

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 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：24591667

研究課題名(和文) アレルギー炎症性疾患の病態形成に寄与するマスト細胞機能とNotchシグナルの役割

研究課題名(英文) Contribution of mast cell functions to the pathogenesis of allergic inflammatory diseases and role of Notch signaling in regulating mast cell functions

研究代表者

中野 信浩 (Nakano, Nobuhiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30420839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞が作るサイトカインはアレルギー炎症性疾患の病態形成・増悪化において重要な役割を果たしている。本研究では、マスト細胞によるTh2サイトカイン及び炎症性サイトカインの産生が、細胞表面に発現するNotchレセプターを介したシグナルによって直接的及び間接的に増強される分子メカニズムを解明した。また、粘膜型マスト細胞の細胞成熟にNotchシグナルが寄与している可能性を示し、その分子メカニズムの解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Cytokines produced by mast cells play an important role in the pathogenesis and exacerbation of allergic inflammatory diseases. This study revealed that signaling through cell surface Notch receptors enhances the production of Th2 and inflammatory cytokines by mast cells through direct and indirect mechanisms. Furthermore, results from this study suggest that Notch signaling contributes to the maturation of mucosal-type mast cells, and thus I have analyzed the molecular mechanisms of Notch-induced mast cell maturation.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー マスト細胞 Notchシグナル サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎、喘息、食物アレルギー等のアレルギー炎症性疾患では、マスト細胞が急性期の炎症反応における主要なエフェクター細胞として働いていることはよく知られている。活性化したマスト細胞は様々なサイトカインを産生するが、最近の研究から、マスト細胞が産生する特に Th2 サイトカインや炎症性サイトカインはアレルギー疾患の病態形成、増悪・遷延化にも重要な役割を果たしていることが明らかにされている。ところで、全てのマスト細胞が同じ種類の Th2 サイトカインや炎症性サイトカインを産生するわけではなく、所属する組織やその組織の状態によって産生されるサイトカインの種類や量が異なる。また、マスト細胞の形態や刺激に対する反応性、顆粒中に含まれるプロテアーゼの種類等も所属する組織によって異なることも知られる。マスト細胞は骨髄で前駆細胞まで分化した後、末梢組織に移行して成熟しその組織に定着することから、これらの違いは周囲の微小環境因子の影響を受けた結果であると推測される。しかしながら、どのような微小環境因子がマスト細胞の形態や機能を調節しているかについてほとんど知られておらず、その分子的なメカニズムも不明である。マスト細胞機能を調節する微小環境因子を同定しその作用メカニズムを解明することは、アレルギー炎症性疾患の病態形成と増悪化のメカニズムを理解する上で重要であり、それらの知見はより効果的な治療法の開発に有用であると考えられる。

これまでの研究から、本研究者らはマスト細胞表面に発現する Notch レセプターと周囲の組織に発現する Notch リガンドがマスト細胞の分化・成熟及びサイトカイン産生機能を調節する微小環境因子の一つであることを示唆する結果を得たことから、本研究課題においてそれらの分子的なメカニズムを解明することを試みた。

2. 研究の目的

(1) Notch シグナルがマスト細胞のサイトカイン産生を調節する分子的メカニズムを明らかにする。

(2) Notch シグナルがマスト細胞の分化・成熟に与える影響を明らかにし、その分子的メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞の調製

BALB/c, C57BL/6, *Il4*-HS2^{-/-} または *Il4*-CNS2^{-/-} マウスの骨髄から採取した骨髄細胞を interleukin (IL)-3 及び stem cell factor (SCF) 存在下で 3~4 週間培養することで得られる骨髄由来培養マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell, BMMC) を使用

した。

(2) Notch リガンド存在下での BMMC の培養
BMMC を Notch リガンド強制発現 CHO 細胞株と 6 日間共培養させた後、磁気標識ビーズを用いてマスト細胞のみを分取し、各種解析に使用した。なお、Notch リガンド強制発現 CHO 細胞株は筑波大学血液内科・千葉滋 教授より供与された。

(3) レトロウイルスベクターを用いた BMMC への遺伝子導入
レトロウイルスベクター-pMXs-puro に Notch1 または Notch2 の細胞内ドメインをコードする cDNA を組み込み、パッケージング細胞株 PLAT-E を用いて作製したレトロウイルスを BMMC に感染させ、puromycin によるセレクションを経て、Notch1 または Notch2 の細胞内ドメインを安定的に発現するマスト細胞を得た。pMXs-puro ベクター及び PLAT-E 細胞株は東京大学医科学研究所・北村俊雄 教授より供与されたものを使用した。また、本実験は順天堂大学組換え DNA 安全委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) Notch シグナルがマスト細胞のサイトカイン産生を増強させるメカニズムの解明

