

顕微光学法によるマスト細胞活性化の分子機構の研究

古野 忠秀

Confocal Laser Scanning Microscopy to Study Molecular Mechanism of Mast Cell Activation

Tadahide FURUNO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

(Received May 26, 2005)

In the immune system, mast cells are a key cell type in the pathogenesis of immunoglobulin E (IgE)-dependent hypersensitivity reactions. Engagement of the high-affinity IgE receptors by multivalent antigens initiates the downstream activation of signal-transducing enzymes and evokes degranulation and cytokine production *via* an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration. In addition, mast cells also play a prominent role in non-IgE-mediated hypersensitivity reactions. Mast cells are closely apposed to nerves *in vivo* and are likely to be regulated functionally by nerves. However, the molecular mechanisms for mast cell activation in an IgE-dependent and -independent manner have not been fully clarified. Confocal laser scanning microscopy has played an essential role in cell biology by allowing visualization of specific intracellular signaling molecules with high spatiotemporal resolution in living cells. We have studied intracellular movements of Ca^{2+} using a specific fluorescent probe and several types of signaling molecules using derivatives of green fluorescent protein in a living single mast cell using a microscopic strategy. We here describe our imaging analysis of the calcium signals to the nucleus, the movement of secretory granules in the degranulation process, and the nucleocytoplasmic shuttling of mitogen-activated protein kinase in mast cells. Further, we demonstrate that direct communication between mast cells and nerves occurs. These findings provide useful information from a new perspective to understand the molecular mechanisms of allergic reaction and inflammation.

Key words—mast cell; neuroimmunology; confocal laser scanning microscopy; green fluorescent protein; degranulation; allergic reaction

1. はじめに

免疫系では、個々の免疫細胞が組織的に働き、それら細胞応答の集積として様々な免疫反応が誘導される。免疫細胞は、外部からの刺激に対して多様な細胞応答を引き起こし、免疫反応の誘導の中心的役割を果たしている。それゆえ、個々の免疫細胞の活性化機構を解明することは生命科学、医学、薬学を始めとする幅広い分野における重要な研究課題になっている。免疫細胞の刺激応答の際には、多くのシグナル分子が、あるときにはカスケードの形で、ま

たあるときには分岐する形で活性化され、その機能を発現するようになる。¹⁾それゆえ、このような複雑多岐に渡る細胞内シグナル分子の活性化機構を解明していくことは決して容易なことではないが、免疫反応を理解する上では必須のものになっている。そのような研究課題にアプローチしていく上で顕微光学技術は有効な計測法であると考えられる。

この約 20 年の間に、細胞機能を解析するための顕微光学技術は飛躍的な進展を遂げてきた。それには 2 つの大きな理由があった。1 つは分解能の優れた新しい光学顕微鏡の開発であり、もう 1 つはシグナル分子を可視化するための蛍光プローブの開発である。新しい光学顕微鏡の代表例としては共焦点レーザー顕微鏡が挙げられる。共焦点レーザー顕微鏡は、従来の光学顕微鏡よりもはるかに優れた空間分解能を持っており、生きたままの細胞を光学的に薄

名古屋市立大学大学院薬学研究科 (〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

現住所：愛知学院大学薬学部 (〒464-8650 名古屋市千種区楠元町 1-100)

e-mail: furuno@dpc.aichi-gakuin.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

い切片に切断して観察することができる。それが、コンピュータ画像処理技術の進展と相まって、単一細胞におけるシグナル伝達分子の細胞内動態を高い時間的・空間的な分解能で可視化できるようになった。一方、シグナル分子を可視化するための蛍光プローブの開発の breakthrough になったのは、Dr. Tsien らによるアセトキシメチル誘導体を用いた一連のカルシウム感受性蛍光試薬の研究である。²⁾ これにより、細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーの1つであるカルシウムイオンが単一細胞レベルで解析できるようになり、光学顕微鏡は細胞の形態だけでなく細胞機能の解析に活用されるようになっていった。その後、cAMP や一酸化窒素 NO などの低分子量の機能性分子を可視化解析する蛍光プローブも開発され、細胞機能の可視化解析の研究は大きな広がりを見せた。^{3,4)} さらに、このようなイオンや分子量の小さな分子だけでなく、細胞内の蛋白質の動態を直接観察する技術が開発されたことも細胞機能の可視化解析技術の発展に大きく貢献した。それは、蛍光蛋白質 green fluorescent protein (GFP) の応用である。⁵⁾ 分子生物学的手法が簡便に使えるようになり、GFP を蛍光プローブとして目的の蛋白質の細胞内分布や動態を追究する手法は一般的に用いられるようになってきた。

本文では、免疫細胞の中でも即時型アレルギー反応に関与するマスト細胞に着目し、顕微光学法を用いてマスト細胞の情報伝達機構の可視化解析を行った結果を述べる。

2. 抗原受容体を介した脱顆粒反応機構

マスト細胞の細胞膜上には高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) が発現しており、FcεRI に結合した IgE

が抗原を認識して架橋されると、細胞が活性化される (Fig. 1)。細胞膜上で受けた情報は細胞質内に伝達され、カルシウムイオン濃度の上昇とプロテインキナーゼ C の活性化が起こる。そして、細胞内の分泌顆粒に含まれていたヒスタミンやセロトニンなどの炎症性化学伝達物質が細胞外に放出される脱顆粒反応が引き起こされる。加えて、脂質メディエータとして、プロスタグランジン D₂、ロイコトリエン C₄、血小板活性化因子 PAF (platelet-activating factor) なども産生されるようになり、即時型アレルギー反応の初期相が誘導される。^{6,7)} また、細胞質内に伝達された活性化のシグナルは核にまで伝達され、転写活性が亢進されて炎症性サイトカインの産生が誘導される。これが、即時型アレルギー反応の遅発相の引き金になると考えられている。⁸⁾ このような核へのシグナル伝達には、細胞質から核へ移行する核移行蛋白質が重要な役割を果たしている。まず、脱顆粒反応に至る細胞質でのシグナル伝達機構を、カルシウムイオン濃度変化と分泌顆粒動態に着目して追究した結果を述べる。

2-1. カルシウムイオン動態 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、マスト細胞株 (RBL-2H3 細胞) の抗原刺激に伴う細胞内カルシウム動態を追究した結果の一例を Fig. 2 に示した。ここでは、カルシウムイオン特異的な蛍光色素 fluo-3 で標識した RBL-2H3 細胞にあらかじめジニトロフェニル (DNP) 基に特異的な IgE を感作させておき、DNP 基を結合させたウシ血清アルブミン (DNP-BSA) で抗原刺激した。Fluo-3 はアルゴンイオンレーザ (488 nm) で励起した。その結果を解析すると、従来の蛍光顕微鏡でも観察されていたように、^{9,10)} 細胞内

