

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02940

研究課題名(和文)メタボリックレギュレーターとしてのマスト細胞の新たな役割とその制御

研究課題名(英文) Novel roles of mast cells as metabolic regulators and their regulation

研究代表者

高橋 恭子 (TAKAHASHI, Kyoko)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70366574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞はアレルギー炎症を誘導する細胞として広く知られるが、決してアレルギーを引き起こすために生体内に存在するわけではなく、近年、その多様な生理的役割が明らかにされてきている。本研究では、マスト細胞が脂肪細胞の分化・成熟を正負両方向に制御することを明らかにし、マスト細胞の新たな生理機能の可能性を示した。マスト細胞は、産生する液性因子を介して脂肪細胞の分化・成熟を抑制する一方で、細胞間の物理的接触を介して脂肪細胞の分化・成熟を促進した。また、抑制作用には、高分子量で熱感受性のタンパク性因子および細胞外トラップが関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マスト細胞が脂肪蓄積の制御という新たな生理的役割を担うことが示唆され、多機能な免疫細胞として注目されているマスト細胞の新しい一面が明らかになった。近年、生活習慣病罹患患者および予備軍の増加が問題となっており、肥満は、その重要なリスクファクターである。加えて、内臓脂肪の蓄積により誘導される慢性炎症が様々な疾患につながることから、マスト細胞を介した脂肪細胞の制御機構の解明とその手段の確立は、肥満の抑制や生活習慣病の予防に向けた新たな戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Although mast cells are widely known to induce allergic inflammation, it has recently noticed that they originally play various physiological roles in vivo. In this study, we showed that mast cells regulate adipocyte differentiation/maturation in both positive and negative manners, suggesting a novel role of mast cells in metabolic regulation. Mast cells suppressed adipocyte differentiation/maturation via the soluble factor which they produced, while they promoted adipocyte differentiation/maturation via the physical intercellular contact. The suppression of adipocyte differentiation/maturation was mediated by the heat and protease-sensitive factor with high molecular mass, and the involvement of extracellular traps in the inhibitory effect was suggested.

研究分野：食品免疫学

キーワード：マスト細胞 脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、アレルギー炎症の責任細胞として広く知られている。マスト細胞表面には、アレルギーの原因抗体である IgE に対する受容体が発現し、この受容体を介して IgE とアレルギー (アレルギーの原因物質) により活性化されると、細胞内の顆粒中に蓄えられているヒスタミンをはじめとする炎症性物質を細胞外へ放出する。しかしながら、マスト細胞は決してアレルギーを引き起こすために生体に存在しているわけではない。従来、寄生虫感染に対する防御応答がマスト細胞の本来の役割であるとされてきたが、近年では、皮膚バリア、血管・リンパ管新生、角膜の発達、心臓機能等におけるマスト細胞の役割が報告され、マスト細胞が感染防御に加えて多彩な生理調節作用を示すことが明らかにされてきた。さらに、がん、脳卒中、関節リウマチ、炎症性腸疾患、アルツハイマーなどアレルギー以外の疾患に対するマスト細胞の関与も報告され、「アレルギー炎症を起こす細胞」という従来の認識から、「健康維持に不可欠な役割を果たす多機能な免疫細胞」としてその重要性が再認識され、注目を集めている。

マスト細胞は、IgE 受容体以外にも多様な受容体を発現し、また、多種類のメディエーターを産生する能力を持つ。したがって、周囲の環境に応答し、様々な細胞と相互作用する可能性が考えられる。これまでに、特に免疫系や神経系との相互作用について解析が行われてきたが、代謝系との相互作用や代謝調節における役割は十分明らかにされていない。本研究では特に、マスト細胞が脂肪組織中にも存在することに着目した。マスト細胞は粘膜や皮膚に多く存在するが、その他の様々な組織にも存在する。脂肪を蓄える白色脂肪細胞とその前駆細胞が集積する白色脂肪組織は、エネルギーの貯蔵・供給を行う重要な組織であるが、ここにもマスト細胞の浸潤が認められる。これは、脂肪組織中で脂肪細胞とマスト細胞との間に相互作用が存在することを示しており、マスト細胞が脂肪細胞へ作用することにより代謝を制御する可能性が考えられる。

