

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007~2008
課題番号：19590091
研究課題名（和文） マスト細胞の成熟に伴う機能発現とその過程における IgE の役割の解明
研究課題名（英文） Functional maturation of mast cells: Roles of IgE during maturation

研究代表者

田中 智之（TANAKA SATOSHI）
武庫川女子大学・薬学部・准教授
研究者番号：40303846

研究成果の概要：

喘息や花粉症といった慢性アレルギー疾患は近年拡大を続けており、効果的な治療法の開発が要請されている。マスト細胞は全身の様々な組織に分布し、こうした疾患の病態形成に関わることが知られている。研究代表者は従来不明であったマスト細胞の成熟過程に着目し、本研究を通じて皮膚型マスト細胞の培養モデルを確立し、その過程を解析することを通じて、マスト細胞の増殖やはたらきを調節する仕組みの一端を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、アレルギー、IgE、細胞分化、CD44

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は造血幹細胞に由来する血球系細胞であるが、最終的な分化・成熟は浸潤した組織において起こることが知られている。このことは、分布組織によるマスト細胞のヘテロ性を示唆するが、組織におけるマスト細胞の成熟過程を対象とした研究は限られていた。また、マスト細胞は IgE に対する高親和性受容体 FcεRI を発現するが、IgE の結合の有無がマスト細胞の成熟にどのような影響を与えるかについても不明であった。以上の背景のもと、本研究課題を構想した。

2. 研究の目的

従来不明であった組織におけるマスト細胞の成熟プロセスの解明、およびその過程における IgE の役割を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 組織におけるマスト細胞の成熟・分化を反映する培養モデルの構築

骨髓細胞を IL-3 存在下、長期培養して得られる未成熟マスト細胞(BMMC)を、stem cell factor (SCF)存在下、線維芽細胞株 Swiss 3T3

と共培養することにより、皮膚組織に分布する成熟マスト細胞に類似したモデルを得る。また、その過程における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、マスト細胞の成熟・分化を支配する遺伝子群の同定を試みる。

(2) IgE 存在下におけるマスト細胞の成熟・分化の解析

BMMC を IgE 共存下で調製し、IgE 結合がマスト細胞の分化にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

(3) 単量体 IgE 応答の長期的な影響の解析

抗原非存在下、IgE の結合によりマスト細胞が活性化する応答を単量体 IgE 応答といい、これはクローンにより強さに相違がある。単量体 IgE 応答の程度の異なる複数のクローンによる長期の感作が、それぞれマスト細胞の脱顆粒応答にどのような影響を与えるかを解析する。

4. 研究成果

(1) 成熟マスト細胞モデルの構築

① 皮膚型マスト細胞モデルの構築、およびその評価

方法で述べた線維芽細胞株との共培養モデルにより、皮膚マスト細胞ときわめて類似した性質をもつ培養マスト細胞の調製法を確立した。このモデルでは、成熟マスト細胞の特徴である、compound 48/80 のようなカチオン性刺激に対する脱顆粒応答や、サフラン染色性の増大といった現象が確認された。

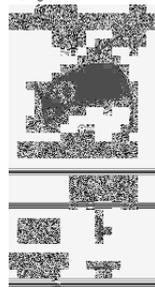
さらに、この系を利用して、BMMC から成熟マスト細胞への過程の経時的な遺伝子発現変化を網羅的に解析した。アラキドン酸代謝系の変化や、顆粒プロテアーゼの誘導といった従来から知られているマスト細胞の表現型の変化に対応する遺伝子発現の変化を確認した。さらにこうした既知の遺伝子変化に加えて、Gfi1 の誘導や GATA-1 の発現低下といった転写因子の発現変化、CD81 や FcγRIIB といった抑制系分子の誘導など、多数の興味深い遺伝子群を抽出することに成功した。

② マスト細胞の成熟過程における細胞増殖における CD44 の機能の解明

①の解析結果をもとに、マスト細胞の成熟過程で誘導される遺伝子の一つである CD44 に着目した。CD44 は主要なヒアルロン酸受容体の一つであるが、線維芽細胞株との共培養系では、マスト細胞は線維芽細胞が産生するヒアルロン酸を主とするマトリックスに結合してクラスターを形成しており、CD44 欠損の BMMC は、共培養時の細胞増殖が殆ど起こらないことを見いだした。また、CD44 欠損マウスでは皮膚組織、腹腔内におけるマ