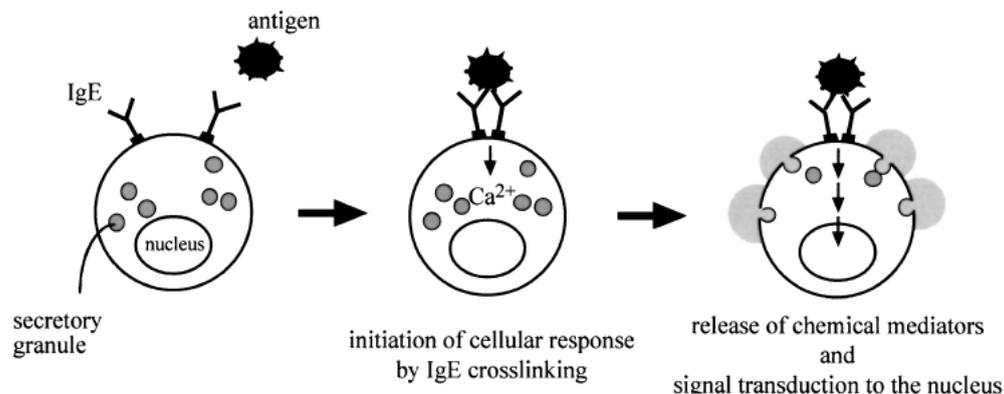


Fig. 1. Schematic Representation of Mast Cell Activation

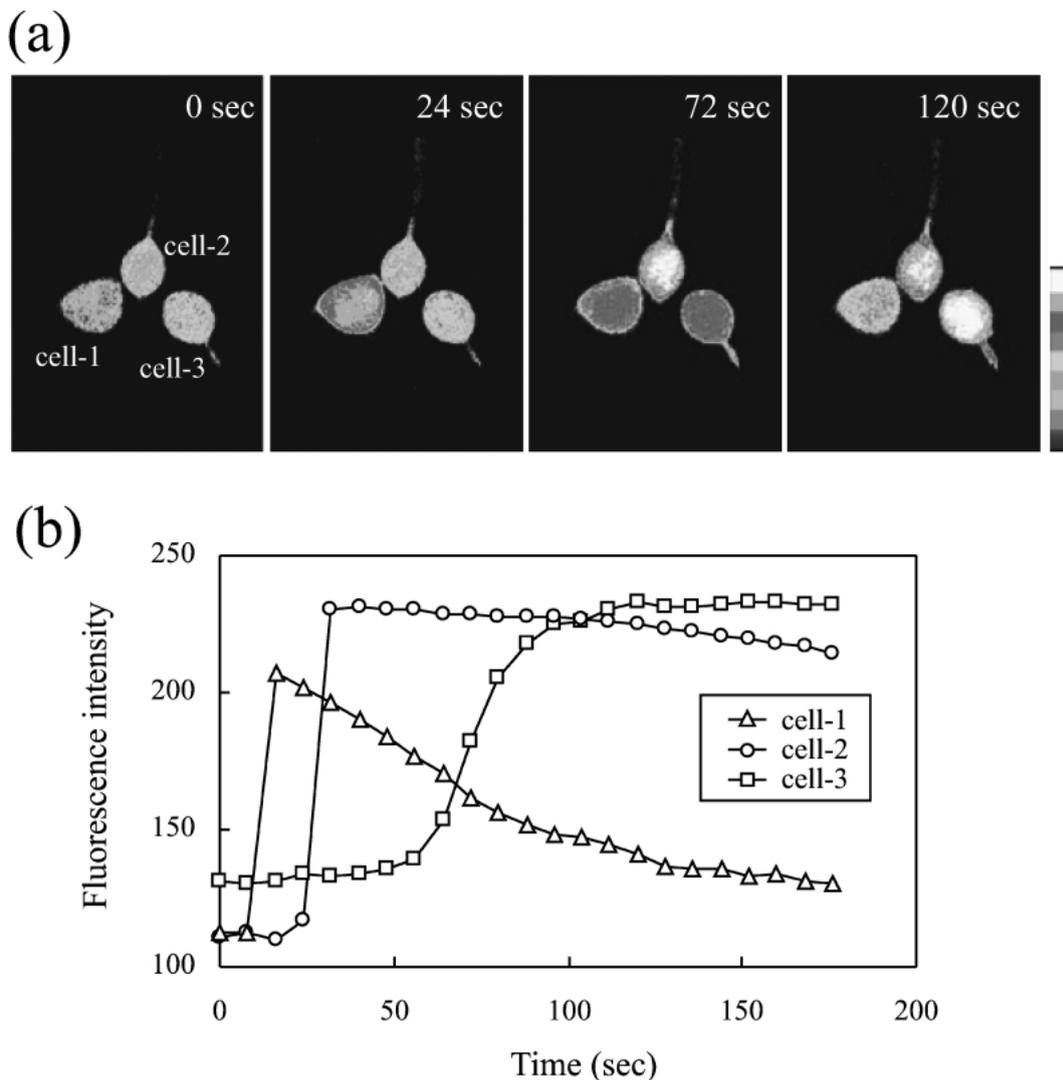


Fig. 2. Time Courses of Intracellular Calcium Ion Concentration in Individual Mast Cells

(a) Confocal fluorescence images of fluo-3-loaded RBL-2H3 cells. (b) Fluorescence intensity changes of fluo-3-loaded individual RBL-2H3 cells after the addition of antigen.

カルシウムイオン濃度上昇の時間変化が個々の細胞で大きく異なっており、同一クローンの細胞株においてもカルシウム応答に顕著な違いがあった。¹¹⁾ これは、クローン細胞にも個性があることを示しているものと考えられる興味深い結果であった。次に、蛍光画像を注意深くみると、単一細胞内の fluo-3 の蛍光強度の分布が均一ではないことに気付いた。RBL-2H3 細胞の大きさは十数 μm 程度であり、従来の蛍光顕微鏡では細胞内のカルシウムイオン濃度の不均一性を観察することはできなかった。われわれが細胞内カルシウムイオン濃度の不均一性に気付いた 1990 年代前半には、カルシウムイオンがセカンドメッセンジャーとして細胞質内で作用していることは明らかになっていた。そこで、細胞内で蛍光

強度が大きく上昇している部分が核であり、カルシウムイオンは核内でも働いて細胞機能に影響しているのではないかと考え、同じ細胞の核の位置を特定することを試みた。そこで、DNA に特異的に結合する蛍光試薬 Hoechst33342 と細胞膜を特異的に染色する蛍光色素 TMA-DPH を、ヘリウム・カドミウムレーザ (He-Cd レーザ) (325 nm) で励起して、核の画像を取得し、カルシウムの画像と比較した。その結果の一例を Fig. 3 に示した。この細胞は、刺激前には細胞の中心部の蛍光強度が小さかったが、刺激後にカルシウムイオン濃度が上昇すると、逆に周辺部よりも大きくなった。右には同じ細胞の核の画像を示した。これらの画像から、カルシウムイオンの蛍光画像と核の蛍光画像がよく対応してい

