

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15157

研究課題名(和文)新規樹立Cre発現マウスを利用したマスト細胞機能制御の分子基盤解明

研究課題名(英文)Molecular dissection of mast cell function by using newly generated mast cell lineage specific Cre expressing mice

研究代表者

松田 達志 (MATSUDA, Satoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00286444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Fc $\gamma$ RIのローカスにCreをノックインしたマウスを樹立した。この系を用いて各種分子を欠失させたところ、mTORC1シグナルの増強に伴い腹腔内マスト細胞数の増大が観察された。一方、小胞輸送に関わるArfファミリーを欠失させると、出現するマスト細胞数が激減することが分かった。以上の結果は、mTORC1シグナルやArf経路が、マスト細胞分化過程で重要な役割を担っていることを強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：To understand mast cell biology, we established mast cell lineage specific Cre expressing mice under the control of Fc $\gamma$ RI locus. Among the signaling molecules functioning downstream of PI3K, we focused Tsc1 and Arf1 along with Arf6. Loss of Tsc1, which causes augmentation of mTORC1 signal, led to marked increase of mast cell number in peritoneal cavity. On the other hand, loss of Arf1 along with Arf6, both of which serve as a vesicle trafficking regulator, impaired mast cell development. These results indicate that mTORC1 signal as well as Arf-mediated vesicle trafficking system play a critical role in mast cell development.

研究分野：免疫学

キーワード：遺伝子改変動物 マスト細胞 PI3K シグナル伝達 小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は IgE の高親和性受容体 FcεRI を発現しており、アレルギー疾患をはじめ、様々な免疫応答に関わっている。マスト細胞の分化・機能制御に関する知見の多くは、骨髓細胞を *in vitro* で分化誘導して得られる BMMC を用いて明らかにされてきた。しかし、近年の解析から、BMMC と生理的なマスト細胞との質的な乖離が指摘されつつある。一般に、個体レベルで特定の細胞の機能を解析する際は Cre-loxp 系が多用されるが、研究開始時点でマスト細胞特異的と呼べる Cre 発現マウスの例は知られておらず、対象となる分子が生理的条件下のマスト細胞で果たす役割を明らかにすることは困難な状況にあった。

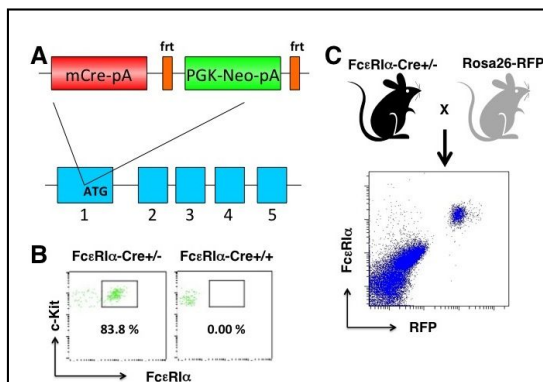


図1 : FcεRIα-Cre マウス

(A) ノックインの概略。ほ乳類細胞用に改変した Cre (mCre) を含む DNA 断片を FcεRIα の開始メチオン部位に挿入した。使用に当たっては、FLPe マウスとの交配により事前に Neo 配列を切り出している。(B) 片アレルのみに mCre がノックインされたマウス (FcεRIα-Cre+/-) の表現型は野生型と全く同一であった。一方、両アレルに mCre が挿入される (FcεRIα-Cre+/+) と、内在性の FcεRIα の発現が消失した。(C) Cre 依存性に RFP を発現するレポーターマウスとの交配後、マスト細胞が局在する腹腔内マスト細胞の FACS 解析を行った。内在性の FcεRIα の発現に完全に一致して、RFP の発現が誘導された。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、最近、マスト細胞の分化や

