

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670029

研究課題名(和文) 新たな創薬標的としての脳内マスト細胞

研究課題名(英文) Brain mast cells as a novel drug target

研究代表者

田中 智之 (Tanaka, Satoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40303846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管疾患や認知症の背景にある炎症応答のメカニズムを解明するために、本研究では脳内マスト細胞に着目した。マウスの脳内マスト細胞に特異的な遺伝子発現のパターンを明らかにし、活性化したマスト細胞において神経栄養因子であるNGFへの応答性が獲得される機序を明らかにした。さらにマスト細胞によるヒスタミン遊離を抑制する医薬品として知られるクロモグリク酸ナトリウムの標的分子を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We focused on brain mast cells to clarify how inflammatory responses promote cerebrovascular diseases and dementia. We revealed the gene expression profiles specific to murine brain mast cells and determined the mechanism by which activated mast cells acquire sensitivity to nerve growth factor. We, furthermore, identified the target molecule of disodium cromoglycate, which was found to suppress histamine release from activated mast cells.

研究分野：生物系薬学

キーワード：マスト細胞 遺伝子発現 クロモグリク酸ナトリウム 神経成長因子 TrkA

1. 研究開始当初の背景

我が国をはじめとする先進国では、高齢化社会の進展に伴い、脳血管疾患、あるいはアルツハイマー病に代表される認知症に注目が寄せられている。こうした疾患の発症機序を明らかにし、治療薬を開発することは喫緊の課題である。脳血管疾患の特徴として、炎症応答の亢進、神経血管単位(neurovascular unit)の機能の低下あるいは破綻をあげることができる(Lampron et al., *Neuron*, 2013)。血液脳関門(blood brain barrier, BBB)は脳内の恒常性維持に必須であるが、炎症応答による機能低下、あるいは破綻が知られている。こうした病態形成には種々の細胞種が関わるが、特にマスト細胞の機能については不明な点が数多く残されている。脳内のマスト細胞に関する知見はわずかであるが、末梢組織においてマスト細胞が血管周辺に分布し、血管透過性の亢進や、血管の収縮・弛緩の制御に重要な機能を果たしていることを考慮すると、脳内においても同様に神経血管単位の重要な制御因子となっている可能性は高い。実験的にもマスト細胞の活性化と BBB の破綻との関連が指摘されており(Beghdadi et al., *J. Exp. Med.*, 2008)、マスト細胞の脱顆粒応答を抑制する抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウムは、低酸素虚血状態における脳の傷害や、神経性の痛覚過敏を抑制することが報告されている(Jin et al., *Dev. Neurosci.*, 2007, Strbian et al., *Circulation*, 2007, Zuo et al., *Pain*, 2003, Levy et al., *Pain*, 2007)。代表者はこれまでに新たな骨髄由来培養マスト細胞モデルを開発し、組織特異的な成熟マスト細胞の機能を *in vitro* で検証することに成功している(Takano et al., *FEBS Lett.*, 2008, Takano et al., *Lab. Invest.*, 2009, Nakazawa et al., *Eur. J. Immunol.*, 2014)。そこで本研究では、代表者のマスト細胞研究の蓄積を活かして、脳内マスト細胞の性質を解明し、新たな治療薬開発のアプローチを見いだすことを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス脳内マスト細胞の性状を明らかにし、その活性化や機能を標的とした脳関連疾患治療薬の評価系となる培養系を確立することである。具体的には、マウス脳内のマスト細胞の遺伝子発現プロファイルの同定、および精製マスト細胞の解析を行う。その結果に基づき、脳内マスト細胞の機能、応答性を模倣する培養系を確立し、その活性化を阻害する低分子化合物の評価を実施する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現の網羅的解析

マウスの脳、胃(粘膜側、筋層側)の組織切片より、それぞれ一細胞単位でマスト細胞

を回収し、連携研究者の杉本幸彦教授(熊本大学)により開発されたマイクロアレイを用いる単一細胞レベルの発現遺伝子プロファイルの解析手法を適用した(Tsuchiya et al., *BMC Genomics*, 2009)。

