

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

HRG によるマスト細胞活性化の制御

研究分担者 田 中 智 之 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

本研究では、HRG がマスト細胞の機能制御に関わる可能性について検証を行った。標準的なモデルであるマウス骨髄由来培養マスト細胞では、HRG を 30 分間前処理することにより、IgE を介する抗原刺激による 20%程度の脱顆粒率が 40%前後に増大することが明らかとなった。また、脱顆粒応答では低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーの活性化レベルの低下が生じることを見いだした。HRG の好中球に対する作用を考慮すると、Rho ファミリーの調節を介して HRG が脱顆粒応答を増強するという仮説が考えられる。

A. 研究目的

HRG は血漿タンパク質であり、血管内の細胞や内皮細胞は常時高い濃度の HRG と接していると考えられる。一方、組織側に分布する細胞に関しては、炎症反応や組織傷害といった要因を通じて、接触する HRG の濃度は大きく変化することが予想される。マクロファージが死細胞を取り込む際に HRG が関与するという報告があるが、HRG による組織側の免疫細胞の機能の制御については明らかではない。分担者は、マスト細胞の分化に伴う機能制御を明らかにすることをテーマに研究を進めてきたが、ここでは HRG がマスト細胞の機能制御に関わる可能性について検討を行った。

また、本研究事業において明らかにされている好中球に対する HRG の作用は、HRG の標的分子の下流に低分子量 G タンパク質が関与することを強く示唆している。そこで、HRG による低分子量 G タンパク質の活性制御機構に着目した。

B. 研究方法

1. 培養マスト細胞

Balb/c マウス（雄性 8 週齢）の脛骨より骨髄細胞を回収し、IL-3 (10 ng/ml)存在下、約 1 ヶ月培養することにより、FcεRI および c-kit とともに陽性の細胞が 95%以上である骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)を得た。

2. マスト細胞の活性化の評価

脱顆粒応答は顆粒酵素である β-hexosaminidase 活性を指標に算出した。脱顆粒応答は PIPES 緩衝液 (25 mM PIPES-NaOH, pH 7.4, 125 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA)中で検出した。

3. 低分子量 G タンパク質の活性化の検出

Rac1 および Cdc42 の GTP 型と特異的に結合する Pak の部分配列を glutathione S-transferase (GST)融合タンパク質として大腸菌で発現させ、これを用いて細胞破碎液

中の GTP 型を沈降反応により分離した。イムノブロットにより、全体の低分子量 G タンパク質量、GTP 型の量をそれぞれ定量し、活性化を評価した(Bernard, V et al., *J. Biol. Chem.* 1999)。RhoA については、rhotekin の部分配列を利用して同様の評価を行った (Xiang-Dong, R. et al., *EMBO J.* 1999)。

(倫理面への配慮)

本研究は岡山大学動物実験委員会の審査を経て、承認されたものである。

C. 研究結果

1. HRG によるマスト細胞の脱顆粒応答の増強

マウス骨髓細胞を IL-3 存在下、1 ヶ月培養することにより得られる骨髓由来培養マスト細胞 (BMMC: IL-3-dependent bone marrow-derived mast cell)は、マスト細胞のモデルとしてしばしば用いられる。培養系では通常 10%のウシ胎仔血清(FCS)が添加するため、FCS に含まれるウシ HRG の影響を除いた系で検証する必要性が考えられた。実験では、抗 TNP (trinitrophenol) IgE 抗体を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 3 時間感作し、PIPES 緩衝液で二回洗浄して遊離 IgE を除去し、その後ヒト HRG を各濃度で 37°C、30 分間処理した。その後、抗原(TNP-BSA, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し、脱顆粒応答を測定した。その結果、ばらつきはあるものの、1 nM 付近の濃度で脱顆粒応答の増強が認められた (図 1)。血清中に含まれる HRG の濃度を考慮すると、十分な洗浄を通じて残存する HRG レベルを抑えることが、抑制効果の再現性を得る上では重要であることが推察された。

2. 低分子量 G タンパク質の活性化の測定

HRG は好中球の形態変化の誘導や、活性

酸素の産性抑制等の作用を示すことから、細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの活性化レベルを変化させる可能性が考えられた。そこで、マスト細胞において脱顆粒応答を伴う活性化刺激を与えた際の、Rho ファミリーの活性化を検討した。

