

令和元年6月7日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12730

研究課題名(和文) ライブイメージング技術に立脚した即時型アレルギー抑制/増悪成分探索系の構築と検証

研究課題名(英文) Fluorescent-based method for monitoring mast cell degranulation

研究代表者

東尾 浩典 (Higashio, Hironori)

岩手医科大学・教養教育センター・講師

研究者番号：50342837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞の分泌顆粒に貯留された化学伝達物質が開口放出(脱顆粒)されることが即時型アレルギーの引き金となるため、脱顆粒を制御する物質の探索は重要な課題である。本研究では、簡便な操作で多検体解析を可能とする脱顆粒制御物質スクリーニング系の構築を目指し、様々な脱顆粒ライブイメージング系の適用可否を検討した。そして、分泌顆粒膜に結合すると蛍光を発する色素を用いるイメージング系が鋭敏で、分泌刺激特異性もなく、従来の脱顆粒度合評価系との整合性にも優れることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱顆粒制御物質の探索においては多検体解析が要求されるが、従来の生化学的脱顆粒度合評価系は、培地や細胞抽出液の酵素活性測定のための煩雑な実験操作があるため不向きである。一方、本研究で志向するライブイメージング技術に基づく脱顆粒度合評価系は、脱顆粒度合が蛍光強度の差異として反映されるため生細胞の蛍光強度を測定するだけでなく、多検体解析に好適である。加えて、用いた蛍光色素は細胞内での脱顆粒の進展を可視化するため、そのまま顕微鏡観察に持ち込んで脱顆粒制御物質の作用メカニズムを解析することができ、エビデンスに基づく脱顆粒制御物質の同定と開発に貢献しうる。

研究成果の概要(英文)：Allergic responses are triggered by the release of various chemical mediators stored in secretory granules of mast cells. Here we developed a convenient fluorescent-based method for monitoring mast cell degranulation using the FM membrane probe, which visualizes compound exocytosis, the mode of exocytosis including the secretory granule (SG)-plasma membrane (PM) heterotypic fusion and the SG-SG homotypic fusion. This system is applicable for drug and allergen screening by fluorimetry because fluorescent intensity is correlate with the extent of degranulation, confirmed by the conventional biochemical degranulation assay.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マスト細胞 脱顆粒 調節性分泌 ライブイメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) マスト細胞は、全身の皮下組織や粘膜に幅広く存在し感染防御を担う免疫担当細胞であり、ヒスタミン・セロトニン・各種プロテアーゼなどの生理活性物質を貯留した分泌顆粒を多数有している。食物アレルギー・花粉症・気管支喘息などの即時型アレルギーは、アレルゲン刺激によって、これらの生理活性物質が開口放出(脱顆粒)されることが引き金となる。それゆえ、抗アレルギー活性を有する物質の探索・同定は機能性食品や医薬品の開発にとって、また(アレルゲン等)アレルギー反応を増悪させる物質の同定と除去は安全な食品や環境の提供にとって重要な課題である。

(2) マスト細胞の脱顆粒度合を評価するこれまでの最も一般的な手法は、分泌顆粒中に含まれる酵素β-ヘキソサミニダーゼの細胞外への放出を酵素活性測定でモニターする生化学的アッセイ系である。脱顆粒を促進/抑制する物質の探索では、被験物質をマスト細胞に一定時間曝露させた後にこのアッセイを行う。しかしこの系には、酵素活性を測定するための煩雑な実験操作(分泌刺激添加後の経時的な培養上清回収・細胞抽出液の調製・酵素活性測定など)があり、実験者の手作業で多検体解析を行うことは困難である。また、この系では、インプット(被験物質の種類・添加濃度)とアウトプット(脱顆粒促進/抑制効果)の間は全くのブラックボックスであり、被験物質の作用メカニズムに関する情報は得られない。