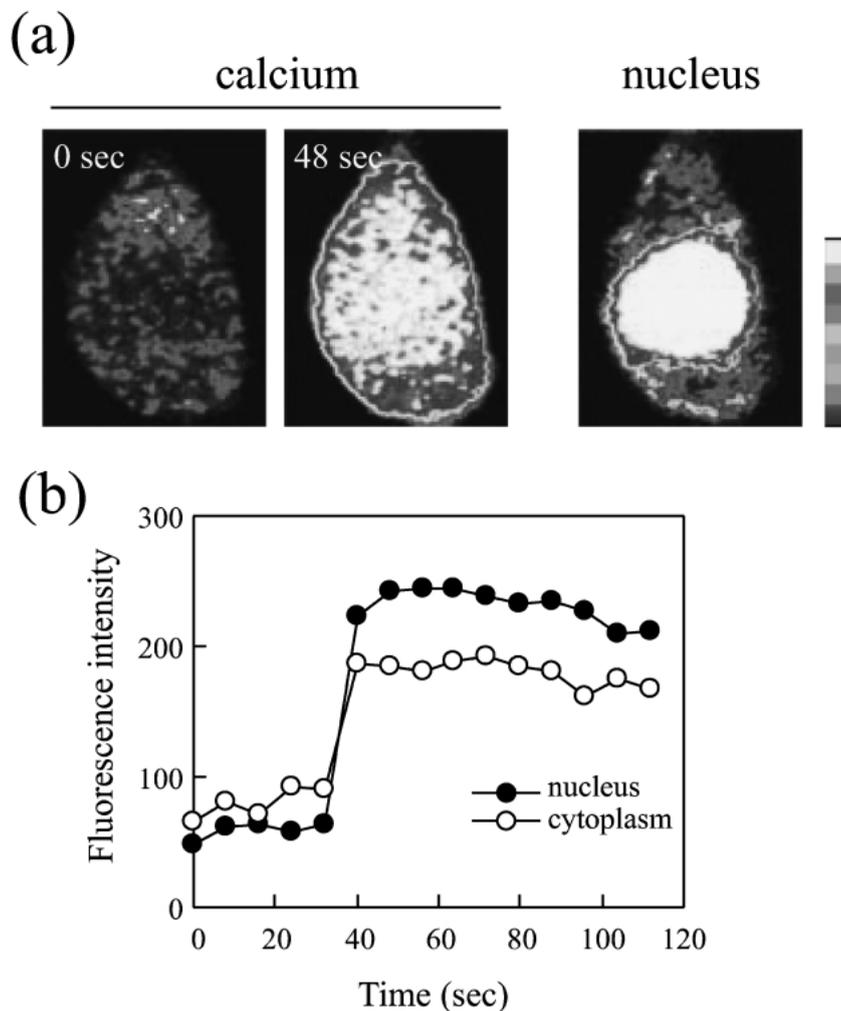


Fig. 3. Antigen-induced Nuclear Calcium Signals in Mast Cells

(a) Confocal fluorescence images of a fluo-3 and Hoechst 33342-co-loaded RBL-2H3 cell. (b) Fluorescence intensity changes in the nucleus and the cytoplasm of the RBL-2H3 cell after the addition of antigen.

ることが分かった. このようにして, マスト細胞の抗原刺激に伴うカルシウムイオン濃度上昇は細胞質内だけでなく, 核内でも起こっていることが初めて明らかになった.¹¹⁾ また, このような核へのカルシウムシグナルの伝達はマスト細胞だけでなく, Bリンパ球でも起こっていることも明らかになった.¹²⁾ 次に, 核内で濃度上昇するカルシウムイオンの由来について追究した. 核内のカルシウムイオンの由来としては, 核内(核膜)のカルシウムストアーからの遊離と核膜を介した細胞質からの流入の2通りが考えられた. そこで, 小胞体の Ca^{2+} -ATPase の阻害剤である thapsigargin を用いて2つの可能性を検討した. その結果, 細胞膜のカルシウムチャンネルを通して, 細胞質内に入ったカルシウムイオンは核内に流入することなどから, 核内のカルシウムイオン

の大部分は核膜を通して流入したものであると考えられた.¹³⁾

2-2. 分泌顆粒の細胞内動態 マスト細胞では, 細胞内カルシウムイオン濃度上昇に引き続いて, 脱顆粒反応が起こる. 脱顆粒反応においては, 細胞質に存在している分泌顆粒中の種々の炎症性化学伝達物質が細胞外に放出され, アレルギー反応の引き金になる. これまで, 脱顆粒の解析には, 多くの細胞を刺激して放出された化学伝達物質や酵素を定量する方法や細胞を固定して電子顕微鏡で細胞内顆粒を観察する方法が使われており, 脱顆粒反応過程を生きた単一細胞で追究する試みはほとんどなされてこなかった. そこで, マスト細胞の脱顆粒過程を可視化解析するために, 細胞内の顆粒膜と細胞膜に存在する4回膜貫通型の膜蛋白質 CD63 に着目し

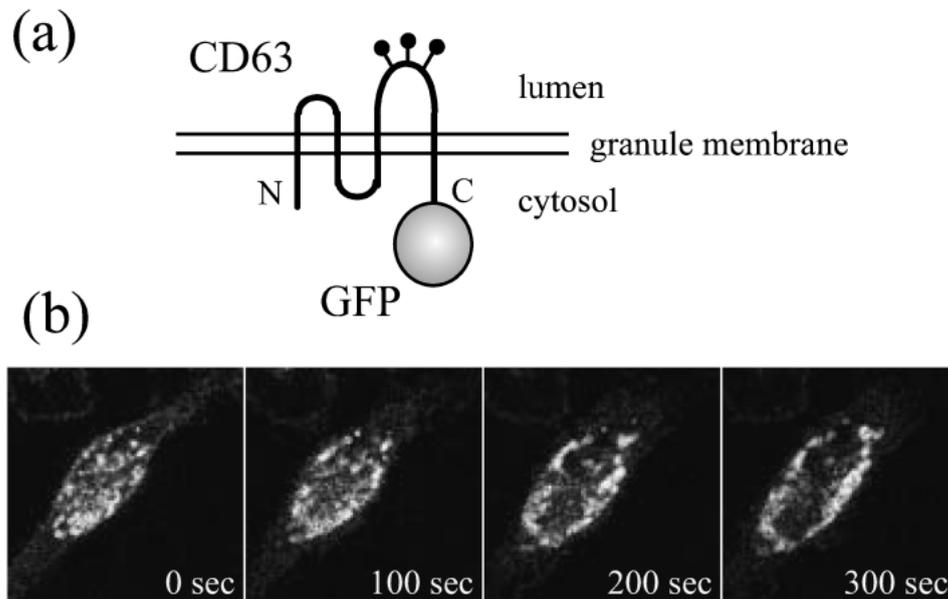


Fig. 4. Analysis of the Movements of Secretory Granules

(a) Schematic representation of CD63-GFP in the membrane of intracellular granules. CD63 contains four putative transmembrane domains and three N-glycosylation sites (●) clustered together on the surface of the lumen side. (b) Sequential fluorescence images of CD63-GFP in an RBL-2H3 cell. A large number of granules moved toward the plasma membrane after the addition of antigen.

て実験を行った (Fig. 4).^{14,15)} まず, CD63 に対するモノクローン抗体を用いて, 抗原刺激に伴う細胞膜上の CD63 の量的変化を測定したところ, 時間とともに顕著に増加することが分かった.¹⁶⁾ また, この時間変化は脱顆粒の時間変化とよく対応していた. このことから, 抗原刺激後に細胞膜上で CD63 が増加するのは, 脱顆粒の際に分泌顆粒膜が細胞膜と融合し, 顆粒膜の CD63 が細胞膜に移行したためであると考えられた. そこで次に, CD63 と GFP のキメラ蛋白質 (CD63-GFP) を用いれば, 分泌顆粒の細胞内動態と細胞膜との融合が観察できると考え, 測定を行った. RBL-2H3 細胞に CD63-GFP を発現させたところ, Fig. 4 に示したように CD63-GFP は細胞内顆粒と細胞膜に分布していた. 細胞内顆粒の動きを計測すると, 細胞を刺激する前は一部の顆粒がチューブリンに沿って直線的に動いていたが, 大部分の顆粒は動いていなかった. ところが, 細胞を抗原刺激すると, 顆粒は毎秒約 $0.1 \mu\text{m}$ の平均速度で細胞膜方向に移動し始め, 数分後には細胞膜付近に集積した (Fig. 4).¹⁷⁾ また, このように細胞膜方向に移動した顆粒が細胞膜と融合し, 融合の際に細胞膜が波打つラフリングが起こることも観察できた. このように CD63-GFP を利用することで, 脱顆粒過程を生きた単一細胞で追究するこ

とが可能になった.