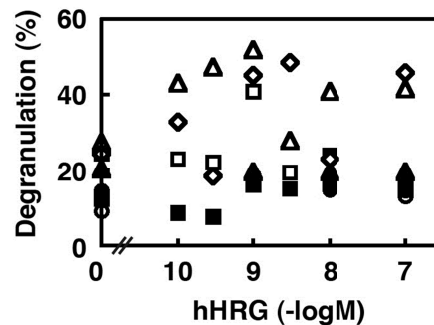


図 1 マウス骨髓由来培養マスト細胞の脱顆粒応答のヒト HRG による増強

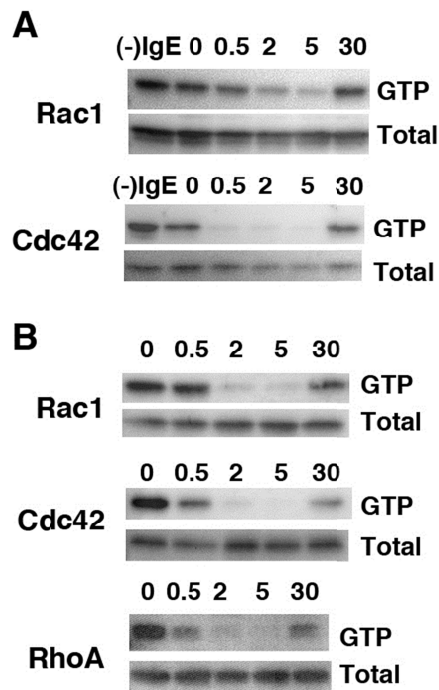


図 2 脱顆粒刺激に対する Rho ファミリーの活性化レベルの変化

A: BMMC を抗 TNP IgE 抗体(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を 12 時間感作後、PIPES 緩衝液で洗浄、抗原(TNP-BSA, 100 ng/ml)を添加し、0.5、2、5、30 分後にそれぞれ細胞を回収した。

B: BMMC を thapsigargin (300 nM)で刺激し、0.5、2、5、30 分後にそれぞれ細胞を回収した。

抗原刺激では、速やかに Rac1、Cdc42 の GTP 型の減少が認められた。一方、小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤である thapsigargin 処理においても同様に速やかな GTP 型の減少が認められ、これは RhoA についても同様であった。これらの結果は、脱顆粒応答時には Rho ファミリーの不活性化が速やかに生じることを示すものである。

D. 考察

比較的低い濃度域で HRG の作用が認められたが、血清から残存するウシ由来 HRG の影響を抑制することにより、さらに明瞭な結果が得られる可能性がある。好中球における正球化は、HRG によって Rho ファミリーの活性レベルの低下が生じる可能性を示唆しているが、マスト細胞の脱顆粒応答では Rho ファミリーの活性化レベルが低下することが明らかとなった。即ち、HRG による脱顆粒応答の増強は Rho ファミリーの活性化レベルの調節を介する可能性が考えられた。この点について、さらに HRG 単独刺激における Rho ファミリーの活性化レベルの検討を行う予定である。

マスト細胞は組織に分布することから、通常は低いレベルの HRG に接していることが予想されるが、炎症応答時には血管透過性の亢進により高レベルの HRG に曝露される可能性が考えられる。即時型アレルギーでは抗原刺激によりマスト細胞が脱顆粒応答を起こし、遊離されたヒスタミン等の作用により血管透過性が亢進する。このとき、HRG がマスト細胞に作用することにより、脱顆粒応答が強化され、より強い炎症応答につながるというメカニズムが考えられる。HRG の中和抗体、あるいは RNAi による血中レベルの低下を誘導した際に、即時型応答がどのような影響を受けるかは興味深い問題である。

E. 結論

ヒト HRG はマウス骨髄由来培養マスト細胞の抗原刺激による脱顆粒応答を増強した。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

① 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回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.

② 田中智之.

マスト細胞による炎症制御.

第135回日本薬学会大会, 神戸, 2015.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

