しており、皮膚組織の成熟マスト細胞に類似している。
- (2)ヒアルロン酸合成酵素発現低下株の作

製:Swiss 3T3 細胞では主要なヒアルロン酸合成酵素サブタイプは HAS-2 (hyaluronan synthase-2)であることから、これを標的としてレンチウイルスにより shRNA を導入し、ヒアルロン酸産生能をほぼ消失した変異株を作製した。

(3)転写因子の解析：IL-3 依存性マスト細胞株 MC9 に、マスト細胞の成熟過程で誘導される Gfi1、および逆に発現低下する Gfi1b をそれぞれ構成的に発現させた株を作製した。

### 4. 研究成果

(1a)マスト細胞の成熟に伴う刺激応答性の変化：皮膚型マスト細胞への成熟により、ポリカチオンやサブスタンス P に対する脱顆粒能の獲得、抗原刺激、ポリ多糖(LPS)刺激による IL-6 や TNF- $\alpha$  産生の顕著な低下、がそれぞれ認められた。抗原刺激による脱顆粒応答は大きく変化しないことから、サイトカイン産生を誘導するシグナル伝達経路に特異的な変化が生じることが推察された。マスト細胞のサイトカイン産生では NF- $\kappa$ B の活性化と Akt のリン酸化が重要な経路と考えられていることから両者について解析を行ったところ、抗原刺激による Akt リン酸化は BMMC では増大するが、CTMC-like MC ではむしろ定常状態より低下すること、抗原刺激による I $\kappa$ B のリン酸化は CTMC-like MC では殆ど起こらないこと、が明らかとなった。

(1b)ステロイド性抗炎症薬の成熟マスト細胞に対する作用：ステロイド性抗炎症薬である dexamethasone (DEX)存在下で共培養を実施したところ、抗原刺激による脱顆粒応答は変化しないが、サブスタンス P やポリカチオンによる脱顆粒応答は顕著に抑制された。正常マウス皮膚組織に DEX を連続塗布し、抗原刺激あるいは compound 48/80 刺激による組織マスト細胞の脱顆粒応答を検討したところ、こちらではいずれの刺激に対しても抑制効果が認められた。ステロイド性抗炎症薬のマスト細胞に対する作用としては、増殖抑制や間接的なアポトーシスの惹起が報告されているが、新たに IgE 非依存性の刺激に対する応答性を抑制するという作用があることを見いだした。

(2) ヒアルロン酸-CD44 複合体によるマスト細胞の増殖制御機構：共培養系において線維芽細胞のヒアルロン酸合成酵素をノックダウンすることにより、成熟過程のマスト細胞増殖が 3-4 倍に増大することが明らかとなった。このとき刺激応答性や顆粒成熟は殆ど変化しなかった。マスト細胞に発現する CD44 は増殖応答に必要であるが、一方で今回得られた知見は、そのリガンドであるヒアルロン酸により形成されたマトリックスは成熟過程の増殖を抑制する効果があることを示すものである。

(3)マスト細胞の分化における Gfi1/Gfi1b の機能：Gfi1 および Gfi1b は T 細胞や好中球の分化を制御する転写因子として知られる。マス

ト細胞の皮膚型への成熟過程では Gfi1 が誘導され、一方で Gfi1b は発現量が低下する。マスト細胞株への構成的発現による解析から、両転写因子は相互に発現量を制御する関係にあること、Gfi1b は共培養時のヒスタミン合成の誘導に、Gfi1/Gfi1b 両者の発現はトリプターゼの誘導に必要であることが示唆された。

(4) 高レベルの IgE 存在下のマスト細胞の機能変化：単独で未成熟マスト細胞を活性化させる能力の強い IgE クローン SPE-7 と、そうした作用の極めて弱いクローン IgE-3 を比較し、SPE-7 では感作濃度が高いほど抗原刺激時の脱顆粒応答、および IL-6、TNF- $\alpha$  産生が低下することを見いだした。こうした感作 IgE 濃度に依存した変化は IgE-3 では認められなかった。SPE-7 感作による抗原刺激時の応答性の低下は、JNK 阻害剤である SP600125 を感作前に処理することにより回復すること、IgE-3 感作の直前に JNK 活性化剤であるアニソマイシンを一過性に処理すると、同様に抗原刺激時の応答性が低下すること、から、感作時の JNK の活性化が抗原刺激時の応答性の低下に関わることが推察された。

組織に分布する成熟マスト細胞が培養モデルとは大きく異なることや、分布部位によりマスト細胞にはヘテロ性があることは広く認識されていたが、適切な培養モデルが存在しなかったことから、*in vitro* での解析は殆ど行われてこなかった。本研究は、成熟マスト細胞の培養系における解析という新たな研究領域を拓くものであり、得られた知見はいずれもマスト細胞が関与する様々な疾患における新たな治療法を開発する上で有用な基礎的知見である。