2. 研究の目的

上記の生化学的な脱顆粒度合評価系は「研究手法が未発達」かつ「脱顆粒様式とそのメカニズムに関する知見が少なかった」四半世紀以上前に考案されたものであるが、今でも広く脱顆粒促進/抑制物質の探索に用いられている。しかし、分子生物学的/細胞生物学的解析手法が発達し、脱顆粒関連遺伝子が多数同定され、また脱顆粒ライブイメージングも可能となりつつある現在となつては、脱顆粒度合評価系のみが時代遅れな手法と言わざるを得ない。そこで、近年発達したライブイメージング技術に着目して、(1) 脱顆粒を鋭敏に検出できる、(2) 実験操作が簡便である、(3) 多検体同時解析が可能である、(4) リアルタイム計測が可能である、(5) そのまま顕微鏡観察に持ち込めば形態的情報が得られる、蛍光プレートリーダーを用いた新規脱顆粒度合評価系の構築を着想した。この評価系を構築できれば、作用特性や作用メカニズムに関する情報を得ながら、効率的に脱顆粒促進/抑制物質を探索・同定することが可能になる。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、脱顆粒イメージング系検証のための遺伝子操作が比較的容易であり、脱顆粒促進/抑制物質の探索・同定に広く用いられているラット由来マスト細胞株 RBL-2H3(接着細胞)を用いた。脱顆粒関連遺伝子のノックダウンは siRNA 発現プラスミドによって行い、各種発現プラスミドの導入にはエレクトロポレーション法を用いた。この方法による形質転換効率は40%程度であるため、エレクトロポレーション後18-24時間後に0.6 mg/ml G418を含む培地に置換してさらに24-30時間培養することにより形質転換細胞の濃縮を行った。これにより、形質転換細胞の割合を90%程度として脱顆粒イメージング系検証の各種実験に供した。なお、目的タンパク質の発現やノックダウンの確認はウエスタンブロットにて、抗体が働かない/入手できない場合にはリアルタイム RT-PCRにて確認した。

(2) RBL-2H3細胞の脱顆粒を惹起する分泌刺激には、抗原刺激(0.5 μg/ml anti-DNP-IgEで感作後終濃度300 ng/ml DNP-BSAで刺激)、イオノフォア刺激(終濃度20 nM TPA+1 μM A23187)、コンパウンド48/80刺激(終濃度250 μg/ml)を用いた。イメージング技術ベースの脱顆粒度合評価系構築に際しては、以下の蛍光プローブ(蛍光色素)の適用可能性を検討した:スルホローダミンB、各種FM色素(FM1-43, FM4-64, FM2-10)、FITC、FITC-デキストラン、pHrodogreen-AM、pHrodogreen-デキストラン。また、細胞核の染色にHoechst33342を、細胞形態の可視化にCalcein-AMを、および分泌顆粒の可視化にはCD63-GFPを必要に応じて用いた。なお、細胞内蛍光像および蛍光強度の観察・測定には、共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss LSM510, 37 保温装置付)および蛍光プレートリーダー(TECAN Spark, 37 保温装置付)を必要に応じて使い分けた。

(3) 蛍光免疫染色、従来の生化学的な脱顆粒度合評価系、およびその他一般的な研究手法は、文献(Higashio et al., *J. Immunol.* 180, 4774-4784, 2008; Higashio et al., *Sci. Rep.* 6, 22539, 2016)に従った。

4. 研究成果

(1) マスト細胞の分泌顆粒はリソソームと後期エンドソームに由来する酸性オルガネラである。脱顆粒は、分泌顆粒が間断なく細胞膜と融合する single-vesicle、細胞膜と融合した分泌顆粒の膜に深部の顆粒が次々と融合してゆく sequential、および複数の分泌顆粒が細胞内であらかじめ融合したのちに細胞膜と融合する multivesicular、の3つの様式が組み合わさって生じており、後者2つ(まとめて compound exocytosis と呼ばれる)の割合が非常に高い(図1)。そのため蛍光色素を用いた脱顆粒の可視化には2通り、(方法1)酸性条件下でのみ蛍光を発する