(2) 培養マスト細胞モデル

Balb/c マウス(雄性、8週齢)の骨髄細胞を IL-3 (10 ng/ml)存在下、約1ヶ月間培養することにより、FcεRI、c-kit 両方を発現する均一な細胞集団を得た。これを未成熟なマスト細胞のモデル(BMMC)として用いた。

(3) ラット腹腔マスト細胞の精製

ラット腹腔細胞を回収し、Histodenz を用いた密度勾配遠心法によりマスト細胞を精製した。

(4) 神経栄養因子受容体の発現解析

BMMC を用いて、様々な培養条件下における神経栄養因子受容体遺伝子(*Ntrk1*, *Ntrk2*, *Ntrk3*, *Ngfr*, *Sort1*)の発現を定量 RT-PCR により解析した。

(5) 線維化応答の解析

BMMC とマウス線維芽細胞株 Swiss 3T3 との共培養における線維化応答について解析した。線維化の指標として α -平滑筋 actin (*Acta2*)、結合組織増殖因子(*Ctgf*)、osteopontin (*Spp1*)の遺伝子発現を定量 RT-PCR により解析した。

(6) G タンパク質共役型受容体の解析

青木淳賢教授(東北大学)により開発されたGタンパク質の活性化に伴うTGF- α の切断を利用したGタンパク質共役型受容体(GPCR)の評価系(Inoue et al., *Nat. Method*, 2012)を用いて、種々のGPCRに対するクロモグリク酸ナトリウムのアゴニストとしての活性を評価した。

(7) 脱顆粒応答を可視化する蛍光色素の開発(共同研究)

王子田彰夫教授(九州大学)との共同研究により、ヒスタミンが金属カチオンをキレートする性質を利用し、脱顆粒応答を検出する蛍光色素を評価した。

4. 研究成果

(1) マウス脳内マスト細胞の発現遺伝子の解析: 脳内マスト細胞の単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を共同研究により実施した。比較対象として、胃の粘膜組織、筋層組織のマスト細胞をそれぞれ粘膜型マスト細胞(MMC)、組織結合型マスト細胞(CTMC)の典型としてそれぞれ採取した。脳内マスト細胞の遺伝子発現プロファイルはCTMCに類似していたが、プロスタグランジン D₂ 合成酵素(*Hpgds*)、グルタミン酸脱炭酸酵素(*Gad1*)、

Ncam1, *Vcam1* といった遺伝子の強い発現は脳内マスト細胞に特異的であった。マスト細胞は周辺環境に応じてフレキシブルに分化することが知られている(Kitamura, *Annu. Rev. Immunol.*, 1989)が、今後ニューロンをはじめとする中枢の細胞との共培養を通じて脳内マスト細胞のモデルを作製する上で、今回得られた遺伝子発現プロフィールはモデルの妥当性を検証するための重要な知見である。

(2)マスト細胞における神経栄養因子受容体の発現:BMMCでは、*p75 (Ngfr)*, *sortilin (Sort1)* が mRNA レベルで発現が認められたが、他の受容体の発現レベルは極めて低いものであった。BMMCを線維芽細胞との共培養により組織結合型へと分化させると、*TrkC (Ntrk3)* が誘導された。一方で、IL-9、SCF存在下、粘膜型に誘導すると *p75* の発現が消失した。以上の結果より、未成熟なマスト細胞モデルでは *Ntrk* ファミリーはほとんど発現していないことが明らかとなった。脳内マスト細胞はCTMCに比較的近いが、CTMCへの誘導条件で *TrkC* の発現誘導が起こることから、脳内マスト細胞の機能制御に *TrkC* リガンドである *neurotrophin-3* が関わる可能性が考えられた。

