

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591470

研究課題名(和文)オートファジー関連蛋白質の新規機能をターゲットとしたマスト細胞の機能制御の試み

研究課題名(英文) Trial in the regulation of mast cell function by targeting autophagy related protein

研究代表者

牛尾 博子 (USHIO, HIROKO)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30317391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞や個体が栄養飢餓に曝された際に誘導されるストレス応答の一種であると考えられてきたが、我々はアレルギーや自然免疫応答に重要な細胞であるマスト細胞において、オートファジーが恒常的に何らかの働きをしていることを見出してきた。すでに明らかにしているオートファジーの誘導に必須な遺伝子 Atg7に加えて、その他のオートファジー関連遺伝子として、Atg9bやGamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor-associated protein-like 1(GABARAPL1)についてもマスト細胞の脱顆粒や顆粒形成に重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is the essential function for controlling various biological responses including starvation, homeostatic turnover of long-lived proteins, and invasion of bacteria. However, a role for autophagy in the development and function of mast cells is largely unknown. We recently have reported that autophagy-related gene (Atg) 7, a critical enzyme for autophagosome formation, has relevance of mast cell functions using bone marrow-derived mast cells (BMDCs) from Atg7-deficient mice. To define further the roles for autophagy in mast cell function, we analyzed the changes of Atgs in mast cells after IgE-mediated activation using PCR-array. We found further that Atg9b, Gamma-aminobutyric acid A receptor-associated protein-like 1 (GABARAPL1), a homolog of Atg8, were also associated in the degranulation and regranulation of mast cells. Collectively, these results may lead to help modifying the mast cell function by targeting these proteins.

研究分野：アレルギー

キーワード：マスト細胞 オートファジー 顆粒形成

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、リソゾームにおける細胞内自己タンパク質の自食作用の総称である。酵母から哺乳類まで種を超えて広く保存され、細胞や個体が栄養飢餓に曝された際に誘導される細胞のストレス応答の一種であると考えられてきた。しかしながら、近年、オートファジー関連遺伝子を欠損した動物の作製と解析により、栄養が十分な状態でも、オートファジー機能の障害により慢性肝炎や神経性疾患が発症することが明らかにされ、オートファジーが栄養状態に関係なく積極的に細胞内タンパク質の分解を通して生体の恒常性の維持に関与することが示唆されている。また、単なる細胞内タンパク質の代謝のみならず、微生物に対する防御、抗原提示、メラニン細胞の顆粒であるメラノソームの形成など、特定の細胞の高次機能にも関与することが明らかにされつつある。さらにこれらの細胞の高次機能では、従来のオートファジーとは異なる形でオートファジーのマシーナリーが使われていることも明らかにされつつある。

我々は、アレルギーにおいて中心的役割を果たすマスト細胞において、栄養状態に関係なく恒常的にオートファジーが誘導されていることを見出した。とくにマスト細胞の顆粒に一致してオートファゴソーム膜の構成成分が局在することから、オートファジーがマスト細胞の顆粒の形成・分泌・代謝に重要な役割を果たしていると考えた。すでに、オートファゴソームを形成できない(オートファジー関連遺伝子の一部を欠損した)マスト細胞は、細胞内顆粒成分が少ないこと、またその分泌に障害があることを報告している。しか

しながら、オートファジーの機能がどのようにマスト細胞の顆粒の形成や放出に関わるかの詳細については未だ不明の点が多い状態である。

2. 研究の目的

我々は、アレルギー反応や自然免疫応答に重要な役割を果たすマスト細胞で、栄養状態に関係なく恒常的にオートファジーが誘導されていることを見いだした。とくにマスト細胞の顆粒と一致したオートファゴソームの局在がみられることから、マスト細胞の顆粒形成や代謝に重要な役割を果たすことが推測された。しかしながら、マスト細胞の機能に重要な役割を果たす顆粒形成のメカニズムについてはオートファジー機能に限らず、不明な点が多い。それらを明らかにし、制御することができればアレルギー治療に結びつくのではないかと考えた。そこで本研究では、とくにマスト細胞の形態(顆粒の形成や顆粒成分の貯留)や機能に特化したオートファジーの役割(あるいはオートファジーのマシーナリーを使った新たな機能)の解明を通じて、アレルギー疾患の中心的役割を演じるマスト細胞を制御する新たな手法を見出し、アレルギー疾患の治療に役立つ知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

主にマウスの骨髄由来マスト細胞を用い、マスト細胞の顆粒の形成と放出におけるオートファジー関連蛋白質をさまざまな遺伝的手法を用いて欠損させることにより、それらの蛋白質の機能を解明し、それらを標的としたマスト細胞の機能制御を試みる。

(1) 骨髄由来マスト細胞が分化する過程、あるいは脱顆粒刺激によって発現に変化のみられるオートファジー関連遺伝子を分子生物学的手法を用いて網羅的に調べる。

(2) 遺伝子操作を用いて、特定のオートファジー関連蛋白質を欠損した骨髄由来培養マスト細胞を作成し、その顆粒形成と放出に関する解析を行う。

(3) 顆粒形成に遺伝的に異常のあるマウス (C57BL6-beige/beige、-mi/mi、gm/gm、C3H/HeSn-ash/ash)由来のマスト細胞におけるオートファジー関連蛋白質の発現や欠損による影響の解析を行う。

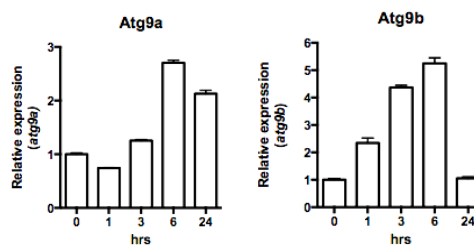
(4) オートファジー関連蛋白質の発現制御を行うことにより、生体内でのマスト細胞の機能を制御する試みを行う。特定のオートファジー関連蛋白質を欠損したマスト細胞をマスト細胞欠損マウスに戻して、in vivo のアレルギー反応を検討する。