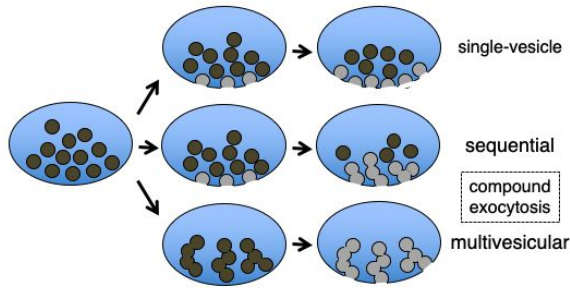


図1：マスト細胞の脱顆粒様式と2通りのイメージング方法

pH 感受性蛍光色素で分泌顆粒を標識し、細胞膜との膜融合後の蛍光消失をモニターする方法 (図1 黒色→灰色：使用色素例 FITC- デキストラン、pHrodogreen-AM、pHrodogreen-デキストラン) および (方法2) 細胞外液に蛍光色素を添加し、細胞膜-分泌顆粒間の膜融合から始まる細胞深部への蛍光色素の侵入をモニターする方法 (図1 白色→灰色：使用色素例 FITC、スルホローダミン B、FM 色素) が考えられる。

(2) (方法2) において FITC を細胞外液に添加して分泌刺激を与えた場合、FITC の細胞内への侵入が見られるものの、細胞外液の蛍光強度が強すぎるため非常に見にくく、蛍光強度の定量にも支障をきたすことが分かった。そこで次に、細胞外液中では蛍光をほとんど発さず、分泌顆粒膜や顆粒内容物と相互作用した時のみに強い蛍光を発する以下の2種類の色素を検討した。スルホローダミン B は、研究分担者らに使用実績のある (Mori et al., *Arch. Histol. Cytol.*, 63, 261-270, 2000)、分泌顆粒のタンパク質のカルボキシ基と相互作用した時のみに蛍光を発する色素である。しかし、この色素には、蛍光強度が強すぎてすぐに飽和状態に達する、また分泌刺激の種類によっては脱顆粒を可視化できない、という蛍光強度測定や汎用性における欠点があることが分かった。加えて、分泌顆粒のタンパク質には、膜融合後に細胞外液に次第に散逸し、長時間測定・観察には向かないかもしれないという懸念もあった。そこで着目したのが、脂質二重膜に結合する FM 色素であり、励起波長・蛍光波長・脂質二重膜への結合力・ダイナミックレンジ・使用濃度等が異なる FM1-43、FM4-64、FM2-10 の3色素 (Wu et al., *Biophys. J.* 97, 101-109, 2009) の適用可能性を検討した。これらの FM 色素を細胞外液に添加した場合、分泌刺激非存在下では細胞膜を染めるだけであるが、分泌刺激の種類によらず、刺激依存的に細胞内に侵入して蛍光を発することが分かった。その中でも FM1-43 が、分泌刺激非存在下で細胞膜が低染色であること、分泌刺激存在下でも蛍光強度が飽和しにくいこと、また蛍光強度増大のタイムコースも (生化学的脱顆粒評価系と比べた場合) リーズナブルであること等から、新規脱顆粒度合評価系のイメージング基盤として有用であると判断した (図2)。

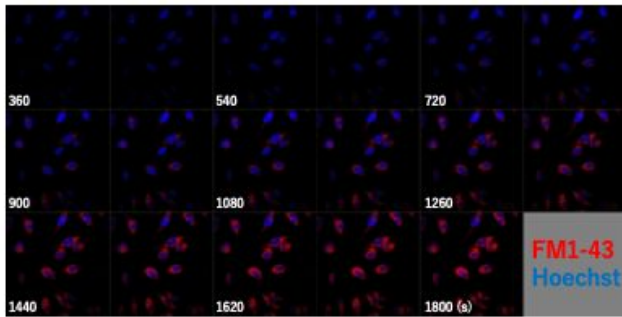


図2：抗原刺激添加後の細胞内FM1-43蛍光の出現 (刺激後360 s~)

