

マスト細胞と抗原親和性特異的浸潤細胞のクロストーク
 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野
 鈴木 亮

1. 目的

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患は、世界的にもその患者数は増加の一途をたどっている。日本においても国民の4割以上が何らかのアレルギー症状を示すと考えられているにもかかわらず、未だ確立した治療方法がないのが現状である。その原因の一つとして、複雑かつ多様な疾患症状が挙げられる。例えば、スギ花粉などに代表される花粉症は、同じ抗原（アレルゲン）特異性を持つにもかかわらず、人々が示す病状は軽微なものから重篤なものまで様々である。また、幼児期に多いアトピー性皮膚炎では、成長と共に症状が変化（緩和・増悪）することが知られている。このように症状が多様なため、疾患が難治・慢性化し、治療の長期化を招いている。その結果、患者のQOLの低下、医療費の高騰を招くなど現代における大きな社会問題となっており、重要な研究課題であると考えられる。

これらアレルギー反応に重要な役割を担っているのがマスト細胞である。マスト細胞は細胞膜上にIgE受容体（FcεRI）を発現し、抗原特異的IgEと結合している。そこに抗原が結合し、IgE受容体を架橋・凝集すると、特異的なシグナル伝達経路が活性化される。その結果、分泌顆粒内のケミカルメディエータが、細胞外に放出され、アレルギー反応が惹起される（図1）¹⁾。図1に示すように、抗原（アレルゲン）、抗原特異的IgE、そしてIgE受容体の3者の関係が、マスト細胞の活性化に極めて重要な役割を果たしており、特にアレルゲンと抗原特異的IgEの親和性（アフィニティー）が、多様なIgE受容体の活性化状態や複雑化するアレルギー疾患の原因の一つとして重要な役割を果たしていると考えられていた²⁾。



図1 抗原による抗原特異的IgEを介したIgE受容体の架橋形成と分泌反応

我々は、独自に作製した異なる親和性を持つ抗原を用い、マスト細胞における抗原親和性の認識機構、親和性が制御するシグナル伝達、アレルギー炎症症機構を追究した。そして、アレルギーモデル動物を用いた*in vivo*での解析から、抗原親和性の違いが、浸潤する細胞の種類や数に大きな違いがあることを見出した（図2）。その中で、高親和性抗原では好中球が、低親和性抗原では単球・マクロファージが有意に炎症部位に浸潤していることを見いだした（図2）^{3, 4)}。これまで好中球や単球・マクロファージがアレルギー反応に寄与していることは、強く示唆されているものの、その実体については、未だ十分には明らかになっていないのが現状である^{5) 6)}。そこで本研究では、異なる親和性抗原の刺激応答に伴う特異的浸潤細胞（好中球と単球）とマスト細胞のクロストーク（相互作用）を分子・細胞レベルで解析し、両者の相互作用に伴うアレルギー疾患の病態へ及ぼす影響を追究した。

2. 方法

マスト細胞には、マウス骨髄を単離し、IL-3（Interleukin-3）とSCF（Stem Cell Factor）の存在下で4週間培養することにより、マスト細胞に分化したマウス骨髄由来マスト細胞（BMMCs: Bone Marrow-derived Mast Cells）を用いた。一方、好中球はマウス骨髄より、骨髄細胞を単離し、ACK Lysing bufferにより赤血球を破碎し、その後得られた細胞についてPercoll密度勾配遠心法により精製し実験に用いた。本研究では、両者を1日共存培養し、マスト細胞の活性化に伴う両者の相互作用を追究した。特異的なマスト細胞の刺激には、抗原を用い、抗原特異的IgEの刺激応答に伴うマスト細胞シグナル伝達機構を追究した。マスト細胞と浸潤細胞の相互作用の生細胞イメージング解析には、共焦点レーザー顕微鏡CLSM（Confocal Laser Scanning Microscopy）を用い、両者の接着様式の構造的な解析には走査型電子顕微鏡SEM（Scanning Electron Microscopy）を用いた。

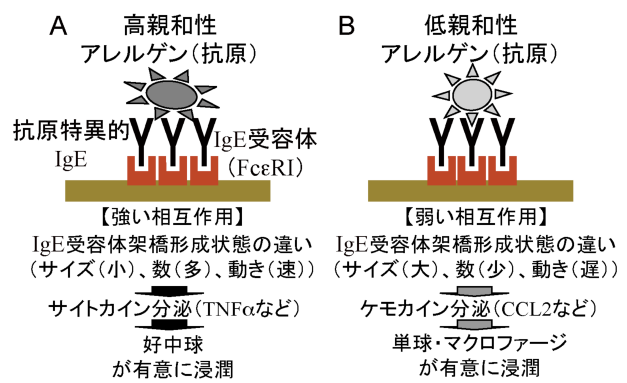


図2 異なる親和性抗原によるマスト細胞活性化、分泌物質、浸潤細胞の模式図

Suzuki, R. *et al.*, *Science*, 343:1021-1025 (2014)