一方、近年、生活習慣病罹患率および予備軍の増加が問題となっており、肥満は、その重要なリスクファクターの1つである。加えて、内臓脂肪の蓄積により誘導される慢性炎症が生活習慣病をはじめとする様々な疾患につながるということが明らかにされている。そこで、マスト細胞を介した脂肪細胞の制御機構の解明とその手段の確立は、肥満の抑制や生活習慣病の予防に向けた新たな戦略につながることを期待される。マスト細胞は、骨髄中で造血幹細胞から分化した後、未成熟な状態で血中へと放出される。その後、到達した各末梢組織で最終分化・成熟を遂げ、この過程で各組織の環境に依存して特徴的な性質を獲得する。なかでも腸管は、生体最大の粘膜組織であり、生体内に存在する全マスト細胞中の大きな割合を占めるマスト細胞が存在する。口から摂取して腸管へ到達する食品成分や腸管の管腔に大量に生息する腸内細菌は、腸管粘膜マスト細胞の性質を決定する重要な因子となる。腸管は、生体内でマスト細胞のリザーバーとして機能すると考えられていることから、食事や腸内細菌叢への介入によりマスト細胞の機能制御を介した健康維持、疾患予防の可能性が拓かれることが期待される。

これまでに、マスト細胞欠損マウスでは、高脂肪食を摂取させた場合に、野生型マウスと比較して体重増加や内臓脂肪重量が小さいことが報告されている。一方、我々は以前に、通常食摂取の場合には、逆にマスト細胞欠損マウスでは野生型マウスと比較して体重増加や内臓脂肪量が大きいことを観察している。したがって、マスト細胞が脂肪細胞の分化・成熟を正負両方向に制御する機構があるのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究ではマスト細胞が脂肪組織中にも存在することに着目し、脂肪細胞への作用を介して代謝を制御する「メタボリックレギュレーター」としての役割を検証し、分子機構を明らかにすることを目的とする。さらに、食や腸内細菌叢への介入により、マスト細胞の機能をコントロールし、肥満、生活習慣病を抑制する手段を見出すことを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導

マウス線維芽細胞株 3T3-L1 を播種して confluent 到達 2 日後に、脂肪細胞への分化を誘導するためにインシュリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを添加した。翌日、インシュリン添加培地に置換してさらに 4-7 日間培養した後、細胞を回収して解析を行った。

### (2) マウス骨髄由来マスト細胞の調製

C57BL/6 マウスより骨髄細胞を採取し、IL-3 存在下で 5-11 週間培養して得られた骨髄由来マスト細胞(BMMC)を使用した。

### (3) BMMC の培養上清の調製

BMMC を刺激なし、A23187 刺激、PMA 刺激、IgE/抗原刺激の計 4 条件で培養し、それぞれ培養上清を回収した。A23187 および PMA 刺激においては、刺激 1 時間後に細胞を洗浄して培養を続けた。IgE/抗原刺激においては、抗 TNP IgE 抗体にて 2 時間感作後に TNP-BSA 抗原を添加しさらに培養を行った。回収した培養上清から限外ろ過により、<3kDa, 3-50kDa, >50kDa, 50-100kDa, >100kDa の画分を得た。培養上清の>50kDa 画分について、65 30 分の加熱処理、固定

化トリプシンを用いたプロテアーゼ処理、ベンゾナーゼを用いたヌクレアーゼ処理を行った。また、培養上清の>100kDa 画分から免疫沈降により活性因子の候補分子を除去した。

(4) 3T3-L1 分化誘導系への BMMC あるいはその培養上清の添加

(1) の 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導系において、インシュリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを添加した翌日あるいは3日後に、0.4 $\mu$ mPCF メンブレンインサート存在下または非存在下で BMMC を添加して共培養を行った。あるいは、インシュリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを添加した翌日に(3)にて調製した BMMC の培養上清を添加して培養を行った。

