

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659217

研究課題名(和文) マスト細胞サブセットの分化を規定する因子の同定

研究課題名(英文) Factors for the decision of mast cell subset function

研究代表者

國澤 純 (Jun, Kunisawa)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：80376615

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)：本研究においては、独自に樹立した細胞外ATP受容体の一つであるP2X7に特異的な抗体を用いマスト細胞サブセットの解析を行った。その結果、腸管のマスト細胞上にP2X7が高レベルで発現し、炎症性腸疾患の発症経路の一つになっていることを見いだした。さらに腸管以外の組織との比較を行った研究から、P2X7の発現制御因子の一つであるレチノイン酸を繊維芽細胞が分解することにより皮膚のマスト細胞はP2X7の発現が低いこと、本経路が破綻することによりマスト細胞のP2X7を介した皮膚炎の発症につながる事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the immunological function of mast cell subset using P2X7-specific antibody. We found that colonic mast cells spontaneously expressed high levels of P2X7, which played a critical role in the initiation and exacerbation of intestinal inflammation. In contrast, skin mast cells barely expressed P2X7, which was mediated by retinoic acid metabolism in skin fibroblast. We further found that disruption of the retinoic acid metabolism led to the development of skin inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー・ぜんそく 免疫学 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

現在、アレルギー疾患の患者数は爆発的に増加しており、その発症メカニズムの解明や予防・治療法の開発に関する研究が世界各地で進められている。研究代表者は食物アレルギーモデルを用い、腸管組織におけるアレルギー疾患に関する研究を進めている。これまでの研究から得られた結果から、病態性細胞、特にマスト細胞の遊走や機能に注目するようになった。例えば研究代表者が腸管免疫での細胞遊走に重要であることを見いだしているスフィンゴシン1リン酸(S1P)(J Exp Med, 2007; Blood, 2007 & 2008; J Immunol, 2008)の経路を遮断したマウスではマスト細胞の大腸への浸潤が抑制されることでアレルギー性下痢の発症が抑制される(J Immunol, 2007)。

一方で様々な病態・感染モデルを用いた当時の研究から、アレルギー発症における主要エフェクター細胞であるマスト細胞はアレルギー反応以外の多彩な免疫反応にも関わる様々なサブセットが存在することが示唆されている。しかしながらマスト細胞サブセットを簡便に識別するシステムは存在しておらず、その機能や分化に関する解析が困難であった。このような背景のもと、研究代表者はマスト細胞サブセットを識別できる抗体の作製を試み、現在までに約30種類のモノクローナル抗体の樹立に成功していた。

期間内に明らかにすること

本研究では、研究代表者が自ら樹立したマスト細胞サブセットを識別できると期待される抗体をツールに用い、マスト細胞サブセットの存在とその特異性を規定するメカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

研究代表者が独自に樹立したマスト細胞サブセットを識別できると予想される抗体ライブラリをツールとして用い、粘膜型マスト細胞を中心とするマスト細胞の組織特異性とサブセットの決定機構を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

マスト細胞特異的抗体の認識分子は、質量分析を用いたプロテオミクス解析により行った。培養系を用いたマスト細胞の解析には骨髄細胞をStem cell factorとIL-3で刺激することで誘導した骨髄由来マスト細胞を用いた。炎症性腸疾患モデルにはTNBS投与モデルを用いた。皮膚繊維芽細胞に特異的に発現する遺伝子の同定については、大腸ストローマ細胞をコントロールとして用いたマイクロアレイ解析により行った。

4. 研究成果

本研究においては、これまでに研究代表者が独自に樹立したマスト細胞特異的抗体ラ

イブラリを駆使したマスト細胞サブセットの解析を進めた。初年度の研究から、腸管のマスト細胞上に細胞外ATP受容体の一つであるP2X7が高レベルで発現していることを見いだした。またP2X7を阻害する1F11抗体で処理することでマスト細胞のATP依存的な活性化が抑制出来ること、炎症性腸疾患モデルにおいて治療効果が得られることを明らかにした。