IgE の単独作用についてはこれまでも国内外で盛んに研究されてきたが、これらはマスト細胞の機能がトータルで増強されるという結論を補強するものであった。今回得られた知見は、むしろ抗原刺激時の応答性が低下するというものであり、いわゆる単量体 IgE 応答の概念を一部修正するものである。

近年の研究ではマスト細胞欠損マウスモデルの開発、応用により、次々と新たなマスト細胞の機能が見いだされている。それらの研究では、慢性皮膚炎や全身性自己免疫疾患、炎症性腸疾患といった強い炎症を伴うものから、動脈硬化や糖尿病のように低強度の慢性炎症まで幅広い病態におけるマスト細胞の機能が示唆されている。マスト細胞の分化、成熟プロセスを考慮すると、こうした様々な病態におけるマスト細胞の機能を解明するためには局所の成熟マスト細胞モデルが必須である。本研究はそうした今後のマスト細胞研究の新たな方向性の一つを示すものである。

## 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 )

Morimoto, K., Shirata, N., Taketomi, Y., Tsuchiya, S., Segi-Nishida, E., Inazumi, T., Kabashima, K., Tanaka, S., Murakami, M., Narumiya, S., and Sugimoto, Y. Prostaglandin E2-EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *J. Immunol.* 192, 1130-1137, 2014. 10.4049/jimmunol.1300290

Takeuchi, M., Sato, Y., Ohno, K., Tanaka, S., Takata, K., Gion, Y., Orita, Y., Ito, T., Tachibana, T. and Yoshino, T. T helper 2 and regulatory T cell cytokine production by mast cells: A key factor in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Mod. Pathol.* in press, 2014. 10.1038/modpathol.2013.236

Taura, A., Furuta, K., Yamaguchi, T., Kawabata, K., and Tanaka, S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, growth factor independent 1 (Gfi1) and Gfi1b, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 81-86, 2014. 10.1248/bpb.b13-00616

Nakazawa, S., Sakanaka, M., Furuta, K., Natsuhara, M., Takano, H., Tsuchiya, S., Okuno, Y., Ohtsu, H., Nishibori, M., Thurmond, R. L., Hirasawa, N., Nakayama, K., Ichikawa, A., Sugimoto, Y., and Tanaka, S. Histamine synthesis is required for granule maturation of murine mast cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 204-214, 2014. 10.1002/eji.201343838

Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Sato, H., Murase, R., Yamamoto, K., Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, M., Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M. H., Arita, M., Yokomizo, T., Nakamura, M., Watanabe, K., Hirai, H., Nakamura, M., Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto, K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S., Murakami, M. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat. Immunol.* 14, 554-563, 2013. 10.1038/ni.2586

Kadota, Y., Sakai, N., Fujikawa, R., Aoyama, E., Zhong, M., Tanaka, S., and Gohda, E. Dextran Sulfate-induced degradation of spontaneously apoptotic B cells. *Int. Immunopharmacol.* 15, 581-587, 2013. 10.1016/j.intimp.2013.01.013

Yamaguchi, T., Yamaguchi, T., Tashiro, K., Tanaka, S., Katayama, S., Ishida, W., Fukuda, K., Fukushima, A., Araki, R., Abe, M., Mizuguchi, H., Kawabata, K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 22, 726-734, 2013. 10.1089/scd.2012.0339

Sugiura, Y., Hiramatsu, K., Hamauzu, R., Motoki,

T., Miyazaki, M., Uto, H., Tsubouchi, H., Tanaka, S., and Gohda, E. Mitogen-activated protein kinase-dependent induction of hepatocyte growth factor production in human dermal fibroblasts by the antibiotic polymyxin B. *Cytokine* 60, 205-211, 2012. 10.1016/j.cyto.2012.06.007

Takano, H., Furuta, K., Yamashita, K., Sakanaka, M., Itano, N., Gohda, E., Nakayama, K., Kimata, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., and Tanaka, S. Restriction of mast cell proliferation through hyaluronan synthesis by co-cultured fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 408-412, 2012. 10.1248/bpb.35.408

〔学会発表〕(計9件、以下は招待講演)

Satoshi Tanaka, Histamine synthesis and its functions in murine mast cells. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Histamine Research Society. 2013年5月8-11日、ポーランド

田中智之、マスト細胞の機能制御とヒスタミン、第61回日本アレルギー学会、2011年11月12日、東京

田中智之、マスト細胞の成熟過程におけるヒスタミンの機能、第15回日本ヒスタミン学会、2011年10月21日、盛岡

田中智之、マスト細胞の顆粒形成におけるヒスタミンの機能、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日、京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：成熟マスト細胞の製造方法

発明者：田中智之

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：特願 2011-209585

出願年月日：2011年9月26日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/meneki/>

## 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・教授

研究者番号：40303846

### (2)研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：