3. 細胞質から核へのシグナル伝達

これまで述べてきた脱顆粒反応は即時型アレルギー反応の初期相の引き金になるが, 遅発相の誘導にはマスト細胞が産生する炎症性サイトカインが関与している. 炎症性サイトカインの産生には, 刺激応答に伴って細胞質から核へ移行する核移行蛋白質が重要な役割を果たしている. ここでは, 核移行蛋白質の1つである MAP (mitogen-activated protein) キナーゼ (MAPK) に着目して, その動的な特性を追究した結果を述べる.

MAPK は種々の増殖因子によって共通に活性化されるセリン/スレオニンリン酸化酵素である. MAPK は活性化されると核に移行して, 転写因子を始めとする様々な基質をリン酸化することにより転写制御に深く寄与していると考えられている. このような MAPK の活性化には MAPK カスケードと呼ばれる一連のシグナル蛋白質が重要な役割を果たしている.¹⁸⁾ MAPK カスケードには Fig. 5 のように3種類の蛋白質 (酵素) が関与している. それら3種類のキナーゼは MAPK, MAPKK (MAPK キナーゼ) 及び MAPKKK (MAPKK キナーゼ) と呼ばれている. マスト細胞などの免疫細胞においても抗原刺激によって MAPK の活性化が起こること

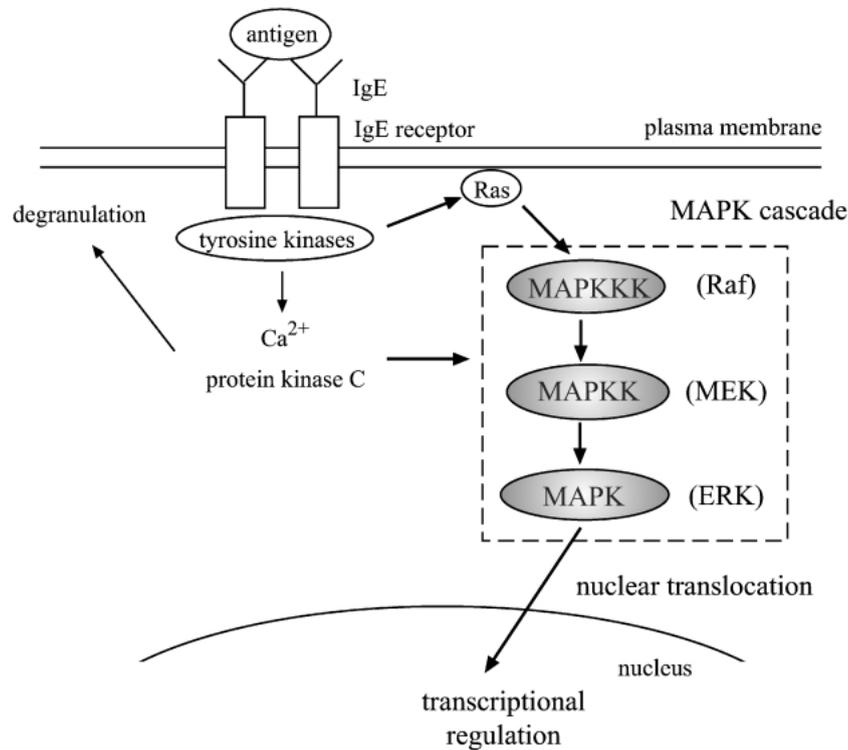


Fig. 5. Activation of MAP Kinase Cascade

Antigen promotes the activation of MAPKKK, which phosphorylates MAPKK, which in turn activates MAPK. Then, activated MAPK translocates to the nucleus from the cytoplasm. Intracellular calcium ion concentration and protein kinase C regulate the activation of MAPK cascade.

が知られており，MAPKが細胞機能の発現に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし，細胞の活性化に伴うMAPKの細胞内動態を生きた細胞で観察した例はほとんどなく，リン酸化と核移行との時間的な対応付けやMAPKの核移行におけるMAPKKの役割などは明らかになっていなかった。そこで，MAPKの細胞内動態をリアルタイムで追究するため，MAPKの1つであるERK2とGFPのキメラ蛋白質（GFP-ERK2）を作製し，RBL-2H3細胞に発現させた。そして，抗原刺激に伴うERK2の細胞内動態を追究することを試みた。その結果の一例をFig. 6に示した。刺激する前には，GFP-ERK2は細胞質だけでなく一部核にも存在していた。次に，この細胞を抗原刺激したところ，ERK2は刺激の約2分後に核に移行し始め，6-7分後に核への局在が最大になった。そして，その後核から排出され，15分後にはほぼ元の状態に戻る様子が観察された。これとは別に，ウェスタンブロットによりERK2のリン酸化を調べたところ，刺激前にはERK2はほとんどリン酸化されていないが，刺激後6-7分でリン酸化が最大にな

り，その後減少することが分かった。このことから，ERK2はリン酸化されると速やかに細胞質から核へ移行し，核内で脱リン酸化されるとまた速やかに細胞質へ排出されると考えられた。¹⁹⁾

さて，既に述べたようにMAPKはMAPKKによってリン酸化され，活性化される。それではMAPKKの細胞内動態はどのようになっているのだろうか。そのことを明らかにするために，MAPKKの1つでERK2をリン酸化することが知られているMEKに着目し，ERK2とMEKの単一細胞における細胞内動態をGFP誘導体を利用して追究することを試みた。ERK2にはYFP（yellow fluorescent protein），MEKにはCFP（cyan fluorescent protein）を融合させてRBL-2H3細胞に共発現させたところ，ERK2とMEKはともに細胞質に局在しており，核にはほとんど観察されなかった。次に，この細胞を抗原刺激したところ，ERK2は単独発現の場合と同じように，細胞質から核に移行し，その後核から排出された。一方，MEKはこのような核シャトルは起こらず，細胞質に留まったままであるようにみえた。

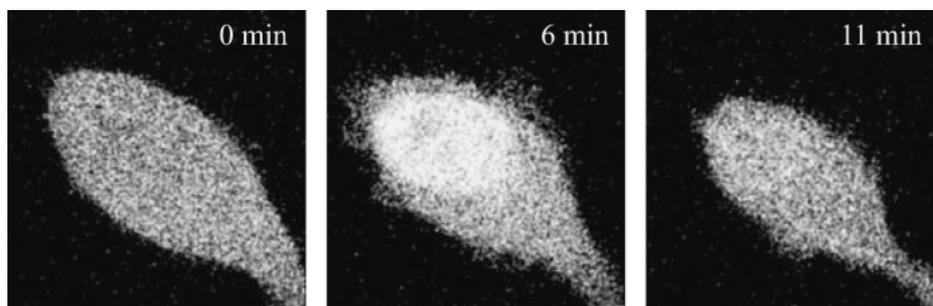


Fig. 6. Nuclear Shuttling of MAPK (ERK2)

GFP-ERK2 translocated to the nucleus after the addition of antigen. The import of ERK2 reached the maximum at 6–7 min, and then the imported ERK2 was exported from the nucleus.