そこで二年次においては1F11抗体をプローブとして用い、腸管以外の各組織に存在するマスト細胞上のP2X7の発現を比較した。その結果、腸管マスト細胞に比べ、皮膚マスト細胞はP2X7の発現が低いことが判明した。またこの細胞表面でのP2X7の発現レベルは遺伝子レベルでの発現量と相関していたことから、転写レベルで発現制御が行われていることが示された。さらに細胞外ATPに対する反応もP2X7の発現レベルに相関し、皮膚マスト細胞は細胞外ATPへの反応性がほとんど認められなかった。

そこで腸管と皮膚のマスト細胞のP2X7発現制御メカニズムの解明を進めた。その結果、皮膚マスト細胞上のP2X7は、細胞が内在的に有しているメカニズムにより発現低下しているのではなく、皮膚環境の関与により変化していることが判明した。さらにその機能は皮膚の繊維芽細胞により担われていること、またその制御を行う上で重要な因子としてレチノイン酸分解酵素であるCyp26b1を同定した。これらの知見を発展させた研究から、レチノイン酸はマスト細胞上のP2X7を誘導する因子であり、皮膚においては繊維芽細胞がその分解を担うことで、P2X7の発現が抑制されることが判明した。これらレチノイン酸、ATP、P2X7、マスト細胞を介した恒常性維持が破綻することにより、皮膚炎の発症につながることも明らかにした。

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7件)

- 1 Y. Kurashima, H. Kiyono, and J. Kunisawa*, Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation, *Mediators of Inflammation* 査読有 (2015, in press)
- 2 Y. Kurashima, T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, J. Kunisawa*, and H. Kiyono, The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis, *Immunity* 査読有 40: 530-41, 2014 (doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.014)
- 3 A. Lamichhane, H. Kiyono, and J.