3. 結果

我々は、マスト細胞と抗原親和性依存的な浸潤細胞（好中球や単球）との相互作用を追究するため、*in vitro*で両者の相互作用を追究する共存培養システムの確立を試みた。共存培養システムの確立に先立ち、マウス骨髄由来マスト細胞の培養とマウス好中球及び単球の単離・培養方法の確立を行った。マウス骨髄由来マスト細胞は、マウス下肢大腿骨より骨髄細胞を単離し、IL-3 (Interleukin-3) とSCF (Stem Cell Factor) の存在下で4週間培養した。4週間後には、約95%の細胞でマスト細胞のマーカー蛋白質であるFcεRI⁺及びc-kit⁺の細胞群（骨髄由来マスト細胞）を得た。マウス単球の単離・培養に関しては、単離できる細胞数や細胞接着の問題もあり、残念ながら現在まで共存培養システムの確立には至っていない。単球の単離・培養方法に関しては、現在も引き続き条件の検討を行っている最中である。好中球の単離・培養方法に関しては、マウス下肢大腿骨より骨髄細胞を採取し、ACK Lysing bufferにより赤血球を破砕後、Percollを用いた密度勾配遠心法により好中球分画を採取した。この方法により高純度のマウス骨髄中の好中球の単離に成功した。そこで、確立した上記の方法によりマウス骨髄から単離した好中球と骨髄由来マスト細胞の共存培養システムの確立を行った。

両者を共存培養すると、どちらの細胞も球形をしており、好中球はマスト細胞 (~12 μm) と比較し、やや小さい (~7 μm) ことが分かった。そこで、刺激応答に伴う両細胞間での相互作用について生細胞イメージング解析を行った。特異的なマスト細胞の活性化には、抗原特異的IgEを感作させたマスト細胞に抗原を用いて行った。その結果、抗原によって特異的に活性化されたマスト細胞では、脱顆粒反応（ケミカルメディエータの開口放出）が誘導され、それに伴う形質膜のラフリングが観察された（図3の矢印）。その後好中球の形態が、球形から紡錘形に変

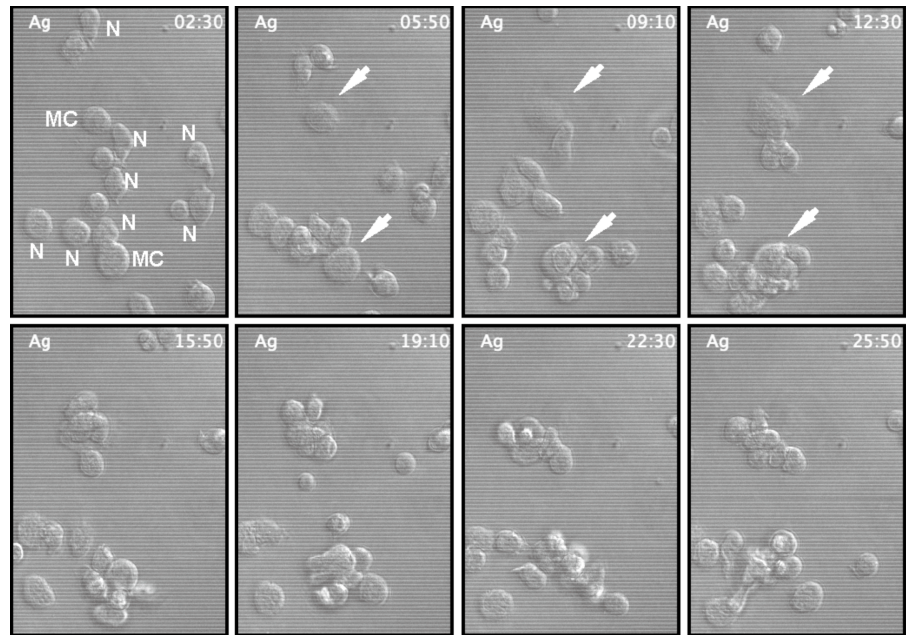


図3リアルタイムイメージングによるマスト細胞と好中球の相互作用
抗原によって特異的に活性化されたマスト細胞 (MC) は、脱顆粒反応に伴う細胞膜のラフリングが観察された (矢印)。その後、脱顆粒したマスト細胞と好中球 (N) の相互作用が観察された。

化し、マスト細胞の方向へ移動していく様子が観察された。そして、抗原刺激を行った数分後には、抗原によって特異的に活性化されたマスト細胞に複数の好中球が集積するようなダイナミックな相互作用が観察された（図3）。次に、マスト細胞と好中球の相互作用の構造的基盤となる詳細な接着様式を追究するため、走査型電子顕微鏡SEMによる両者の接着部位の観察を行った。その結果、両者は極めて密接に接着しており、構造的にも両者の相互作用の存在が強く示唆された（Data not shown）。これらのことから、好中球とマスト細胞の接着を介した相互作用によって、好中球がマスト細胞の炎症反応を修飾していることが示唆された。