スト細胞数が有意に減少していることを見いだした。さらに、マスト細胞欠損マウス (W/W^V) の皮膚組織に BMMC を再構成する系において、野生型 BMMC を移植した場合は、移植マスト細胞数の増加が、5 から 10 週の間で起こるが、CD44 欠損型 BMMC を移植した場合は、そのようなマスト細胞数の変化は殆ど認められないことを示した。即ち、CD44 はマスト細胞が皮膚組織において最終成熟を行う過程における細胞増殖に関与することが強く示唆された。

一連の成果は、今回確立した培養系が皮膚型マスト細胞のモデルとして妥当性が高いこと、および、共培養の過程を解析することにより、マスト細胞の組織における増殖や分化を制御する因子を同定するというアプローチが可能であることを示唆するものである。CD44 以外の候補遺伝子についても現在検討を進めている。また、研究代表者が発表した培養モデルには国内外から問い合わせが寄せられており、従来困難であった成熟マスト細胞を対象とした研究分野における新たなツールとして貢献するものと考えられる。



また、今回解析した CD44 は成熟過程におけるマスト細胞の増殖に促進的に働くことを *in vitro*、*in vivo* の両方で示すことができた。CD44 はヒアルロン酸受容体であり、加齢や疾患による皮膚組織のヒアルロン酸量の低下が、長期的にはマスト細胞数に影響する可能性が考えられた。

(2) IgE によるマスト細胞分化・成熟の制御機構

① IgE 存在下におけるマスト細胞への分化

持続的に IgE 存在下で骨髓細胞を培養し、BMMC を調製すると、無添加のものと比較して、FcεRI の発現レベルが速やかに増大することが分かった。また、単量体 IgE 効果の強いクローン SPE-7 では、無添加や単量体 IgE 効果の低いクローン IgE-3 と比べて、分化に伴うカルボキシペプチダーゼ A 活性の誘導が殆ど起こらないことが分かった。一方で、ヒスタミン含量は SPE-7 を処理した BMMC で有意に高いレベルを維持することが分かった。

② 長期の IgE 添加による脱顆粒応答の変化

SPE-7 により感作された BMMC は、IgE-3 で感作されたものより、脱顆粒応答が有意に低下することを見いだした。

以上の結果は、IgE 感作により長期的にはマスト細胞の性質に変化が生じる可能性があること、および、それはクローンの相違によっても異なる可能性があることを示すも

のである。以上の知見は、高 IgE 血症を伴う慢性アレルギー疾患におけるマスト細胞と IgE との関係に新たな視点を提供するものである。

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 9 件)

1~7 は査読有り、8, 9 は査読無し。

1. Tsuchiya, S., Tachida, Y., Segi-Nishida, E., Okuno, Y., Tamba, S., Tsujimoto, G., Tanaka, S., and Sugimoto, Y. Characterization of gene expression profiles for different types of mast cells pooled from mouse stomach subregions by an RNA amplification method. (2009) *BMC Genomics* in press.
2. Takano, H., Nakazawa, S., Shirata, N., Tamba, S., Furuta, K., Tsuchiya, S., Morimoto, K., Itano, N., Irie, A., Kimata, K., Nakayama, K., Sugimoto, Y., and Tanaka, S. Involvement of CD44 in mast cell proliferation during terminal differentiation. (2009) *Lab. Invest.* in press.
3. Sakanaka, M., Tanaka, S., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. Essential role of EP3 subtype in prostaglandin E₂-induced adhesion of mouse cultured and peritoneal mast cells to the Arg-Gly-Asp-enriched matrix. (2008) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C1427-C1433.
4. Kataoka, H., Sakanaka, M., Semma, M., Yamamoto, T., Hirota, S., Tanaka, S., and Ichikawa, A. PGE₂-receptor subtype EP4-dependent adherence of mastocytoma P-815 cells to matrix components in subcutaneous tissues overlaying inside surface of air pouch cavity in CDF1 mouse. (2008) *Inflamm. Res.* 57, 362-366.
5. Furuta, K., Nakayama, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., and Tanaka, S. Activation of histidine decarboxylase through post-translational cleavage by caspase-9 in a mouse mastocytoma P-815. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 13438-13446.
6. Taketomi, Y., Sunaga, K., Tanaka, S., Nakamura, M., Arata, S., Okuda, T., Moon, T., Chang, H., Sugimoto, Y., Kokame, K., Miyata, T., Murakami, M., and Kudo, I. Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in NDRG1-deficient mice. (2007) *J. Immunol.* 178, 7042-7053.
7. Ueta, M., Nakamura, T., Tanaka, S., Kojima, K., and Kinoshita, S. Development of eosinophilic conjunctival inflammation at late-phase reaction in mast cell-deficient mice. (2007) *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 476-478.
8. 田中智之 IgE を介するマスト細胞活性化

