

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19725

研究課題名(和文)ニューロメジンUによる皮膚型マスト細胞の活性化機構の解明

研究課題名(英文)The role of neuromedin-U for mast cells activation.

研究代表者

松尾 佳美(Matsuo, Yoshimi)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・研究員

研究者番号：50754355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)、BMMCを分化させたマウス皮膚型マスト細胞(CTMC)および、ヒト皮膚マスト細胞(HSMC)を作成し、ニューロメジンU(NMU)によるマスト細胞の活性化機序を検討した。NMUは*in vitro*でCTMC、HSMCを直接活性化し脱顆粒を誘導することが示された。受容体に関しては、CTMC、HSMCにはNMUの本来の受容体であるNMUR1の発現はmRNAのリアルタイムPCR法ではほとんど認められず、サブスタンスP等の神経ペプチドの新規受容体として同定されたMRGPRX2(マウスの場合Mrgprb2)の発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of NMU on the activation of mouse bone marrow-derived mast cells (BMMC), connective-tissue type mouse mast cells differentiated from BMMC (CTMC), and human skin derived mast cells (HSMC) *in vitro*. NMU induced the degranulation of CTMC and HSMC, but not BMMC, in a concentration-dependent manner. Although no or only slight NMU receptors (NMUR1) were expressed in CTMC and HSMC, MAS-related G protein coupled receptor-X2 (MRGPRX2) and Mrgprb2, mouse analog of MRGPRX2 were highly expressed in HSMC and in CTMC, respectively, but not in BMMC at mRNA level.

研究分野：Dermatology

キーワード：神経ペプチド ニューロメジンU マスト細胞 ヒスタミン

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は即時型アレルギー反応、寄生虫の感染防御、接触性皮膚炎などの発症・増悪において中心的な役割を果たす細胞として認識されているが、その生理的機能については今なお不明な点が多く残されている。マスト細胞は、IgE 受容体依存性、IgE 非依存的な刺激によって活性化されることが知られており、マスト細胞を直接活性化する物質としては、補体、病原体産物、金属イオン、神経ペプチド (サブスタンス P など) がある。

ニューロメジン U (Neuromedin U, NMU) は、1985 年にブタ子宮平滑筋の収縮を指標としてブタ脊髄から抽出された神経ペプチドで、食欲低下、生物時計、血圧上昇、平滑筋収縮、胃腸におけるイオン輸送制御、骨代謝などの幅広い生物学的活性を持つことが報告されている。

皮膚炎症に関しては、これまでに、*in vivo* 研究において、マウス皮膚マスト細胞が NMU により活性化されることが報告されている (Moriyama M et al. *J Exp Med* 2005;202:217-224.) が、NMU 反応性のマスト細胞モデルが確立されていないため、*in vitro* での研究はほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、マウス NMU 反応性皮膚型マスト細胞および、ヒト皮膚マスト細胞を作成する方法を確立し、NMU によるマスト細胞の活性化機序の解明とアレルギー疾患への関与を検討した。

3. 研究の方法

1) マウス NMU 反応性皮膚型マスト細胞モデルの作成および NMU 刺激による応答

マウス骨髄由来マスト細胞 (Bone marrow derived mast cells, BMDC) を Stem cell factor (SCF), 線維芽細胞共存下で培養し、NMU などの神経ペプチドに反応する皮膚型マスト細胞 (Connective tissue-type mast cells, CTMC) へ分化させる手法を確立する。そして NMU 刺激による BMDC および

CTMC の脱顆粒を β -hexosaminidase 法で評価した。

2) マウス皮膚型マスト細胞における NMU 受容体の同定

末梢において、NMU は細胞膜上に発現する NMUR1 に結合し、その生理機能を発現することが知られており、CTMC における NMUR1 の mRNA および蛋白レベルの発現の程度を、リアルタイム PCR 法により確認した。併せて、様々な神経ペプチドの受容体として知られる Mas-related G-protein coupled receptor b2 (Mrgprb2) 受容体の発現の有無も確認した。

3) NMU によるマウス皮膚型マスト細胞活性化シグナルの解明

NMUR1 は G タンパク結合型受容体の一種であり、Gaq/11 とカップリングしていることが予想された。そのため、その下流シグナルを解析するために PLC の活性化、Ca イオンの上昇の有無を評価した。

4) NMU によるマウス皮膚型マスト細胞活性化による脂質代謝物の放出

CTMC を NMU 刺激して起こるロイコトリエン B4 の産生・放出について ELISA によって解析した。

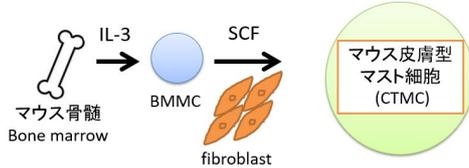
5) ヒト皮膚由来マスト細胞の NMU に対する応答

ヒト皮膚マスト細胞として、細切したヒト皮膚を酵素処理 (コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ) して、皮膚由来細胞を回収し、SCF 存在下で培養して高純度の皮膚マスト細胞 (human skin derived mast cells, HSMC) を得た。マウスでの検討結果に基づき、HSMC の NMU に対する応答を解析し検討した。