エフェクター細胞としての機能発現に PI3K 経路が重要な役割を担うことを明らかにした (Takayama *et al.*, *Int. Immunol.* **25**: 215 (2013))。BMMC を用いたその後の解析から、PI3K の下流因子の内、mTORC1 経路がマスト細胞の分化成熟過程を制御する一方、先行研究から、Arf ファミリー分子が FcεRI 刺激に伴うヒスタミンの脱顆粒過程に関与する可能性が示唆されている。そこで、これら分子によるマスト細胞機能制御の実体を個体レベルで解析すべく、新規に樹立したマスト細胞特異的に Cre を発現する FcεRIα-Cre ノックインマウス (以下、FcεRIα-Cre マウス : 図1 参照) を用いて、マスト細胞の機能制御に mTORC1 経路や Arf 経路が関与するか否か、個体レベルで解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

PI3K 欠損マウスでは、種々の組織でマスト細胞数の著しい減少が認められる。BMMC を用いた予備検討により、mTORC1 シグナルがマスト細胞分化過程を制御していることが強く示唆されたことから、【課題1】 mTORC1 シグナルとマスト細胞分化の関係を評価する。一方、PI3K 経路はマスト細胞の脱顆粒反応にも深く関与しており、大阪大学医学部・平野教授の研究グループは、優性不能型変異体を用いた *in vitro* の解析から、PI3K-Arf ファミリー経路が脱顆粒制御に関わるとのモデルを提唱している。そこで【課題2】として、マスト細胞の脱顆粒過程への Arf ファミリーの関与の有無を明らかにする。以下に具体的な研究計画を記す。

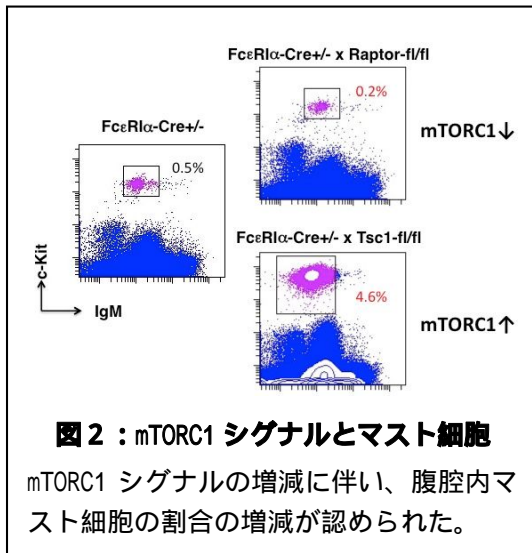
### (1) mTORC1 シグナルとマスト細胞分化

mTORC1 経路が下流にシグナルを伝える上で、アダプター分子である Raptor が必須の役割を果たしている。通常、負の制御因子である Tsc1/Tsc2 複合体が mTORC1 の活性を負に制御しているが、PI3K 経路の活性化に伴い、Tsc1/Tsc2 が分解されることで、mTORC1 シグ

ナルの活性化が誘導される。したがって、Raptor ならびに Tsc1 を欠失させることで、それぞれ mTORC1 シグナルを人為的に消失・増強することが可能となる。そこで、FcεRIα-Cre マウスと Raptor コンディショナルノックアウトマウス (Raptor-f1/f1) ならびに Tsc1 コンディショナルノックアウトマウス (Tsc1-f1/f1) との交配を行った。得られたマウスの腹腔内から細胞を回収し、存在するマスト細胞の割合を FACS 解析で評価すると共に、単離されたマスト細胞を用いて、IgE 刺激に伴う脱顆粒の程度を CD107a 染色によって定量化した。

## (2) Arf 経路とマスト細胞機能

Arf ファミリーは Arf1-Arf6 の6種類のメンバーからなる低分子量 G タンパク質であり、細胞内小胞輸送の制御に関わる因子である。データベース上の解析から、マスト細胞においては Arf1 と Arf6 が高発現していたことから、Arf1 コンディショナルノックアウトマウスと Arf6 コンディショナルノックアウトマウスをそれぞれ FcεRIα-Cre マウスと交配し、(1)と同様の解析に取り組んだ。