ERK2のように短い時間で核移行又は核排出が起こる蛋白質の多くは、核移行シグナル及び核排出シグナルと呼ばれる10残基程度の特徴的なアミノ酸配列を持っている。一般的な核移行シグナルはリジンやアルギニンといった塩基性アミノ酸に富み、核排出シグナルにはロイシンやイソロイシンといった疎水性のアミノ酸が規則的に並んでいる。²⁰⁾ところが、ERK2には核移行シグナルに相当する配列も核排出シグナルに相当する配列も見当たらない。一方、MEKには核排出シグナルが存在することが知られている。²¹⁾また、非リン酸化状態のMEKとERK2は結合し易いことが生化学的な実験から明らかになっている。²²⁾これらの結果をわれわれの結果と考え合わせると、①刺激前のマスト細胞では、ERK2はMEKと細胞質内で結合しており、MEKの持つ核排出シグナルによってERK2は細胞質に留まっている。②抗原刺激によって細胞が活性化されると、MEKによるERK2のリン酸化が起こり、ERK2はMEKから解離して核へ移行する。③核内のERK2は脱リン酸化酵素により脱リン酸化されるとMEKと結合して速やかに核から排出されると推察された。¹⁹⁾MEKは抗原刺激後も細胞質に留まったままであるようにみえたが、実際は核に入らないのではなく、核に入ったあとに自身の持つ核排出シグナルによってERK2とともに速やかに核排出されると考えられた。この仮説を検証すべく、現在、ERK2とMEKの細胞内動態に及ぼす核排出阻害剤や脱リン酸化酵素の影響を検討中であり、現在のところ、これを支持する結果が得られている。

4. マスト細胞と神経細胞の相互作用

これまでは、マスト細胞のFcεRIを介した活性化の際の細胞内シグナル伝達機構に着目してきた

が、生体内で免疫細胞は抗原によってのみ機能制御を受けている訳ではない。特に、近年、免疫系は神経系と相互作用していると考えられ始めている。^{23,24)}中でも、皮膚、消化組織、気道、硬膜などでは、多くのマスト細胞が神経線維の近傍に存在している様子が観察されており、両細胞が接着を介して相互作用していると考えられている。^{25–27)}しかし、両者の相互作用を追究する適切な研究手段がほとんどなく、その実体はこれまで明らかにならなかった。そこでわれわれは、マスト細胞と神経細胞の*in vitro*共存培養系を用いて、両細胞の相互作用の分子機構を明らかにすることを試みた。

新生児マウスから上頸神経節初代培養細胞SCG (superior cervical ganglia)を単離し、マトリゲルでコートした培養ディッシュを用いて神経成長因子存在下で2日間培養すると、神経突起が伸長した。そこで、マスト細胞を添加して3日間共存培養すると、神経突起とマスト細胞が接着する様子が観察された。^{28–30)}SCGの神経突起とRBL-2H3細胞の接着の一例をFig. 7に示した。この画像では、神経突起の先端の成長円錐がRBL-2H3細胞と約7 μmに渡って接着していた。^{31,32)}RBL-2H3細胞は恒常的に神経成長因子NGF (nerve growth factor)を産生しており、神経突起はNGFの濃度勾配によって、RBL-2H3細胞に向かって伸長していくと推察された。^{33,34)}

次に、両者が相互作用しているか否かをカルシウムイオン濃度変化を指標に追究した。まず、ブラジキニン又はサソリ毒を用いてSCGを特異的に刺激すると、刺激直後に神経突起のカルシウムイオン濃度が上昇したあとに、RBL-2H3細胞でも著しいカルシウムイオン濃度の上昇が起こった。³⁰⁾神経突起

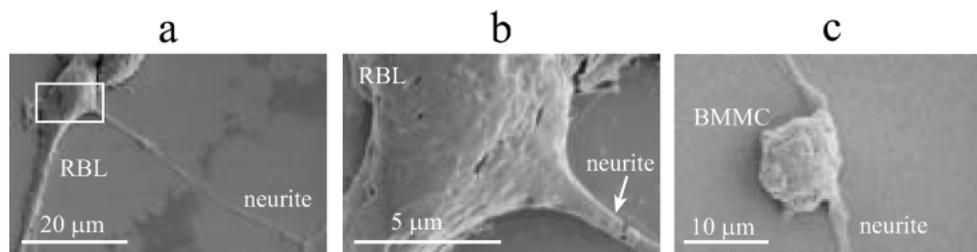


Fig. 7. Scanning Electron Microscopic Images of the Attachments between SCG and Mast Cells

(a) A representative SCG neurite-RBL cell contact. (b) The enlarged image of a box in (a). (c) A representative SCG neurite-BMMC contact.

と接着していない RBL-2H3 細胞ではこのようなカルシウムイオン濃度の上昇は全く起こらなかった。このことから、SCG から RBL-2H3 細胞へ接着部位を介して活性化シグナルが伝達されていると考えられた。そこで、そのメディエータを明らかにすることを試みた。生体内でマスト細胞と接着している神経細胞にはサブスタンス P が含まれていること²⁵⁾ また、サブスタンス P がマスト細胞を活性化すること³⁵⁾ が報告されていることなどから、サブスタンス P がメディエータとして働いていると考え、研究を進めた。SCG と RBL-2H3 細胞の共存培養ディッシュにサブスタンス P に対する中和抗体を添加したあとに SCG を刺激すると、神経突起のカルシウムイオン濃度は上昇するが、RBL-2H3 細胞のカルシウム上昇が中和抗体の濃度依存的に抑制された。また、RBL-2H3 細胞のカルシウム応答は、サブスタンス P の受容体である NK-1 (neurokinin-1) 受容体のアンタゴニスト (CP-99,994-01) を前処理した場合にも、顕著に抑制された。これらの結果から、神経突起から RBL-2H3 細胞へのシグナル伝達にはサブスタンス P がメディエータとして働いていることが明らかになった。³⁰⁾

次に、RBL-2H3 細胞から神経突起への逆方向のシグナル伝達を追究した。抗 IgE 受容体抗体で RBL-2H3 細胞を特異的に刺激すると、RBL-2H3 細胞のカルシウムイオン濃度が上昇した後、数十秒の lag-time のあとに、RBL-2H3 細胞と接着している神経突起において一過的なカルシウム上昇が観察された。^{30,36)} このことから、マスト細胞から SCG へも活性化シグナルが伝達していることが分かった。このようにして、マスト細胞と神経細胞は、接着部位を介して、他の細胞の介在なく直接相互作用していることが明らかになった。

神経突起の活性化に伴って、マスト細胞でカルシ

ウムイオン濃度上昇が起こることが明らかになったが、神経突起からの活性化シグナルにより、マスト細胞に脱顆粒が引き起こされるのだろうか。このことを調べるにはマスト細胞の脱顆粒反応を単一細胞レベルで追究する必要がある。そこで、前述の CD63-GFP を利用して、マスト細胞の脱顆粒を追究した。CD63-GFP を発現した RBL-2H3 細胞を SCG と共存培養し、分泌顆粒の細胞内動態と細胞膜のラッフリングを追究することを試みた (Fig. 8)。ブラジキニンやサソリ毒で神経細胞を特異的に活性化すると、神経細胞との接着部位の近傍で局所的に RBL-2H3 細胞の細胞内顆粒の細胞膜への移行と細胞膜のラッフリングが起こることが分かった。³⁷⁾ これらの結果から、神経突起からの刺激に伴って、マスト細胞では神経突起との接着部位近傍で局所的に脱顆粒反応が起こっていることが明らかになった。^{37,38)} マスト細胞は、抗原刺激の場合には細胞膜全体で刺激を受けているのに対して、神経細胞からの刺激の場合には接着部分で局所的に刺激を受けているため、脱顆粒反応も局所的に起こっていると推察された。