Notch シグナルはマスト細胞のサイトカイン産生を増強させる

IgE を感作した BMMC に抗 IgE 抗体を添加すると、高親和性 IgE レセプター FcεRI が架橋されて細胞が活性化し、脱顆粒、サイトカイン産生が誘導される。これらの反応は、I 型アレルギーにおけるエフェクターフェーズの反応を *in vitro* 環境下で再現したものである。本実験では BALB/c マウスの骨髄細胞から作製した BMMC を使用した。Notch リガンド存在下で培養された BMMC では FcεRI 架橋刺激に伴う Th2 サイトカイン IL-4, IL-6, IL-13 及び炎症性サイトカイン TNF-α の産生量がコントロール細胞に比ベ顕著に増加した (図 1)。

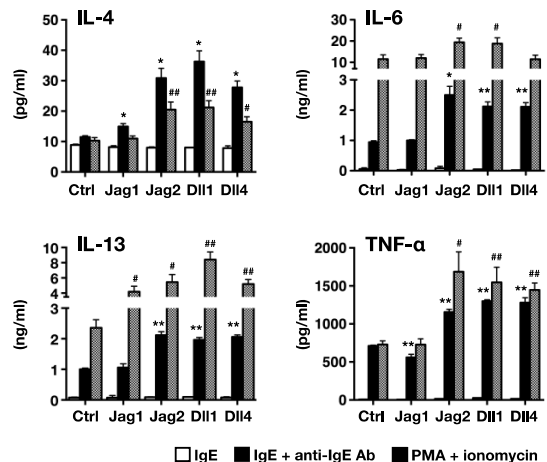


図 1. Notch リガンド存在下で培養されたマスト細胞のサイトカイン産生能(発表論文(1)より引用改変)

4 種の Notch リガンドのうち Jag2, Dll1, Dll4 存在下で培養された BMMC において、FcεRI 架橋刺激またはカルシウムイオノフォア刺激に伴うサイトカイン産生がコントロールに比べ有意に増強された。

Notch シグナルは SHIP-1 発現を低下させることで MAP キナーゼの活性化を増強する

Notch リガンド存在下で培養された BMMC では、サイトカイン産生に重要なシグナル伝達分子MAPキナーゼ JNK 及び p38 の FcεRI 架橋刺激によって誘導される活性化の度合いが亢進していた。この MAP キナーゼの活性化亢進は、FcεRI シグナルのネガティブレギュレーター-SHIP-1 の発現が Notch シグナルによって低下したことが一因であることを示した (図 2)。

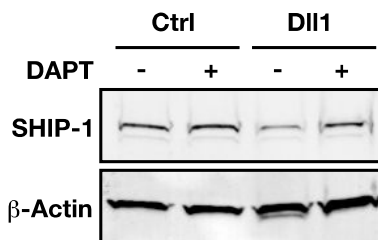


図 2. Notch リガンド存在下で培養された BMMC における SHIP-1 発現 (発表論文(1)より引用改変)

Notch リガンド Dll1 存在下で 6 日間培養された BMMC では FcεRI シグナルのネガティブレギュレーター-SHIP-1 の発現が低下していた。Notch シグナル阻害剤 DAPT 存在下では SHIP-1 発現低下が見られないことから、Notch シグナル依存的な低下であることが示された。

Notch2 を介したシグナルが SHIP-1 発現低下及び IL-6, IL-13, TNF-α の産生増強に関与している

BMMC は 2 種類の Notch レセプター Notch1 と Notch2 を恒常的に発現しているが、Notch2 を介したシグナルが SHIP-1 の発現低下及び IL-6, IL-13, TNF-α の産生増強に寄与していることを、Notch1 または Notch2 特異的 shRNA を用いたノックダウンにより明らかにした。

次に、Notch1 または Notch2 細胞内ドメインを強制発現させた BMMC を作製し、FcεRI を架橋刺激したときのサイトカイン産生を検討した。Notch2 細胞内ドメイン強制発現 BMMC では SHIP-1 発現が低下しており、ノックダウン実験から推測された結果と一致していた。また、IL-4 の産生は Notch1 と Notch2 どちらのシグナルによっても増強さ