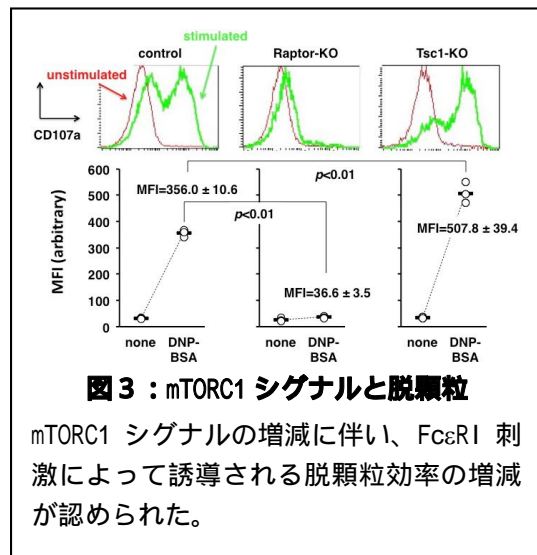


## 4. 研究成果

### (1) mTORC1 シグナルとマスト細胞分化

マスト細胞特異的に mTORC1 シグナルを消

失 (FcεRIα-Cre+/- x Raptor-f1/f1) させることで腹腔内マスト細胞の割合の低下が見られる一方、mTORC1 シグナルを亢進させる (FcεRIα-Cre+/- x Tsc1-f1/f1) と、著しい増加が認められた (図2)。さらに、単離したマスト細胞を抗 DNP IgE 抗体で一晩処理した後、10 ng/mL の DNP-BSA で刺激したところ、mTORC1 シグナルの増減に伴って、脱顆粒の効率が変化することが明らかとなった (図3)。以上の結果は、mTORC1 シグナルがマスト細胞の分化過程に関わるばかりでなく、脱顆粒過程において機能的にも重要な役割を果たしていることを強く示唆している。



### (2) Arf 経路とマスト細胞機能

マスト細胞において Arf1 や Arf6 を単独で欠損させても、腹腔内に認められるマスト細胞の割合に大きな変化は認められなかった。しかし、Arf1/Arf6 の二重欠損マウス (Arf1-f1/f1:Arf6-f1/f1 x FcεRIα-Cre+/-) を作製したところ、腹腔内の成熟マスト細胞の割合が著しく減少することが明らかとなった (論文投稿準備中、未発表データ)。一方、予想に反して、Arf1/Arf6 の二重欠損マウス由来のマスト細胞は FcεRIα 刺激に伴う脱顆粒に異常は認められず、機能的には野生型とほぼ同等であるものと推察された。現在、Arf ファミリー欠損がどのようなメカニズム

でマスト細胞分化の障害を引き起こしているのか、BMMC の系を用いて詳細を解析中である。

#### 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 2件)

Arima, M., Cui, D., Kimura, T., Sonoda, K.H., Ishibashi, T., Matsuda, S., and Ikeda, E. Basigin can be a therapeutic target to restore the retinal vascular barrier function in the mouse model of diabetic retinopathy. Sci. Rep., 査読有、vol.6、2016、38445 DOI: 10.1038/srep38445

Cui, D., Arima, M., Takubo, K., Kimura, T., Horiuchi, K., Minagawa, T., Matsuda, S., and Ikeda, E. ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. Sci. Rep., 査読有、vol.5、2016、12796 DOI: 10.1038/srep12796

[学会発表](計 2件)

松田達志、江口稚佳子、住吉麻実、生田優希、小河穂波、丹賀直美、早川夏姫、渡邊利雄、マスト細胞脱顆粒過程における PI3K 経路の役割解明、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(横浜)

逆井智貴、田中順子、松田達志、水野聖哉、濱田理人、高橋智、三輪佳宏、近赤外イメージングマウスを用いたリンパ球集積から見る炎症反応の可視化、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日、パシフィコ横浜(横浜)

[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

<http://www3.kmu.ac.jp/bioinfo/>

アウトリーチ活動

出張講義「ヒトゲノムと遺伝」

大阪府立枚方高等学校(H28.6.20)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 達志(MATSUDA, Satoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00286444

(2)連携研究者

渡邊 利雄 (WATANABE, Toshio)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・教授

研究者番号：60201208

(3)研究協力者

住吉 麻実 (SUMIYOSHI, Mami)