その中でも FM1-43 が、分泌刺激非存在下で細胞膜が低染色であること、分泌刺激存在下でも蛍光強度が飽和しにくいこと、また蛍光強度増大のタイムコースも (生化学的脱顆粒評価系と比べた場合) リーズナブルであること等から、新規脱顆粒度合評価系のイメージング基盤として有用であると判断した (図2)。蛍光プレートリーダーでもこの蛍光強度変化は測定可能である。なお、FM1-43 蛍光の退色は観察・測定時間を通じて認められなかった。

(3) Munc13-4 と Munc18-2 はともにマスト細胞の脱顆粒に必要な制御分子であり、両分子とも細胞膜 分泌顆粒間および分泌顆粒 分泌顆粒間の膜融合を、trans-SNARE 複合体の形成を調節することで制御している。これらの脱顆粒関連遺伝子のいずれかをノックダウンするだけで、脱顆粒能が著しく低下することが、生化学的脱顆粒評価系を通じて、また形態学的に分かっている。そこで、分泌刺激依存的な細胞内 FM1-43 蛍光の出現が、脱顆粒によって細胞外液と接した分泌顆粒膜が染色されたものであるかを、上記脱顆粒関連遺伝子のノックダウンにより検討した。Munc13-4 をノックダウンすると、分泌刺激存在下でも細胞内 FM1-43 蛍光強度の増大がほとんど起こらず (図3)、脱顆粒に伴う細胞形態変化も少しだけであった。Munc18-2

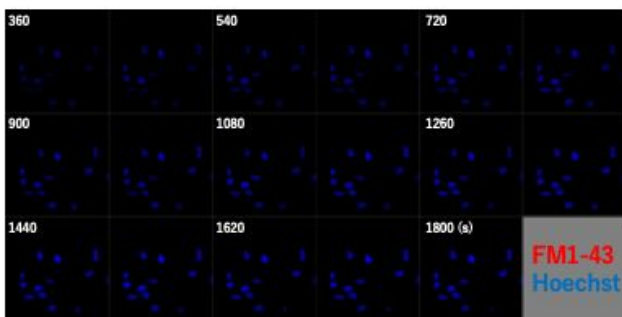


図3：Munc13-4ノックダウン時の細胞内FM1-43蛍光の出現 (抗原刺激、刺激後360 s~)

のノックダウンでも同様の結果が得られた。これらの結果より、FM1-43 は、脱顆粒の結果細胞外液が流入した分泌顆粒の脂質二重膜を染色していることが示唆された。また現在、(シナプス小胞の回収のように) 脱顆粒によってエンドサイトーシスが活発化し、その結果 FM1-43 が uptake され細胞内蛍光が増大するという可能性も念頭において、エンドサイトーシス関連遺伝子のノックダウン、またエンドサイトーシス阻害剤等の影響の有無も検討中である。

(4) 分泌顆粒マーカー CD63-GFP を発現させた細胞に分泌刺激を与えたところ、FM1-43 蛍光

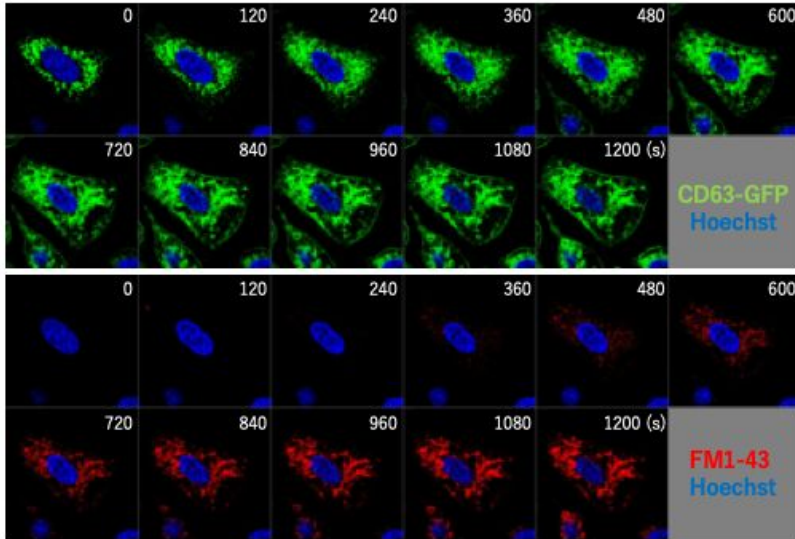


図4：分泌顆粒マーカーを用いたFM1-43蛍光の細胞内局在解析
(抗原刺激、分泌刺激後0s～)