- Kunisawa*, Nutritional components regulate the gut immune system and its association with intestinal immune disease development, *J Gastroenterol Hepatol* 査読有 28: 18-24, 2013 (doi: 10.1111/jgh.12259)
- 4 T. Obata, N. Shibata, Y. Goto, I. Ishikawa, S. Sato, J. Kunisawa*, and H. Kiyono, Critical role of dendritic cells in T-cell retention in the interfollicular region of Peyer's patches, *J Immunol* 査読有 191:942-8,2013(doi:10.4049/jimmunol.1200636)
 - 5 J. Kunisawa*, M. Gohda, E. Hashimoto, I. Ishikawa, M. Higuchi, Y. Suzuki, Y. Goto, C. Panea, I. I. Ivanov, R. Sumiya, L. Aayam, T. Wake, S. Tajiri, Y. Kurashima, S. Shikata, S. Akira, K. Takeda, and H. Kiyono, Microbe-dependent CD11b⁺ IgA⁺ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice, *Nat Commun* 査読有 4: 1772, 2013 (doi: 10.1038/ncomms2718)
 - 6 Y. Kurashima, T. Amiya, T. Nochi, K. Fujisawa, T. Haraguchi, H. Iba, H. Tsutsui, S. Sato, S. Nakajima, H. Iijima, M. Kubo, J. Kunisawa*, and H. Kiyono, Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors, *Nat Commun* 査読有 3: 1034, 2012 (doi: 10.1038/ncomms2023)
 - 7 J. Kunisawa* and H. Kiyono, Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the intestine. *Nutrients* 査読有 4: 154-166, 2012 (doi: 10.3390/nu4030154)
- [学会発表](計 18 件)
- 1 國澤純、脂質 免疫ネットワークを起点にした免疫疾患の解明と創薬研究への展開 第 87 回 日本生化学会 京都(国立京都国際会館)(2014 年 10 月 16 日)
 - 2 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 日本生薬学会第 61 回年会 福岡(福岡大学)(2014 年 9 月 13 日)
 - 3 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の解明と創薬・ワクチン開発への展開 第 18 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 京都(同志社大学寒梅館)(2014 年 7 月 15 日)
 - 4 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 第 65 回 日本東洋医学会学術総会 東京(東京国際フォーラム)(2014 年 6 月 28 日)
 - 5 Jun Kunisawa Commensal Bacteria and Diet in the Control of Intestinal Immunosurveillance and Diseases 18th Annual Meeting of Intestinal Microbiology (University of Tokyo, Tokyo, 12 June, 2014)
 - 6 國澤純、腸内環境ネットワークを介した免疫制御とヘルスサイエンス 第 14 回 日本抗加齢医学会総会 大阪(大阪国際会議場)(2014 年 6 月 6 日)
 - 7 國澤純、腸管免疫ネットワークにおける脂質代謝 腸内細菌脂質代謝研究会 京都(京都大学益川ホール)(2014 年 3 月 17 日)
 - 8 Jun Kunisawa Peyer's patch-mediated and microbe-dependent intestinal IgA responses for the development of oral vaccine Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013)
 - 9 Jun Kunisawa Functional diversity of IgA-producing plasma cells in the intestine The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology (POSTECH, Pohang, Korea, 3rd December, 2013)
 - 10 Jun Kunisawa Innate immune regulation in the control of intestinal allergy and inflammation 第 63 回日本アレルギー学会秋期学術大会 東京(ホテルニューオータニ)(2013 年 11 月 30 日)
 - 11 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御と疾患、創薬・ワクチンへの展開 第 9 回 重長類医科学フォーラム つくば(文部科学省研究交流センター)(2013 年 11 月 14 日)
 - 12 國澤純 腸内環境を介した免疫制御と炎症性腸疾患 第 34 回日本炎症・再生医学会 京都(国立京都国際会館)(2013 年 7 月 2 日)
 - 13 國澤純 腸管免疫における脂質ネットワークを標的とした創薬戦略 日本薬学会第 133 年会 横浜(パシフィコ横浜)(2013 年 3 月 30 日)
 - 14 國澤純 粘膜免疫のユニーク性と創薬への新展開 新適塾「未来創薬への誘い」第 21 回 大阪(千里ライフサイエンスセンター)(2013 年 1 月 25 日)
 - 15 Jun Kunisawa Lipids, vitamins, and nucleotides in the development and control of intestinal immune diseases Asia-Pacific Topic Conference, 東京(芝公園ホテル)(2012 年 11 月 3 日)
 - 16 Jun Kunisawa Lipids, vitamins, and nucleotides in the intestinal immunoregulation IEIIS2012 Satellite Symposium Infection, Inflammation, and Immunity, 東京(東京大学医科学研究所)(2012 年 10 月 12 日)
 - 17 國澤純 腸内メタボリック環境を介した腸管免疫制御と疾患 第 33 回日本肥満学会 京都(ホテルグランヴィア京都)(2012 年 10 月 12 日)
 - 18 國澤純 食品開発と創薬標的としての腸管免疫 京都大学 学際融合教育研究推進センター 生理化学研究ユニット第

2回シンポジウム、京都(京都大学) 2012
年 6 月 13 日)

[図書] (計 2 件)

- 1 國澤純 粘膜における免疫ホメオスタシス、標準免疫学(監修、谷口克; 編集、宮坂昌之、小安重夫) 医学書院、p197-205, 2013
- 2 國澤純 粘膜免疫 免疫学 update - 分子病態の解明と治療への展開 - (編集、審良静男、熊ノ郷淳、竹田 潔) 南山堂、107-116, 2012

[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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

http://www.nibio.go.jp/vaccine_material_project/index.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

國澤 純 (JUN, Kunisawa)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養
研究所・ワクチンマテリアルプロジェク
ト・プロジェクトリーダー
研究者番号 : 80376615

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号 :