の多様性 (2007) 臨床免疫・アレルギー科、47, 421-426.

9. 田中智之 マスト細胞の成熟とヒアルロン酸 (2007) 表面、45, 312-321.

[学会発表] (計 13 件)

1. 阪中麻利子、古田和幸、市川厚、田中智之 生活習慣病モデルラットにおける IgE 依存性抗原抗体反応の減弱、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都国際会議場
2. 栗宗由樹、阪中麻利子、田中智之 単量体 IgE 応答による脱顆粒反応の抑制、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都国際会議場
3. 高野裕嗣、豊田さやか、木全弘治、中山和久、杉本幸彦、市川厚、田中智之 CD44 を介した組織結合型マスト細胞の増殖機構、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都国際会議場
4. 古田和幸、辻屋朝美、阪中麻利子、市川厚、田中智之 アディポネクチンによるマスト細胞活性化の抑制、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都国際会議場
5. 岡田安代、阪中麻利子、田中智之、西川淳一、扇間昌規、市川厚 PGE₂ 刺激マスト細胞株 P-815 細胞のフィブロネクチン接着に関するインテグリン分子種の検討、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都国際会議場
6. 田中智之、高野裕嗣、奥野恭史、村上誠、辻本豪三、工藤一郎、中山和久、杉本幸彦、市川厚 組織結合型マスト細胞への成熟を制御する因子の探索、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド
7. Tanaka, S. Histamine promotes mast cell granule maturation in an autocrine manner. The XIIth annual meeting of the Polish Histamine Research Society. Nov. 25, 2008 Lodz, Poland.
8. 阪中麻利子、田中智之、杉本幸彦、市川厚、PGE₂ 受容体サブタイプ EP3 を介したマウスマスト細胞のマトリックスへの接着機構、第 58 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2008 年 10 月 25 日、神戸薬科大学
9. 田中智之、阪中麻利子、古田和幸 高血圧モデルラットのマスト細胞における IgE 依存性抗原抗体反応による脱顆粒応答の減弱、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜
10. 阪中麻利子、田中智之、杉本幸彦、市川厚 腹腔マスト細胞および骨髄由来培養マスト細胞の PGE₂ 受容体サブタイプ EP3 を介した接着反応、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜
11. 田中智之 H₄ 受容体の機能を探る - マスト細胞の成熟/腫瘍免疫、第 11 回日本ヒス

タミン学会、2007年12月15日、ボルフェア
ト富山

12. 黒岩健二、山岡久美子、矢野亜希子、田中智之、市川厚、杉本幸彦 プロスタグランジンEP3受容体によるcAMP産生増強のシグナル機構、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月13日、パシフィコ横浜

13. 白田成俊、森大介、高野裕嗣、田中智之、中山和久、杉本幸彦 プロスタグランジンE₂はマスト細胞脱顆粒を引き起こす、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月14日、パシフィコ横浜

〔その他〕

研究成果を公表するホームページ
<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~meneki>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 智之 (TANAKA SATOSHI)
武庫川女子大学・薬学部・准教授
研究者番号：40303846

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

阪中 麻利子 (SAKANAKA MARIKO)
武庫川女子大学・薬学部・助手
研究者番号：00425109