れていたことから、他のサイトカインの産生増強と異なるメカニズムが関与していることが推察された。

Notch シグナルは *Il4* 遺伝子 CNS2 領域を介して IL-4 の産生を増強する

Il4 遺伝子には細胞特異的にその発現を調節するエンハンサー領域が存在することが知られており、Th2 細胞における研究から Notch シグナルに応答する配列を持つ CNS2 と呼ばれる領域が Th2 細胞の IL-4 産生に重要であることが示されている。そこで、東京理科大学生命医科学研究所・教授及び理化学研究所理研統合生命医科学研究センター・チームリーダー 久保允人先生より供与された CNS2 領域欠損マウスから作製した BMMC を用いて実験を行い、Notch シグナルが *Il4* 遺伝子の CNS2 領域を介してマスト細胞の IL-4 産生を増強させることを明らかにした (図 3)。

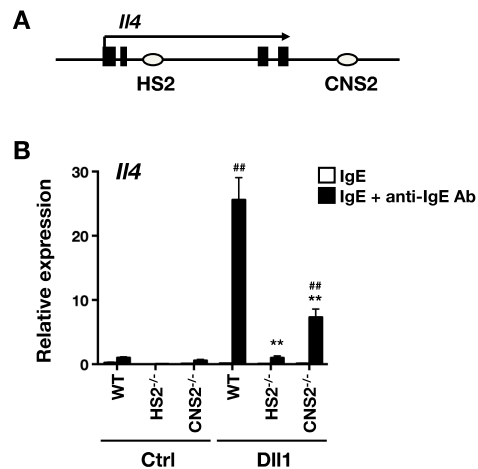


図 3. Notch シグナルによる *Il4* 発現増強に関与する遺伝子領域 (発表論文(1)より引用改変)

A. マウス *Il4* 遺伝子のエンハンサー領域。B. HS2 または CNS2 領域欠損マウスから作製した BMMC を Notch リガンド Dll1 存在下で培養した後、FcεRI を架橋刺激して *Il4* 遺伝子発現を測定した。HS2 は *Il4* 発現に必須の領域であることが知られているので、ネガティブコントロールとして使用した。CNS2 欠損 BMMC では野生型 (WT) BMMC に比べ *Il4* 発現増強の程度が有意に低下した。

以上の結果から、Notch2 を介したシグナルが SHIP-1 発現を低下させることでサイトカイン産生全体を底上げする間接的経路と、Notch1 及び Notch2 シグナルが *Il4* 遺伝子 CNS2 領域を介して IL-4 産生を直接的に増強する経路によってマスト細胞のサイトカイン産生が増強されることが示された。

(2) Notch シグナルによる粘膜型マスト細胞の成熟促進

マウスマスト細胞は形態、顆粒中に含まれ

るプロテアーゼの組成、刺激に対する反応性等の違いから結合組織型と粘膜型の2種類のサブタイプに分けることができる。腸管粘膜や気道粘膜に存在する粘膜型マスト細胞は、顆粒中に mouse mast cell protease (mMCP)-1, mMCP-2 を含み、細胞表面に CD103 分子を発現する。また結合組織型マスト細胞に比べ粘膜型マスト細胞ではヒスタミン含有量が少ないことが知られている。どちらのサブタイプも造血幹細胞に由来する細胞であるが、骨髄において共通の前駆細胞にまで分化した後、末梢組織に移行してその組織にマッチしたサブタイプに成熟する。これは、例えば粘膜組織には粘膜型マスト細胞への成熟を促す因子が存在していることを示している。

本研究において、Notch リガンド存在下で培養されたマスト細胞はマスト細胞マーカー分子 c-Kit, FcεRI 発現が促進されることに加え、粘膜型マスト細胞マーカー分子 mMCP-1, mMCP-2, CD103 の発現も誘導されることを見出した。また、ヒスタミン含有量の低下も認められたことから、Notch シグナルは粘膜型マスト細胞への成熟を促進させていると考えられる。この Notch シグナルによる粘膜型マスト細胞の成熟促進は IL-3 存在下においてのみ認められ、IL-3 レセプターシグナルの伝達に重要な転写因子 STAT-5 のノックダウンにより成熟促進効果が消失したことから、Notch シグナルは IL-3 レセプター/STAT-5 シグナル伝達経路と協調して機能していることが示された。

