

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学大学院総合研究部医学域免疫学講座
職名・氏名	特任助教・TRAN NGUYEN QUOC VUONG ㊞

1 研究テーマ

アレルギー疾患における生体内マスト細胞の量的・空間的・時間的な解析

2 研究の目的

マスト細胞は、蕁麻疹、花粉症や喘息、食物アレルギーなどのアレルギー疾患の形成に中心的な役割を果たしている細胞である。マスト細胞は皮膚、気道粘膜、腸管粘膜など生体が外界と接する組織に多数存在する。この空間的配置により環境中アレルゲンの侵入を検知し、アレルギー反応を始動、増強、制御する役割を担っている。

マスト細胞は、ヒト体内で1兆個近くあると言われるが正確な数は不明である。またマスト細胞は喘息や食物アレルギー、蕁麻疹などの病変部で増加すると考えられている。しかしこの知見は病理染色といった古い方法を使って、病変部のマスト細胞増加を観察し得られたもので組織全体や全身の動態は不明である。例えばマスト細胞が病変組織の一部に集積しているだけの可能性もある。したがって 21 世紀の現在でも個体・組織レベルでマスト細胞数を正しく評価することは未だ出来ていない。

本研究の目的は、マスト細胞を可視化する最新技術を用いることで、定常状態およびアレルギー疾患時のマスト細胞数を定量化することである。本研究により、マスト細胞についての定量的な理解が進み、アレルギー疾患の形成や治療効果に対する理解が飛躍的にアップデートすることが期待される。既存の抗アレルギー薬のマスト細胞への作用も捉えられ、想定外の薬の作用の発見にも繋がる。アレルギー疾患は日本では3人に1人が罹患しており我が国の健康・福祉の増進に貢献する。

3 研究の方法

1) 蛍光タンパク質によってマスト細胞を可視化する遺伝子改変マウスの作成

マスト細胞は生体内で大きく結合組織型、粘膜型の2つに大別される。結合組織型マスト細胞は皮膚、腹腔、脂肪組織、脳などに存在し、粘膜型マスト細胞は気道、腸管、生殖器などに存在する。

本研究では結合組織型マスト細胞にフォーカスした。蛍光タンパク質によって結合組織型マスト細胞を可視化するために、結合組織型マスト細胞に特異的に発現する Mcpt5 (mast cell specific protease-5) のプロモーター領域に Cre タンパク質が結合したマウス (Mcpt5-Cre) と蛍光タンパク質である TdTomato が Flox 領域と結合したマウス (Floxed-Tdtomato) を交配し、結合組織

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

型マスト細胞特異的に TdTomato を発現するマウスを作成した (Mcpt5-TdTomato)。

2) 組織透明化技術と 3次元蛍光イメージングを用いたマスト細胞の数や分布の解析

現在、生体組織から高屈折率成分を除いたり、溶媒を高屈折率液体へ置き換えることにより光散乱を低減し固定組織を透明化する技術が注目され、基礎生物学分野や製薬分野でこの技術導入が少しずつ広がっている。この技術は、従来二次元を主体として行われてきた組織学を三次元に拡張し組織学における新たな視野を得るための方法の一つとなる。

Mcpt5-TdTomato の皮膚組織を、最新の組織透明化技術 (Nat Protoc 14:3506, 2019) を使い透明化し 3次元蛍光イメージングを行い、画像解析によりマスト細胞数の定量を試みた。

4 研究の成果

Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織を透明化し、3次元蛍光イメージングを行い、画像解析によりマスト細胞数を同定、定量化を試みた。Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織、特に真皮中に赤色に染色される多数のマスト細胞を同定することに成功した (下図参照)。

5 今後の展望

現在、Mcpt5-TdTomato マウスの皮膚組織におけるマスト細胞を定量化する方法について検討中である。定量化に成功した後、各種のアレルギー疾患モデルを Mcpt5-TdTomato マウスに導入し、皮膚組織中のマスト細胞の数や分布の変化について解析する。

アレルギー疾患モデルとしては、蕁麻疹モデルの 1つである PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応を使う予定である。また拘束ストレス、自発的な運動誘発 (回転カゴ留置による)、低温刺激 (低温室での短時間のケージ暴露)、薬剤 (ステロイド塗布、ヒスタミン H1 受容体拮抗剤、抗 IgE 抗体、抗 IL-5 抗体、JAK 阻害剤など) による皮膚マスト細胞の数や分布の変化についても解析する。

これらの解析により、定常時の結合組織型マスト細胞の数や分布を解析するとともに、アレルギー疾患の病態時やストレス、薬剤投与時における結合組織型マスト細胞の量・空間・時間的な変化が明らかになる。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