が、初めは GFP 蛍光上に dot 状に出現し、その後クラスター化しゆく GFP 蛍光上をひも状に進展しつつ蛍光強度を増してゆくことが明らかになった(図4)。この結果から、FM1-43は脱顆粒によって細胞外液と接した分泌顆粒膜を染めていること、そして FM1-43 蛍光の細胞内進展が compound exocytosis を可視化していることが示唆された。しかし、FM1-43 を(励起波長および蛍光波長の特性から)他の蛍光色素との組み合わせ

ることは比較的難しく、本結果においても GFP フィルターへの FM1-43 蛍光の若干の漏れ込みが確認された。そのため現在、FM1-43-positive-structure が本当に分泌顆粒局在であるかを、電子顕微鏡を用いてより詳細に検討中である。

(5) 細胞膜透過性の pH 感受性色素 pHrodogreen-AM を細胞外液に添加して一定時間インキュベートすると、細胞内の分泌顆粒を含む酸性オルガネラが緑色蛍光でラベルされる。分泌刺激を与えて顕微鏡観察したところ蛍光強度の局所的な減弱が見られたが、これは脱顆粒を起こした分泌顆粒が中性の細胞外液に接したためであると考えられた。しかし、この蛍光色素は、分泌顆粒以外の酸性オルガネラも染色すること、また観察・測定時間中に退色が進むことから、脱顆粒度合を鋭敏に捉える評価系にはならないと判断した。また、エンドサイトーシスで pHrodogreen-dextran をあらかじめ取り込ませ分泌顆粒に蓄積させる方法(分泌顆粒を優先的に染色する方法)も検討したが、さほど事態は解決されなかった。このような結果であったこと、また FM1-43 をイメージング基盤とすることで他の蛍光色素との組み合わせが困難となったことから、上記(1)で示した2通りのイメージング方法を組み合わせた脱顆粒度合評価系の構築を中止した。

(6) FM1-43 を用いる、バックグラウンドが低く・蛍光強度が強く・退色が少ない本脱顆粒イメージング系は、生化学的手法に代わる脱顆粒度合評価系の技術基盤として好適であると考えられた。ここまでの成果は、FM1-43 蛍光の細胞内局在の詳細を詰め、当初計画にあった脱顆粒制御物質スクリーニングへの適用可否を検討したのちに発表する予定である。また現在、研究代表者が同定した脱顆粒関連遺伝子 Rab37 および Munc13-1 の時間的・空間的機能解析に本脱顆粒度合評価系/イメージング系を利用しており、従来の生化学的脱顆粒度合評価系との詳細な比較を続けている。なお、本研究の実施過程で、分泌刺激の種類によって細胞内 FM1-43 蛍光の出現パターンが異なること見出し、次なる研究課題として分泌刺激の種類と脱顆粒様式との連関を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Yokoyama T., Takemoto M., Hirakawa M., Saino T.: Different immunohistochemical localization for TMEM16A and CFTR in acinar and ductal cells of rat major salivary glands and exocrine pancreas. *Acta Histochem.* 121, 50-55 (2019) (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.10.013>

Maruyama M., Kobayashi M., Uchida T., Shimizu E., Higashio H., Ohno M., Uesugi S., Kimura KI.: Anti-allergy activities of Kuji amber extract and kujigamberol. *Fitoterapia* 127, 263-270 (2018) (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.033>

Uchida T., Koshino H., Takahashi S., Shimizu E., Takahashi H., Yoshida J., Shinden H., Tsujimura M., Kofujita H., Uesugi S., Kimura KI.: Ca²⁺-Signal Transduction Inhibitors, Kujiol A and Kujigamberol B, Isolated from Kuji Amber Using a Mutant Yeast. *J. Nat. Prod.* 81, 1070-1074 (2018) (査読有)