ここまではマスト細胞株の RBL-2H3 細胞を用いて神経細胞との相互作用を調べてきた。次に、より生体のマスト細胞に近い性質を持っていると考えられている骨髄由来マスト細胞 BMMC (bone marrow-derived mast cell) を用いて、神経細胞との相互作用を追究した。BMMC はマウスから骨髄細胞を単離して、IL-3 存在下で 3 週間培養して分化させることによって得た。BMMC は浮遊性の細胞であるが、神経細胞と共存培養すると、神経突起の上に乗るように接着した (Fig. 7)。BMMC は幹細胞因子 SCF (stem cell factor) や IL-4 の存在下で培養すると NK-1 受容体の発現量が増加することが知られている。³⁹⁾ そこで、種々の条件で培養して NK-1

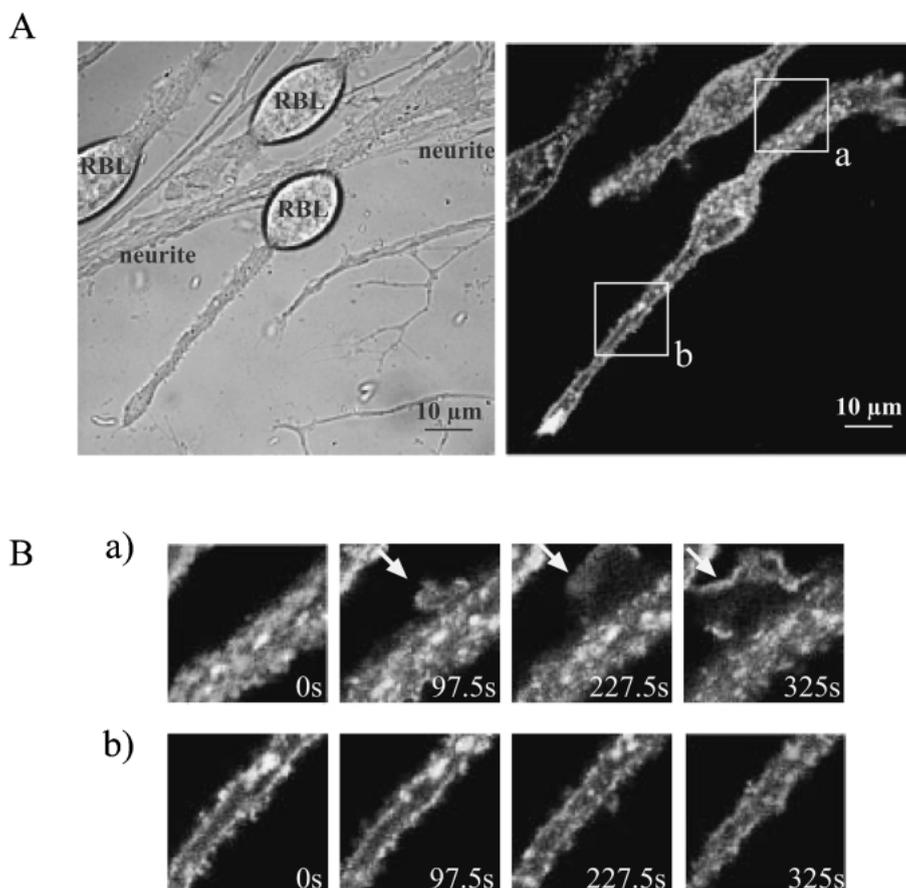


Fig. 8. Local Membrane Ruffling in Mast Cells at the Specific Site of Contact with Activated Neurite

(A) A representative neurite-RBL cell co-culture. A phase contrast image (left) shows a neurite in contact with the upper pseudopodium of an RBL cell. A right panel shows the fluorescent RBL cells only. Boxes (a) and (b) are enlarged in (B) in time series. (B) RBL cell membrane ruffling occurs only on the pseudopodium in contact with the bradykinin-stimulated neurite (a: arrows indicate membrane distortions) and not on the pseudopodium not in contact with a neurite (b). Sequential images are shown for the times indicated, post-addition of bradykinin.

受容体の発現量の異なる BMMC を調製し、SCG の活性化に伴う BMMC のカルシウム応答率をそれぞれ測定した。その結果、NK-1 受容体を発現していない BMMC ではカルシウム応答がほとんどみられなかったが、NK-1 受容体の発現量が増加するにつれて、BMMC の応答率が増加していくことが分かった (Fig. 9)。⁴⁰⁾ サブスタンス P は、主に 2 つの経路でマスト細胞を活性化するとされている。1 つは直接 G 蛋白質を活性化する経路 (高濃度のサブスタンス P が必要) で、もう 1 つは NK-1 受容体を介して活性化する経路 (低濃度のサブスタンス P で活性化) である。^{41,42)} これらの結果から、神経細胞によるマスト細胞の活性化においては、神経から遊離する低濃度のサブスタンス P が NK-1 受容体を介して効率よくマスト細胞に活性化シグナルを伝達していると考えられた。

最後に、両細胞の効率的な相互作用を担う接着分

子を明らかにすることを試みた。接着分子としては、神経細胞間のシナプス形成に重要な役割を果たしているカドヘリンと SgIGSF/SynCAM (spermatogenic immunoglobulin superfamily/synaptic cell adhesion molecule) に着目して研究を進めた。まず、カドヘリンの結果について述べる。

カドヘリンは、膜 1 回貫通型の蛋白質で、多くの細胞の細胞間接着に関与するカルシウムイオン依存性の接着分子である。カドヘリンはいくつかのタイプに分けられるが、いずれのカドヘリンも 2 量体を形成し、同じタイプのカドヘリンとホモフィリックに結合することが知られている。⁴³⁾ まず、SCG と BMMC におけるカドヘリンの発現をウェスタンブロットで調べた。その結果、SCG と BMMC には、いずれも N-カドヘリンと E-カドヘリンが発現していた。BMMC におけるカドヘリンの細胞内分布を免疫染色で調べたところ、N-カドヘリンと

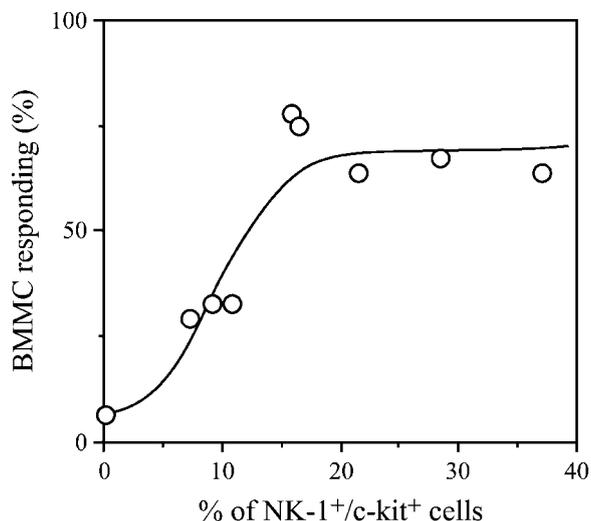


Fig. 9. Correlation between NK-1 Receptor Expression and Neurite-induced BMMC Response

E- カドヘリンとともに細胞質に顆粒状に分布していた。ところが、SCG と 3 日間共存培養して神経突起と接着している BMMC では、E- カドヘリンは細胞質に局在したままであったが、N- カドヘリンは細胞膜に局在していた。³²⁾ カドヘリンを介した細胞間接着を細胞質側から支持している β - カテニン は、N- カドヘリンと同様に、細胞質に顆粒状に存在していたが、神経突起と接着すると細胞膜近傍に局在するようになった。このことから、SCG と BMMC の接着には N- カドヘリンが関与していると考えられた。