(3)マスト細胞の活性化による *TrkA* の誘導 : BMMCを抗原、あるいはリポ多糖で刺激すると6時間をピークに *TrkA (Ntrk1)*が転写レベルで誘導された。両者の共刺激により強い転写誘導が確認され、イムノプロットにより *TrkA* タンパク質の発現を確認した。このとき、アゴニストである NGF 刺激により ERK のリン酸化が誘導され、IL-6 および IL-13 が転写レベルで誘導された。NGF は炎症応答時に産生されることが報告されており、今回得られた知見はマスト細胞が NGF を介して遅延相の炎症応答を増強する可能性があることを示唆するものである。

(4)線維化応答の解析 : 神経線維腫における線維化ではマスト細胞が必須であることが報告されているが、BMMCと線維芽細胞株との共培養により、 α -平滑筋アクチン(*Acta2*)、結合組織増殖因子(*CTGF*)、osteopontin (*Spp1*)といった線維化マーカーの誘導が認められた。特に *CTGF* については、無刺激の BMMC との共培養時にも誘導が認められた。

(5)クロモグリク酸ナトリウムの標的分子の同定 : マスト細胞の抗原刺激による脱顆粒応答を抑制する作用をもつクロモグリク酸ナトリウムについて、その標的となる G タンパク質共役型受容体の候補を同定した。この受容体の他のアゴニストもまた、ラット腹腔マスト細胞の抗原刺激による脱顆粒応答を抑制した。GPCR 評価系を用いた解析から、クロモグリク酸ナトリウムより親和性の高いアゴニストを見いだした。クロモグリク酸ナ

トリウムは消化管からの吸収が悪いために、臨床では吸入や点眼で処方されている。標的 GPCR の発見により、より優れたアゴニスト開発が可能となった。

(6)脱顆粒応答を可視化する蛍光色素の開発 : ヒスタミンが二価金属カチオンに親和性を示すことを利用して、高濃度のヒスタミンの存在下コバルトイオンが解離することにより蛍光性を獲得する色素を共同研究を通じて開発した。この色素は細胞膜への指向性を有しており、脱顆粒応答によりヒスタミンを放出したマスト細胞の膜近傍で蛍光を示す。虚血再灌流モデル等にこの色素を適用することにより、*in vivo* で脳内のどのマスト細胞が脱顆粒応答を示しているかをリアルタイムでモニタリングすることが可能となった。

脳内マスト細胞の培養モデルの構築という最終的な目標には到達していないが、本研究により、脳内マスト細胞の遺伝子発現プロフィールの同定、マスト細胞の神経機能との相互作用解析、マスト細胞の活性化レベルの検出ツールの開発といった、予備的検討、測定ツールの開発を完了することができた。今後これらを活用し、脳内マスト細胞の機能解明に取り組む予定である。

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1件)

Oshikawa, Y., Furuta, K., Tanaka, S., and Ojida, A. Cell surface-anchored fluorescent probe capable of real-time imaging of single mast cell degranulation based on histamine-induced coordination displacement. *Anal. Chem.*, 88, 2016, 1526-1529, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04758

[学会発表](計4件)

Satoshi Tanaka, Induction of histamine synthesis in CD11b⁺ Gr-1⁺ myelocytes and its immunological roles in a murine syngeneic tumor model. 2014 XVth Annual Meeting of the Polish Histamine Research Society, 2014.10.24, Lodz, Poland.

田中智之、佐藤仁美、山田圭位子、古田和幸、マウス皮膚型マスト細胞モデルを用いたステロイド性抗炎症薬の評価、第88回日本薬理学会、2015年3月19日、名古屋国際会議場(愛知、名古屋)

田中智之、マスト細胞による炎症制御、第135回日本薬学会、2015年3月26日、神戸学院大学(兵庫・神戸)

田中智之、マスト細胞の成熟過程における機能制御、日本生化学会北陸支部シンポジウム、2015年5月23日、富山大学(富山・富山)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/meneki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 智之 (TANAKA, Satoshi)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40303846

(2)研究分担者

古田 和幸 (FURUTA, Kazuyuki)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50644936

(3)連携研究者

杉本 幸彦 (SUGIMOTO, Yukihiro)

熊本大学大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：80243038