(5) 脂肪滴の染色

10%中性緩衝ホルマリン液にて一晩細胞を固定後、オイルレッドOを用いて脂肪滴を染色し、光学顕微鏡により観察した。その後、細胞を溶解して色素を抽出し、540nm の吸光度を測定した。あるいは、生細胞を用いて Lipi-Blue により脂肪滴を染色し、蛍光顕微鏡により観察した。取得した画像の解析により、蛍光染色された領域の面積と輝度を定量した。

(6) 脂肪細胞の分化・成熟マーカー遺伝子の発現解析

回収した 3T3-L1 より総 RNA を抽出し、逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型としてサイバーグリーンを用いた定量 PCR により、Adiponectin および aP2 の発現量を測定した。各遺伝子の発現量は GAPDH の発現量で補正し、BMMC および上清を添加せずに分化させた細胞における発現量を 1 とした相対値で求めた。

(7) プロテオーム解析

BMMC の培養上清および対照として培地から ProteinG を用いてイムノグロブリンを除去し、還元、アルキル化、トリプシン処理後に nanoLC-MS/MS 分析を行った。

(8) 腸管粘膜マスト細胞の表現型に及ぼす腸内細菌の影響の解析

通常マウスおよび無菌マウスから、コラゲナーゼ処理およびパーコール分離により小腸粘膜固有層細胞を調製した。その後、セルソーターにより c-kit<sup>+</sup>Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup>の腸管粘膜マスト細胞を単離し、遺伝子発現パターンを比較した。また、食物アレルギーモデルマウスへフラクトオリゴ糖を投与し、腸内細菌叢の構成の変化が腸管粘膜マスト細胞の表現型に及ぼす影響を解析した。腸内細菌叢の解析は、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンシングにより行った。

(9) RNAi および過剰発現試験

腸内細菌により制御されることが示された転写因子について、siRNA をエレクトロポレーションにより BMMC に導入した。また、それらの転写因子について発現プラスミドを構築し、エレクトロポレーションにより BMMC に導入して過剰発現させた。培養後、BMMC を回収し、定量 PCR により受容体やサイトカイン等の遺伝子発現を解析した。

(10) マスト細胞の表現型を変化される腸内細菌の特定

占有率がマスト細胞の表現型の変化と相関を示した腸内細菌について、加熱死菌体を調製した。BMMC に調製した菌体を添加して 24 時間培養し、定量 PCR により受容体やサイトカイン等の遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) マスト細胞が産生する液性因子を介した脂肪細胞の分化・成熟の抑制

3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導系において、BMMC の培養上清を添加することにより、Adiponectin, aP-2 の発現誘導が抑制された。したがって、マスト細胞が産生する液性因子により、脂肪細胞の分化・成熟が抑制されることが示された。さらに、無刺激の BMMC に比較して、カルシウムイオノフォアで刺激した BMMC の培養上清に強い抑制作用が観察された。よって、抑制因子は定常状態のマスト細胞からも産生されるが、マスト細胞の活性化によりその産生が増強されることが示唆された。

次に、脂肪細胞の分化・成熟を抑制するマスト細胞由来の液性因子の特徴について解析した。BMMC の培養上清を加熱処理あるいはプロテアーゼ処理することにより、脂肪細胞の分化・成熟を抑制する活性が低下した。また、限外ろ過により分画を行った結果、培養上清の>100kDa 画分が活性を有することが明らかになった。したがって、活性因子は、タンパク成分を含む>100kDa の熱感受性物質であると考えられた。そこで、BMMC の培養上清の>100kDa 画分についてプロテオーム解析を行った。その結果、BMMC の培養上清で培地に比べて顕著に高濃度で含まれる分子が複数同定された。同定された候補分子を免疫沈降により培養上清から除去し、脂肪細胞の分化・成熟に及ぼす影響を解析した結果、マスト細胞から放出される細胞外トラップが関わる可能性が示された。