4. 研究成果

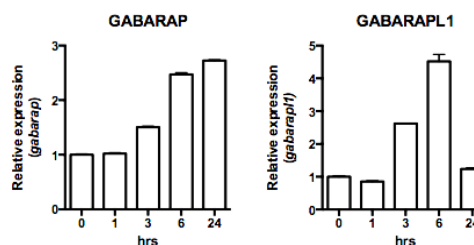
(1) マスト細胞を分化誘導する過程あるいはマスト細胞を脱顆粒させるなどの刺激を与えた際に発現変化のみられるオートファジー関連遺伝子について網羅的に調べたところ、他の顆粒保有細胞であるメラニン細胞や腸管の分泌細胞ですでに明らかになっているオートファジー関連遺伝子に加えて、新たなオートファジー関連遺伝子の変化を見出した。

(2) (1) で新たに明らかになったオートファジー関連遺伝子の変化を、マスト細胞の分化の過程や脱顆粒の刺激後に定量的 PCR を用いて確認することができた。

【マスト細胞を IgE 抗体と抗原で刺激した後、1、3、6、24 時間後に Autophagy related gene (Atg) 9a、Atg9b の発現を定量的 PCR で観察したもの】



【マスト細胞を IgE 抗体と抗原で刺激した後、1、3、6、24 時間後に gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein (GABARAP)、gabarap-like1 (GABARAPL1) の発現を定量的 PCR で観察したもの】



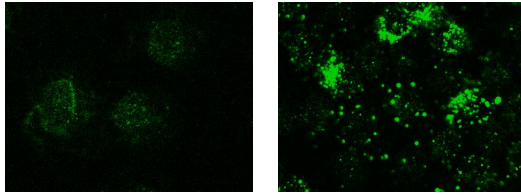
脱顆粒刺激後 3 時間からいずれの遺伝子の発現も上昇していることが確認できた。

(3) 先のメラニン細胞や腸管の分泌細胞で明らかになっていたオートファジー関連遺伝子を遺伝子操作法により欠損させた結果、マスト細胞の形態、顆粒形成や放出に著しい異常は見出せなかった。

(4) 新たに明らかにしたオートファジー関連蛋白質の局在を、免疫学的手法を用いて検討したところ、マスト細胞の顆粒上に存在することを確認した。

(5) またこれらの蛋白質の発現はマスト細胞に脱顆粒の刺激を加えた際に変化することが明らかとなった。

【無刺激のマスト細胞 (左) と IgE 抗体と抗原で脱顆粒刺激後 (右) のマスト細胞上のオートファゴソームを蛍光抗体で染めてその局在を観察したもの】



脱顆粒刺激後にオートファゴゾームの形成を示す蛍光強度が上がっているのがわかる。

(6)(2)で明らかにしたオートファジー関連遺伝子の欠損がマスト細胞の分化に与える影響を調べた結果、マスト細胞の分化途中に混在する他の細胞にもこれらのオートファジー関連蛋白質の発現がみられたことから解析が困難であった。

(7)(1)で明らかになったオートファジー関連遺伝子がマスト細胞の顆粒の貯留に与える影響を調べたところ、いくつかの遺伝子の欠損で、マスト細胞を脱顆粒させた後の顆粒の再貯留だけでなく脱顆粒能にも影響を与えることを見出した。

(8)今後これらのオートファジー関連遺伝子の欠損が、生体内のマスト細胞の分化や機能に与える影響について検討していく予定である。

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)

- (1) Tsutsui-Takeuchi M, Ushio H, Fukuda M, Yamada T, Niyonsaba F, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S. Roles of retinoic acid-inducible gene-1-like receptors (RLRs), Toll-like receptor (TLR) 3 and 2'-5' oligoadenylate synthetase as viral recognition receptors on human mast cells in response to viral infection. 査読有 Immunol Res. 2015; 61:240-249. doi:

10.1007/s12026-014-8617-x.

- (2) Fukuda M, Ushio H, Kawasaki J, Niyonsaba F, Takeuchi M, Baba T, Hiramatsu T, Okumura K, Ogawa H. The expression and functional characterization of RIG-I-like receptors (RLRs) of mast cells in response to viral infection. 査読有 J Innate Immunity. 2013;5:163-173. doi: 10.1159/000343895.

[学会発表](計3件)

- (1) YAMADA T, USHIO H, NIYONSABA F, OKUMURA K, IKEDA S, OGAWA H. Roles of autophagy in degranulation and regranulation of mast cells. 第39回日本研究皮膚科学会「ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)」2014年12月12-14日

- (2) 竹内瑞穂、牛尾博子、福田稔、河崎純子、François Niyonsaba、小川秀興、奥村康、池田志孝 ヒトマスト細胞におけるRIG-I様受容体(RLRs)を介した抗ウイルス免疫応答、第113回日本皮膚科学会「国立京都国際会館(京都府・京都市)」2014年5月30-6月1日

- (3) Takeuchi M, Fukuda M, Ushio H, Kawasaki J, Niyonsaba F, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H. Characterization of virus recognition receptors: RIG-1-like receptors (RLRs) of mast cells. 2013 International Investigative Dermatology 「Edinburgh International Conference Center (Edinburgh, Scotland)」2013年5月8日-5月11日

[その他]

ホームページ等

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/lab0>

ratory/labo/atopy_center

6 . 研究組織

(1)研究代表者

牛尾 博子 (USHIO,Hi roko)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30317391