カドヘリンと並行して、SgIGSF/SynCAM についても検討した。SgIGSF/SynCAM は細胞外にイムノグロブリン様ドメインを持つ膜 1 回貫通型の蛋白質で、神経細胞のシナプス間隙でホモフィリックな接着分子として働いていることが知られている。⁴⁴⁾ また、マスト細胞における SgIGSF/SynCAM の発現には小眼球症転写因子 MITF (microphthalmia transcription factor) が必須であり、野生型マウス由来の BMMC (+/+ - BMMC) は SgIGSF/SynCAM を発現しているのに対して、MITF 全欠失マウスから調製した BMMC (tg/tg - BMMC) は SgIGSF/SynCAM を発現していないことが明らかにされている。⁴⁵⁾ そこで、まず、これら BMMC を SCG と共存培養して両者の接着効率を調べた。その結果、SgIGSF/SynCAM を発現していない tg/tg - BMMC の SCG への接着効率は、

Table 1. Attachment of Various Types of Mast Cells to SCG Neurites

Type of mast cells	Number of attached mast cells per SCG neuron
+ / + - BMMC	0.203 \pm 0.014
tg/tg - BMMC	0.068 \pm 0.014**
tg/tg - BMMC ^{SgIGSF/SynCAM}	0.180 \pm 0.019
tg/tg - BMMC ^{Vector}	0.070 \pm 0.017**
BMMC from SgIGSF/SynCAM-transgenic mouse 1	0.223 \pm 0.022
BMMC from SgIGSF/SynCAM-transgenic mouse 2	0.190 \pm 0.022
IC-2	0.021 \pm 0.001
IC-2 ^{SgIGSF/SynCAM}	0.164 \pm 0.015**
IC-2 ^{KIT}	0.023 \pm 0.001
IC-2 ^{SgIGSF/SynCAM + KIT}	0.161 \pm 0.020**

The number of mast cells that attached to SCG neurites sprouting from one neuron was calculated by observing 100–300 neurons per dish of coculture. The numbers of the dishes examined are 7 and 8 for BMMC and IC-2 cells, respectively. Values are the means \pm S.E. ** $p < 0.01$, by Student's *t* test, compared with the value of +/+ - BMMC. ** $p < 0.01$, by Student's *t* test, compared with the value of IC-2 cells.

SgIGSF/SynCAM を発現している +/+ - BMMC の約 3 分の 1 であることが分かった (Table 1).⁴⁶⁾ そこで、遺伝子導入法やトランスジェニック法により tg/tg - BMMC に SgIGSF/SynCAM を発現させ、SCG との接着効率を調べた。すると、SgIGSF/SynCAM を発現させた tg/tg - BMMC においては SCG に対する接着効率が増大し、+/+ - BMMC と同程度になった。また、SgIGSF/SynCAM の細胞外ドメインを認識する中和抗体の存在下で +/+ - BMMC と SCG を共存培養したところ、両者の接着効率は中和抗体の濃度依存的に減少した。⁴⁶⁾ さらに、SgIGSF/SynCAM は +/+ - BMMC の細胞膜と神経突起に存在しており、両者の接着部位に強く集積していることが分かった。⁴⁶⁾ これらの結果から、神経突起とマスト細胞の接着に SgIGSF/SynCAM が重要な役割を果たしていると考えられた。

マスト細胞と神経細胞の接着における SgIGSF/SynCAM の役割をさらに明らかにするために、マスト細胞株 IC-2 細胞を用いても実験を行った。IC-2 細胞は SgIGSF/SynCAM を発現しておらず、繊維芽細胞との接着に関与している膜蛋白質 KIT も発現していない。そこで、IC-2 細胞に SgIGSF/SynCAM を発現させた細胞、KIT を発現させた細胞、SgIGSF/SynCAM と KIT の両方を発現させた細胞を作製して、神経細胞との接着効率を調べた。

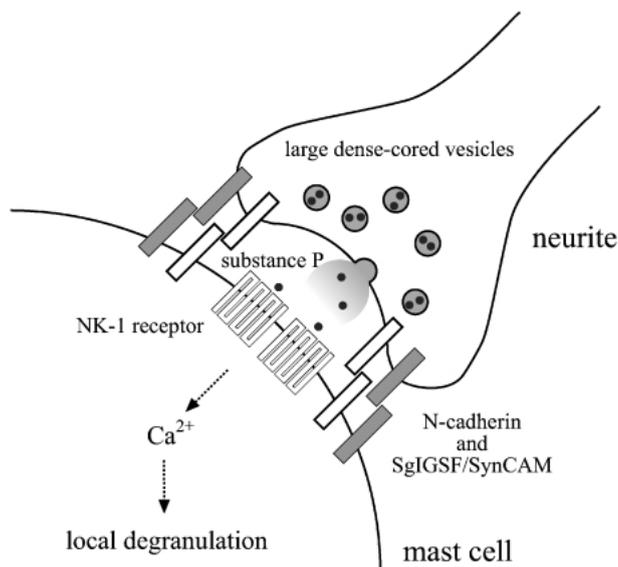


Fig. 10. Schematic Representation of the Interaction between SCG Neurites and Mast Cells

その結果、SgIGSF/SynCAM を発現させた細胞では、約 8 倍接着効率が高いことが分かった (Table 1).⁴⁶⁾ 一方、KIT は神経細胞との接着に関与していないと考えられた。さらに、神経細胞の活性化に伴う IC-2 細胞の応答率を調べたところ、SgIGSF/SynCAM を発現している場合には発現していない場合に比べて、応答率が 2 倍高くなることが明らかになった。⁴⁶⁾ このことから、SgIGSF/SynCAM はマスト細胞と神経突起との間の成熟した接着構造の形成に深く関与しており、より安定したコミュニケーションの場を提供していると考えられた。

Figure 10 に神経細胞とマスト細胞の接着を介した相互作用を模式的に示した。SgIGSF/SynCAM や N-カドヘリンは、マスト細胞と神経突起の接着部位に集積しており、両細胞の接着と、サブスタンス P と NK-1 受容体を介した両者の効率的なシグナル伝達に密接に関与していることが明らかになった。

5. おわりに

本文では、顕微光学法を用いて、まず抗原刺激に伴うマスト細胞の活性化の各過程に着目してシグナル分子の細胞内動態を追及した結果を述べてきた。そして、カルシウムイオン濃度が細胞質内だけでなく核内でも上昇していること、分泌顆粒が細胞膜に向かって移動し細胞膜と融合すること、転写活性を調節する MAP キナーゼが細胞質と核の間を速やか

にシャトルしていることを見出した。このような単一細胞におけるシグナル分子の可視解析技術は、筆者が研究を始めたころにはほとんど確立されていなかったが、その後急速な進展を遂げ、現在では細胞機能の研究に広く用いられるようになっている。その結果、生化学や分子生物学の発展もあり、細胞機能解析の研究は飛躍的に進歩したと言える。われわれは、これら顕微光学法を神経細胞とマスト細胞の細胞間相互作用の研究へと展開し、両細胞の相互作用を担う接着分子とメディエータを明らかにしてきた。そして、両者が接着部位を介して効率的で直接的な機能制御を行っていることを見出した。