アレルギー研究の分野で最も権威ある米国あるいは欧州アレルギー学会誌に論文を投稿する予定である。

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

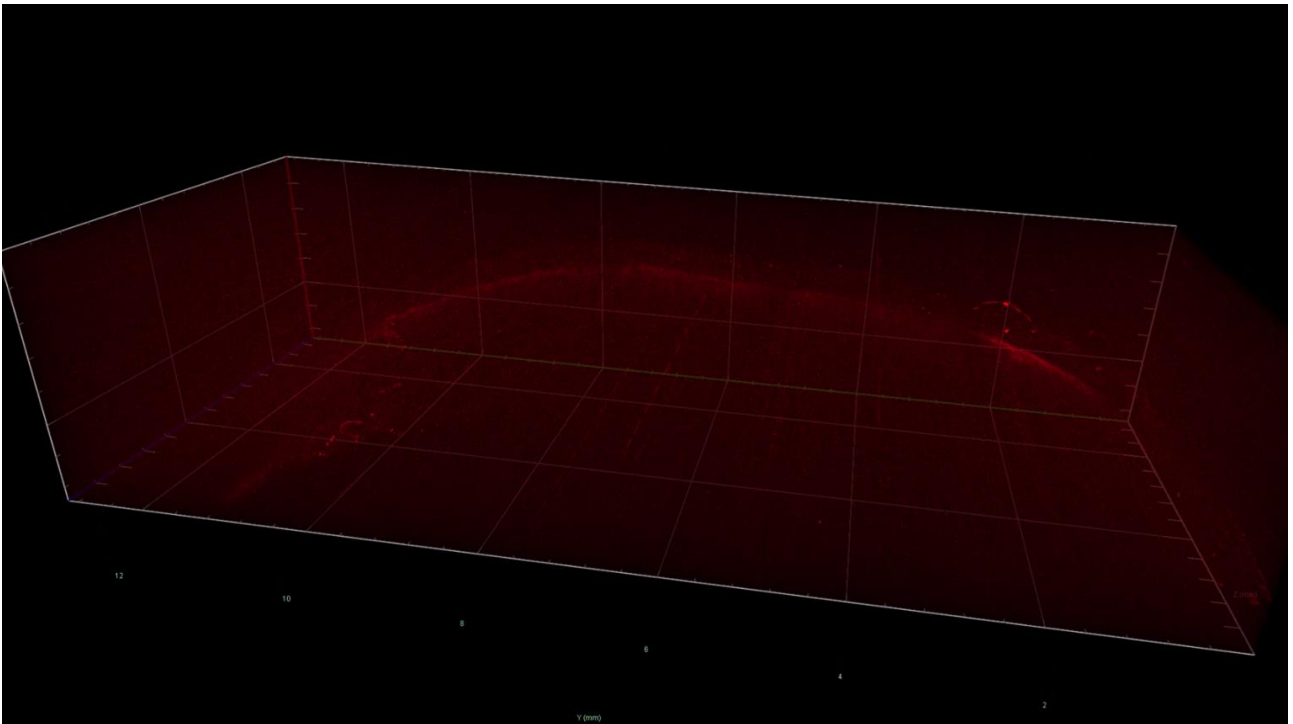
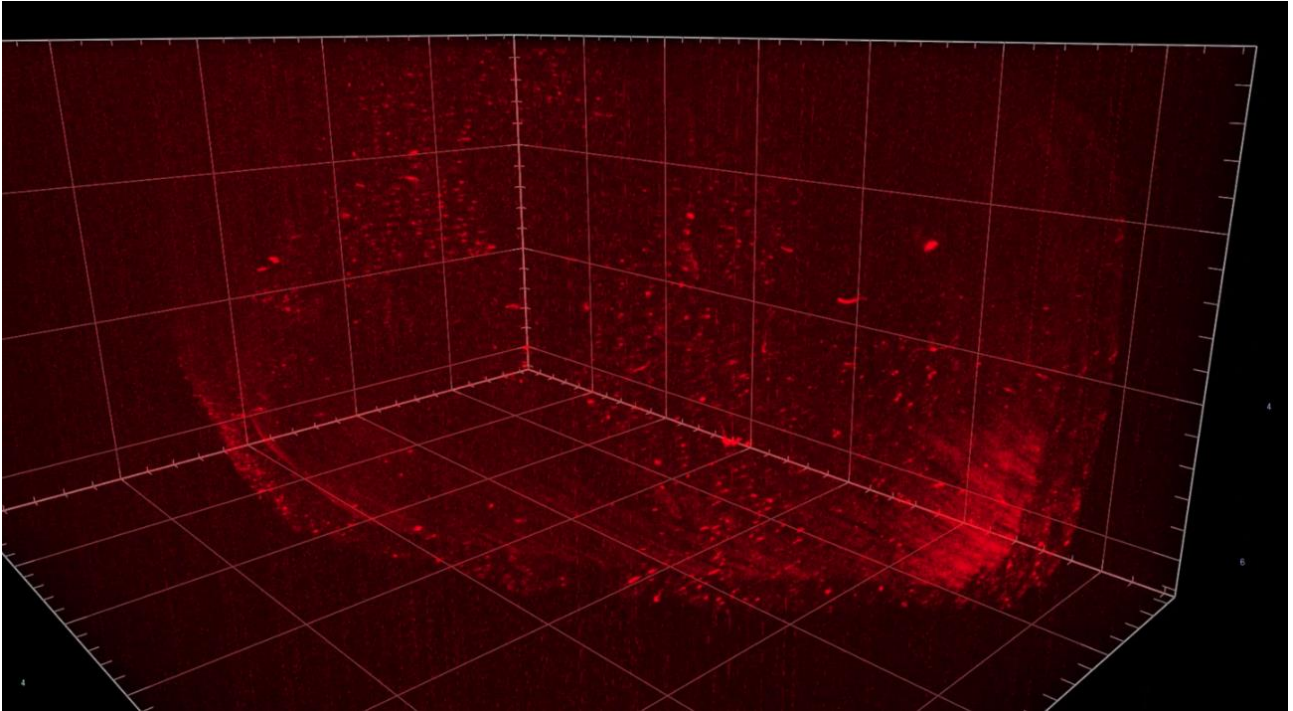
(参考データ)

マウス皮膚における組織透明化技術を用いたマスト細胞可視化

上パネル：MCPT-5-TdTomato マウス皮膚における組織透明化技術を用いたマスト細胞可視化

下パネル：コントロールマウス皮膚

赤く染色された粒様に見えるのが結合組織型マスト細胞で、
コントロールマウス皮膚では認められない



留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。