<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00922>

Higashio H.*, Satoh Y., Saino T. (*corresponding author): Inhibitory role of Munc13-1 in antigen-induced mast cell degranulation. *Biomedical Research (Tokyo)* 38, 321-329 (2017) (査読有)

<https://doi.org/10.2220/biomedres.38.321>

Shiono Y., Muslihah NI., Suzuki T., Arieftha NR., Anwar C., Nurjanto HH., Aboshi T., Murayama T., Tawaraya K., Koseki T., Yoshida J., Usukhbayar N., Uesugi S., Kimura KI.: New eremophilane and dichlororesorcinol derivatives produced by endophytes isolated from *Ficus ampelas*. *J. Antibiot.* 70, 1133-1137 (2017) (査読有)

<https://doi.org/10.1038/ja.2017.125>

Yoshida J., Uesugi S., Kawamura T., Kimura K., Hu D., Xia S., Toyooka N., Ohnishi M., Kawashima H.: (4Z,15Z)-Octadecadienoic acid inhibits glycogen synthase kinase-3 β and glucose production in H4IIE cells. *Lipids* 52, 295-301 (2017) (査読有)

<https://doi.org/10.1007/s11745-017-4236-3>

Yokoyama T., Saino T., Nakamuta N, Yamamoto Y.: Topographic distribution of serotonin-immunoreactive urethral endocrine cells and their relationship with calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in male rats. *Acta Histochem.* 119, 78-83 (2017) (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.11.011>

Yokoyama T, Yamamoto Y, Saino T.: Serotonin-mediated modulation of acetylcholine-induced intracellular calcium responses in chromaffin cells isolated from the rat adrenal medulla. *Neurosci Lett.* 644 114-120 (2017) (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.048>

Abe T., Kobayashi M., Okawa Y., Inui T., Yoshida J., Higashio H., Shinden H., Uesugi S., Koshino H., Kimura KI.: Yeast Ca²⁺-signal transduction inhibitors isolated from Dominican amber prevent the degranulation of RBL-2H3 cells through the inhibition of Ca²⁺-influx. *Fitoterapia* 113, 188-194 (2016) (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.07.018>

Shiono Y., Miyazaki N., Murayama T., Koseki T., Harizon, Katja DG., Supratman U., Nakata J., Kakihara Y., Saeki M., Yoshida J., Uesugi S., Kimura KI.: GSK-3 β inhibitory activities of novel dichlororesorcinol derivatives from *Cosmospora vilior* isolated from a mangrove plant. *Phytochem. Lett.* 18, 122-127 (2016) (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.09.007>

[学会発表] (計 7 件)

東尾浩典、佐藤洋一、齋野朝幸: マスト細胞における Munc13-1 の発現と脱顆粒への関わり. 第 69 回日本細胞生物学会大会 (2017)

守口霞、東尾浩典、横山拓矢、久慈昭慶、佐藤洋一、齋野朝幸: シェーグレン症候群での耳下腺分泌障害には交感神経系が関与している可能性がある. 第 63 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 (2017)

吉田潤、上杉祥太、川村哲晃、木村賢一、Dawei Hu、Shuang Xia、豊岡尚樹、大西正男、川島英城: 神経突起伸長作用を有する非メチレン中断型ジエン酸の新たな生物活性探索. 日本油化学会第 55 回年会 (2016)

吉田潤、大川佑介、小山卓矢、上杉祥太、木村賢一: ヒマシ油由来ヒドロキシ脂肪酸 ricinoleic acid のカルシニューリン阻害活性. 日本農芸化学会東北支部第 151 回大会 (2016)

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 齋野 朝幸

ローマ字氏名 : Saino Tomoyuki

所属研究機関名 : 岩手医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 4 0 3 0 5 9 9 1

研究分担者氏名 : 吉田 潤

ローマ字氏名 : Yoshida Jun

所属研究機関名 : 岩手医科大学

部局名 : 教養教育センター

職名 : 助教

研究者番号(8桁): 20611007

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。