次に、これら相互作用の足場となる分子基盤の探索を行った。様々な細胞間相互作用において、相互作用部位における足場となる細胞骨格蛋白質の変化（Fアクチンの集積、チューブリンの極性変化など）が起こることが明らかになっている⁷⁾。そこで相互作用に伴うこれら骨格蛋白質の変化についての解析を行った。はじめにアクチンについて、両細胞間の相互作用部位での変化について追究した。その結果、マスト細胞と好中球が相互作用している部分で、Fアクチンが顕著に増加している様子が観察された（図4）。このような接着面でのFアクチンの集積は、接着していない好中球では観察されなかった。また、チューブリンに関しては、相互作用に伴う極性変化などは観察されなかった。

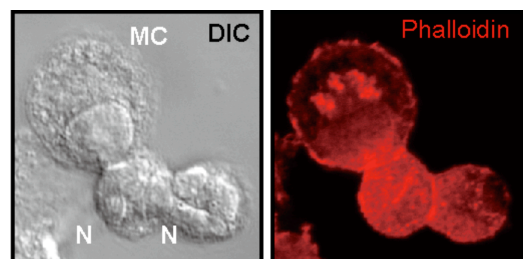


図4マスト細胞と好中球の相互作用部位におけるアクチン骨格の集積
マスト細胞 (MC) と好中球 (N) の相互作用の接着部位において、Rhodamine-Phalloidinに染色されたFアクチンの集積が観察された。

次に、両者の相互作用に関与する分子について追究した。様々な免疫細胞間相互作用（T細胞、B細胞、樹状細胞など）において、免疫シナプス (Immunological Synapse) という異種免疫細胞間の接触領域に形成されるリング状の構造帯 (SMAC: Super Molecular Activation Cluster) が存在し、そのリング状の構造帯は中心部から (c-SMAC、p-SMAC、d-SMAC) のように同心円状の構造を形成する。そして、それぞれのSMACは特異的な蛋白質クラスターを形成し、細胞間相互の機能調節を行っている^{8,9)}。我々は、共焦点レーザ顕微鏡を用い、マスト細胞や好中球で機能していると考えられる様々な蛋白質について、それらの局在変化や活性化状態についてイメージング解析を行った。その結果、マスト細胞と好中球の相互

作用においても、免疫シナプスで観察されるTCR (T Cell Receptor) を介した機能発現に重要であるCD54 (ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1) とそのリガンドであるLFA-1 (CD18/CD11a) 複合体のうち、CD18がマスト細胞/好中球の相互作用部位で有意に集積している様子が観察された (Data not shown)。このことから、マスト細胞・好中球相互作用においても、他の免疫シナプスで観察される様な、機能分子が同心円状の構造を形成し、マスト細胞や好中球の機能修飾をしている可能性が示唆された。

さらに、我々は上記の研究の進展以外に、好中球に発現する蛋白質がマスト細胞の機能を修飾する可能性がある候補分子を得ており、現在、慎重にそれらの分子の機能解析を行っている。

4. 考察

貴財団の助成による本研究の取り組みを通して、抗原の親和性によって制御される、浸潤細胞(好中球)とマスト細胞の相互作用を追究するための*in vitro*共存培養システムの確立に成功した。また、確立したシステムを用いて、両者の相互作用の基盤となる細胞骨格の変化や両細胞間のシグナル伝達の基盤となる分子について、CD18/CD54(ICAM-1)をはじめとした、いくつかの候補分子を得た。今後は、得られたターゲット分子に焦点を絞り、研究を発展・展開させていく予定である。また、現時点では確立までには至っていないが、単球とマスト細胞の共存培養システムについてもさらなる改良を加えることで研究を遂行させていきたいと考えている。

5. 参考文献

- 1) Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008;9:1215.
- 2) Suzuki R, Scheffel J, Rivera J. New insights on the signaling and function of the high-affinity receptor for IgE. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;388:63.
- 3) Suzuki R, Leach S, Liu W, et al. Molecular editing of cellular responses by the high-affinity receptor for IgE. *Science* 2014;343:1021.
- 4) Dema B, Suzuki R, Rivera J. Rethinking the Role of Immunoglobulin E and Its High-Affinity Receptor: New Insights into Allergy and Beyond. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;164:271.
- 5) Oyoshi MK, He R, Li Y, et al. Leukotriene B4-driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation. *Immunity* 2012;37:747.
- 6) Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, et al. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* 2013;38:570.
- 7) Martin-Cofreces NB, Baixauli F, Sanchez-Madrid F. Immune synapse: conductor of orchestrated organelle movement. *Trends Cell Biol* 2014;24:61.
- 8) Kumari S, Curado S, Mayya V, Dustin ML. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838:546.
- 9) Angus KL, Griffiths GM. Cell polarisation and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25:85.