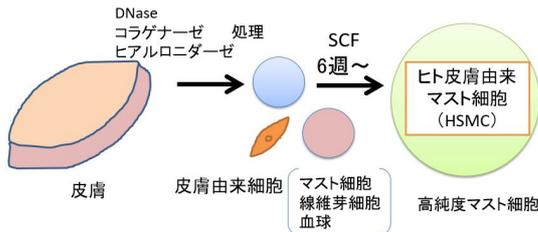
6) ヒト皮膚由来マスト細胞における NMU 受容体の同定

マウスでの検討結果に基づき、HSMC における NMUR1 および MRGPRX2 受容体の発現の有無を確認した。

マウス皮膚型マスト細胞の作成方法



ヒト皮膚由来マスト細胞の作成方法



4. 研究成果

1) マウス NMU 反応性皮膚型マスト細胞の作成および NMU 刺激による応答

BMMC を SCF・線維芽細胞共存下で NMU などの神経ペプチド反応性の皮膚型マスト細胞 (CTMC) へ分化させる方法を確立した。アルシアンブルーおよびサフラニン染色により CTMC の分化度および純度を確認した。

CTMC を NMU で刺激すると、サブスタンス P と同様に濃度依存性に脱顆粒を引き起こした。一方 BMMC では反応しなかった。

2) マウス皮膚型マスト細胞における NMU 受容体の同定

CTMC には、NMUR1 はほとんど検出されず、サブスタンス P 等の神経ペプチドの新規受容体として同定された Mrgprb2 の発現がリアルタイム PCR および電気泳動にて確認された。

3) NMU によるマウス皮膚型マスト細胞活性化シグナルの解明

NMU 刺激による CTMC の活性化に伴い、Fura2 を利用し細胞内 Ca の上昇が認められた。NMU による脱顆粒反応は Ca²⁺依存性 PKC 阻害薬で抑制され、Ca 動員に次ぐ PKC の活性化が重要であることが示唆された。

4) NMU によるマウス皮膚型マスト細胞活性化による脂質代謝物の放出

NMU は CTMC を脱顆粒させるが、ロイコトリエン B4 脂質代謝物の放出はほとんど認められなかった。

5) ヒト皮膚由来マスト細胞の NMU に対する応答

マウスでの検討結果に基づき、HSMC を NMU で刺激すると、compound 48/80、サブ

スタンス P と同様に脱顆粒を引き起こした。

6) ヒト皮膚由来マスト細胞における NMU 受容体の同定

HSMC には NMU の本来の受容体である NMUR1 の発現は mRNA のリアルタイム PCR 法ではほとんど認められず、MRGPRX2 の発現が確認された。

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 3 件)

1. The role of adenosine for IgE receptor-dependent degranulation of human peripheral basophils and skin mast cells.

Matsuo Y, Yanase Y, Irifuku R, Ishii K, Kawaguchi T, Takahagi S, Hide I, Hide M. *Allergol Int.* 2018. In press

2. Prognosis of adult-onset clinically amyopathic dermatomyositis treated with only topical therapy.

Matsuo Y, Mihara S, Tanaka A, Kawai M, Hide M. *J Dermatol.* 2017; 44 (7): e178-e179.

3. Novel splice site mutation in LIPH identified in a Japanese patient with autosomal recessive woolly hair.

Matsuo Y, Tanaka A, Shimomura Y, Hide M. *J Dermatol.* 2016; 43 (11): 1384-1385.

[学会発表](計 8 件)

1. 松尾佳美, 柳瀬雄輝, 田中智之, 古田和幸, 秀道広 皮膚アレルギーの病態におけるニューロメジン U の役割解明 第 21 回日本ヒスタミン学会 平成 29 年 12 月 21 日

2. Yoshimi Matsuo, Yuhki Yanase, Satoshi Tanaka, Kazuyuki Furuta, Michihiro Hide. Neuromedin U directly activates human and mouse skin mast cells 47th The European Society for Dermatological Research 2017/9/30

3. 松尾佳美, 柳瀬雄輝, 川口智子, 石井香, 秀道広 好塩基球・ヒト皮膚マスト細胞の活性化に対するプリン代謝物の影響 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 平成 29 年 6 月 16 日

4. 信木晴菜, 松尾佳美, 秀道広, 山崎聡士

Klinefelter 症候群に全身性強皮症と Sjogren 症候群を合併した 1 例 第 27 回 日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会 平成 28 年 12 月 2 日

5. 松尾佳美、柳瀬雄輝、川口智子、石井香、秀道広 好塩基球・マスト細胞の活性化に対するプリン代謝物の影響 第 20 回 日本ヒスタミン学会 平成 28 年 11 月 24 日
6. 松尾佳美、柳瀬雄輝、田中智之、秀道広 ニューロメジン U による 皮膚型マスト細胞の活性化機構の解明 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 平成 28 年 6 月 17 日
7. 松尾佳美、田中暁生、下村裕、秀道広 常染色体劣性縮毛症/乏毛症患者で新規に同定された Lipase H 遺伝子のスプライス部位変異 第 115 回日本皮膚科学会 平成 28 年 6 月 5 日
8. 松尾佳美、柳瀬雄輝、田中智之、秀道広 ニューロメジン U による皮膚型マスト細胞の活性化機構の解明 第 19 回日本ヒスタミン学会 平成 27 年 11 月 13 日

〔図書〕(計 1 件)

職業その他によるアレルギー 松尾佳美
秀道広 1336 専門家による 私の治療
2017-18 年度版 日本医事新報社 863-865
〔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〕

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 佳美 (MATSUO YOSHIMI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科 研究員

研究者番号：50754355