(2) マスト細胞との物理的接触を介した脂肪細胞の分化・成熟の促進

一方、3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導系において、BMMC を添加して共培養を行うことにより脂肪滴の蓄積が促進された。さらに、この脂肪滴の蓄積の促進作用は、トランズウェルインサートを使用して BMMC を添加した場合に低下した。これらの結果から、マスト細胞は、脂肪細胞との物理的接触を介して脂肪細胞の分化・成熟を促進することが示された。また、この促進作用は、BMMC を 3T3-L1 の分化誘導初期に添加した場合より後期に添加した場合のほうが強いことが示された。

(3) 腸内細菌がマスト細胞の表現型に及ぼす影響の解析

腸内細菌によるマスト細胞への作用を介した脂肪細胞の制御の可能性について検証するため、

腸内細菌がマスト細胞の表現型へ及ぼす影響を解析した。まず、通常および無菌マウスの腸管粘膜マスト細胞を単離して遺伝子発現パターンを比較することにより、腸内細菌がマスト細胞の表現型に影響を及ぼすことが示された。腸内細菌によりマスト細胞における発現が制御されることが明らかになった4つの転写因子について BMMC への siRNA あるいは過剰発現プラスミドの導入試験を行った結果、受容体やサイトカインの遺伝子発現が変化することが示された。また、食物アレルギーモデルマウスを用い、抗アレルギー作用を示すプレバイオティクスを投与した際、腸内細菌叢の構成の変化が誘導され、また、腸管粘膜マスト細胞上の IgE 受容体 FcεRI の発現が低下した。さらに、占有率がマスト細胞の表現型の変化と相関を示した腸内細菌の加熱死菌体を BMMC に添加することにより、本作用を示す腸内細菌を特定した。

以上、本研究により、マスト細胞が脂肪細胞の分化・成熟に対して正負両方向の作用を示すことが明らかになった。すなわち、マスト細胞は、産生する液性因子を介して脂肪細胞の分化・成熟を抑制する一方で、細胞間の物理的接触を介して脂肪細胞の分化・成熟を促進することが示された。したがって、マスト細胞が脂肪蓄積の制御という新たな生理的役割を担うことが示唆された。さらに、腸内細菌によりマスト細胞の表現型が変化することが示され、食事や腸内細菌叢への介入によるマスト細胞の機能制御を介した新たな戦略により、肥満の抑制や生活習慣病の予防に貢献できる可能性が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 高橋恭子	4. 巻 42
2. 論文標題 アレルギー疾患と腸内細菌叢	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 11-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋恭子	4. 巻 76
2. 論文標題 腸内細菌によるマスト細胞の制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 272-276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukatsu Sakino, Horinouchi Hikari, Nagata Shiho, Kamei Risa, Tanaka Daichi, Hong Wonki, Kazami Yui, Fujimori Minami, Itoh Kikuji, Momose Yoshika, Kasakura Kazumi, Hosono Akira, Kaminogawa Shuichi, Hanazawa Shigemasa, Nakanishi Yusuke, Takahashi Kyoko	4. 巻 226
2. 論文標題 Post-translational suppression of the high affinity IgE receptor expression on mast cells by an intestinal bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 152056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imbio.2021.152056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋恭子
2. 発表標題 腸管上皮における炎症反応およびバリア機能の制御における腸内細菌の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡庭寛昂、池上美音、宮下采佳、大槻崇、松藤寛、長田和実、中西祐輔、高橋恭子
2. 発表標題 酪酸が腸管上皮バリアへ与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡庭寛昂、池上美音、宮下采佳、高橋恭子
2. 発表標題 酪酸による腸管上皮バリアの増強効果
3. 学会等名 日本食品免疫学会第18回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 祖父江春菜、高橋恭子
2. 発表標題 マスト細胞が産生する因子を介した脂肪細胞の分化・成熟の抑制
3. 学会等名 日本食品免疫学会第17回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 祖父江 春菜、高野 真衣、細萱 侑作、中西 祐輔、高橋 恭子
2. 発表標題 脂肪細胞の分化・成熟を抑制するマスト細胞由来因子の特性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中西 祐輔  (NAKANISHI Yusuke)  (20579411)	日本大学・生物資源科学部・講師   (32665)	
研究 分担者	細野 朗  (HOSONO Akira)  (70328706)	日本大学・生物資源科学部・教授   (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------