以上のことから、Notch シグナルは *in vitro* 環境下で粘膜型マスト細胞の分化を強く促進すること、及びそのメカニズムが明らかになった。

(3) 本研究課題により得られた研究成果の意義と今後の展開

マスト細胞が産生する Th2 サイトカインや炎症性サイトカインはアレルギー炎症性疾患の病態形成に重要な役割を果たしている。本研究により、マスト細胞のサイトカイン産生能力が微小環境に存在する Notch リガンドによって調節されることを初めて明らかにした。また、その分子メカニズムも解明された。マスト細胞が産生する IL-4 はアレルギー疾患の増悪に不可欠のサイトカインであるが、*in vitro* 環境下ではあまり産生しない。生体内においてマスト細胞が IL-4 を多く産生するメカニズムが示されたことは、アレルギー疾患の増悪化や遷延化を研究する上で重要であると考えている。

また、Notch シグナルは粘膜型マスト細胞の分化・成熟の促進に寄与していることも見出した。粘膜型マスト細胞は粘膜組織で起こるアレルギー炎症性疾患（食物アレルギー、喘息、アレルギー性鼻炎等）において中心的な役割を担っていることから、Notch がこれらアレルギー炎症性疾患の治療ターゲット

になりうることを示唆された。

今後は、マスト細胞に発現する Notch がどのアレルギー炎症性疾患にどの程度寄与しているのかを個体レベルで検証する必要がある。現在進行中のアレルギーマウスモデルを用いた解析により、アレルギー炎症性疾患の病態形成に関わる新規の知見やより効果的な治療法開発に寄与する情報が得られることを期待している。

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5件)

- (1) Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, Hara M, Motomura Y, Kubo M, Okumura K, Ogawa H. Notch Signaling Enhances FcεRI-Mediated Cytokine Production by Mast Cells through Direct and Indirect Mechanisms. *J Immunol.* 2015, 194:4535-44. doi: 10.4049/jimmunol.1301850. (査読有)
- (2) Inage E, Kasakura K, Yashiro T, Suzuki R, Baba Y, Nakano N, Hara M, Tanabe A, Oboki K, Matsumoto K, Saito H, Niyonsaba F, Ohtsuka Y, Ogawa H, Okumura K, Shimizu T, Nishiyama C. Critical Roles for PU.1, GATA1, and GATA2 in the expression of human FcεRI on mast cells: PU.1 and GATA1 transactivate FCER1A, and GATA2 transactivates FCER1A and MS4A2. *J Immunol.* 2014, 192:3936-46. doi: 10.4049/jimmunol.1302366. (査読有)
- (3) Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Hara M, Ikegami T, Tahara Y, Katoh R, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nishiyama C, Nakao A. Circadian regulation of allergic reactions by the mast cell clock in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2014, 133:568-75. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.040. (査読有)
- (4) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012, 44:1222-6. doi:10.1038/ng.2438.

(査読有)

- (5) Kamijo M, Nishiyama C, Takagi A, Nakano N, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Cyclooxygenase-2 inhibition restores ultraviolet B-induced downregulation of ATP2A2/SERCA2 in keratinocytes: possible therapeutic approach of cyclooxygenase-2 inhibition for treatment of Darier disease. *Br J Dermatol.* 2012, 166:1017-22. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10789.x. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 中野信浩 . TGF- β によるマスト細胞機能の抑制を仲介する転写因子 Ehf の機能解析 . 日本農芸化学会 2015 年度大会 . 2015 年 3 月 27 日 . 岡山県・岡山市
- (2) 中野信浩 . Maturation of mucosal mast cells is promoted by Notch signaling . 日本研究皮膚科学会 第 39 回年次学術大会・総会 . 2014 年 12 月 12 日 . 大阪府・吹田市
- (3) 中野信浩 . 粘膜型マスト細胞分化における Notch シグナルと IL-3 シグナルの協調作用 . 日本農芸化学会 2014 年度大会 . 2014 年 3 月 30 日 . 神奈川県・川崎市
- (4) 中野信浩 . Notch シグナルは IL-3 存在下において粘膜型マスト細胞の分化を促進する . 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . 2013 年 11 月 28 日 . 東京都・千代田区
- (5) 中野信浩 . Notch1 signaling confers antigen-presenting functions on mast cells . 15th International Congress of Immunology – ICI 2013 . 2013 年 8 月 23 日 . ミラノ (イタリア)
- (6) 中野信浩 . Notch signaling augments mast cell cytokine production by direct and indirect mechanisms . 日本研究皮膚科学会 第 37 回年次学術大会・総会 . 2012 年 12 月 8 日 . 沖縄県・那覇市
- (7) 中野信浩 . Notch シグナルによって成熟が誘導された粘膜型マスト細胞の形質と機能 . 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . 2012 年 11 月 29 日 . 大阪府・大阪市

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/atopy_center/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中野 信浩 (NAKANO, Nobuhiro)
順天堂大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 3 0 4 2 0 8 3 9