花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などに代表されるアレルギー炎症疾患は、患者数の増加と症状の重症化・難治化が重大な社会問題になってきている。そのため、アレルギー性疾患の発症、増悪、慢性化の機構解明は緊急かつ重要な研究課題になっている。マスト細胞はアレルギー反応において中心的な役割を果たしており、IgE 依存的な機構だけでなく、心理的なストレスなどによる IgE 非依存的な機構によっても活性化される。本研究により、その分子機構の一端が明らかになったと考えられる。マスト細胞はアレルギー性炎症反応において、外部の環境変化に応答するターゲットとしての役割と、周囲の細胞に影響を及ぼすエフェクターとしての役割を担っている。これらのことを念頭に置きながら、今後も顕微光学法の特徴を生かして、アレルギー反応におけるマスト細胞の機能発現の分子機構を明らかにしていきたいと考えている。これらの基礎的な知見が蓄積されれば、アレルギー性疾患に対する治療薬開発に繋がると期待している。

謝辞 本研究は、名古屋市立大学大学院薬学研究所生体超分子システム解析学分野で行われたものであります。研究の遂行に当たり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました中西 守教授に深く感謝申し上げます。また、多くの有益なご助言を頂きました手島玲子博士 (国立医薬品食品衛生研究所)、平嶋尚英助教授 (名古屋市立大学) に心から感謝申し上げます。神経細胞とマスト細胞の相互作用の研究で、多大なご協力を頂いた John Bienenstock 教授 (McMaster 大学)、北村幸彦教授 (大阪大学)、伊藤彰彦博士 (神戸大学)、鈴木 亮助手 (名古屋市立大学) に厚

くお礼申し上げます。研究の一部を担当していた大学院生、学生の皆様に心からお礼申し上げます。また、本研究をまとめるに当たり、多大なご支援を賜った渡邊 淳教授（愛知学院大学）に深謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Jordan J. D., Landau E. M., Iyengar R., *Cell*, **103**, 193–200 (2000).
- 2) Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R. Y., *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440–3450 (1985).
- 3) Adams S. R., Harootunian A. T., Buechler Y. J., Taylor S. S., Tsien R. Y., *Nature*, **349**, 694–697 (1991).
- 4) Kojima H., Sakurai K., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 373–375 (1998).
- 5) van Roessel P., Brand A. H., *Nat. Cell Biol.*, **4**, E15–E20 (2002).
- 6) Blank U., Rivera J., *Trends Immunol.*, **25**, 266–273 (2004).
- 7) Teshima R., Nakamura R., Furuno T., Nakanishi M., *Bioimages*, **7**, 97–103 (1999).
- 8) Galli S. J., Costa J. J., *Allergy*, **50**, 851–862 (1995).
- 9) Kato K., Nakanishi M., Arata Y., Teshima R., Terao T., Miyamoto H., *J. Biochem.*, **102**, 1–4 (1987).
- 10) Millard P. J., Gross D., Webb W. W., Fewtrell C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 1854–1858 (1988).
- 11) Nakato K., Furuno T., Inagaki K., Teshima R., Terao T., Nakanishi M., *Eur. J. Biochem.*, **209**, 745–749 (1992).
- 12) Furuno T., Hamano T., Nakanishi M., *Biophys. J.*, **64**, 665–669 (1993).
- 13) Okamoto Y., Furuno T., Hamano T., Nakanishi M., *Biochem. J.*, **305**, 1011–1015 (1995).
- 14) Metzelaar M. J., Wijngaard P. L., Peters P. J., Sixma J. J., Nieuwenhuis H. K., Clevers H. C., *J. Biol. Chem.*, **266**, 3239–3245 (1991).
- 15) Kitani S., Berenstein E., Mergenhagen S., Tempst P., Siraganian R. P., *J. Biol. Chem.*, **266**, 1903–1909 (1991).
- 16) Furuno T., Teshima R., Kitani S., Sawada J., Nakanishi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 740–744 (1996).
- 17) Amano T., Furuno T., Hirashima N., Ohyama N., Nakanishi M., *J. Biochem.*, **129**, 739–744 (2001).
- 18) Robinson M. J., Cobb M. H., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 180–189 (1997).
- 19) Furuno T., Hirashima N., Onizawa S., Sagiya N., Nakanishi M., *J. Immunol.*, **166**, 4416–4421 (2001).
- 20) Weis K., *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 185–189 (1998).
- 21) Fukuda M., Gotoh I., Gotoh Y., Nishida E., *J. Biol. Chem.*, **271**, 20024–20028 (1996).
- 22) Fukuda M., Gotoh Y., Nishida E., *EMBO J.*, **16**, 1901–1908 (1997).
- 23) Ottaway C. A., *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **20**, 511–529 (1991).
- 24) Cohen N., Moynihan J. A., Ader R., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **105**, 101–106 (1994).
- 25) Stead R. H., Tomioka M., Quinonez G., Simon G. T., Felten S. Y., Bienenstock J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2975–2979 (1987).
- 26) Arizono N., Matsuda S., Hattori T., Kojima K., Maeda T., Galli S. J., *Lab. Invest.*, **62**, 626–634 (1990).
- 27) Rozniecki J. J., Dimitriadou V., Lambrecht-Hall M., Pang X., Theoharides T. C., *Brain Res.*, **849**, 1–15 (1999).
- 28) Blennerhassett M. G., Bienenstock J., *Neurosci. Lett.*, **120**, 50–54 (1991).
- 29) Blennerhassett M. G., Tomioka M., Bienenstock J., *Cell Tissue Res.*, **265**, 121–128 (1991).
- 30) Suzuki R., Furuno T., McKay D. M., Wolvers D., Teshima R., Nakanishi M., Bienenstock J., *J. Immunol.*, **163**, 2410–2415 (1999).
- 31) Ohshiro H., Suzuki R., Furuno T., Nakanishi M., *Immunol. Lett.*, **74**, 211–214 (2000).
- 32) Suzuki A., Suzuki R., Furuno T., Teshima R., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1891–1894 (2004).
- 33) Leon A., Buriani A., Dal Toso R., Fabris M., Romanello S., Aloe L., Levi-Montalcini R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 3739–3743 (1995).
- 34) Suzuki M., Furuno T., Teshima R., Sawada J., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1267–1270 (1998).

- 35) Janiszewski J., Bienenstock J., Blennerhassett M. G., *Am. J. Physiol.*, C138–C145 (1994).
- 36) Suzuki R., Furuno T., Teshima R., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 291–294 (2001).
- 37) Mori N., Suzuki R., Furuno T., McKay D. M., Wada M., Teshima R., Bienenstock J., Nakanishi M., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283**, C1738–C1744 (2002).
- 38) Ohshiro H., Suzuki R., Furuno T., Nakanishi M., *Immunol. Lett.*, **74**, 211–214 (2000).
- 39) van der Kleij H. P. M., Ma D., Redegeld F. A., Kraneveld A. D., Nijkamp F. P., Bienenstock J., *J. Immunol.*, **171**, 2074–2079 (2003).
- 40) Furuno T., Ma D., van der Kleij H. P. M., Nakanishi M., Bienenstock J., *Neurosci. Lett.*, **372**, 185–189 (2004).
- 41) Mousli M., Bueb J. L., Bronner C., Rouot B., Landry Y., *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 358–362 (1992).
- 42) Ogawa K., Nabe T., Yamamura H., Kohno S., *Eur. J. Pharmacol.*, **374**, 285–291 (1999).
- 43) Takeichi M., *Science*, **251**, 1451–1455 (1991).
- 44) Biederer T., Sara Y., Mozhayeva M., Atasoy D., Liu X., Kavalali E. T., Südhof T. C., *Science*, **297**, 1525–1531 (2002).
- 45) Ito A., Jippo T., Wakayama E., Morii E., Koma Y., Onda H., Nojima H., Iseki S., Kitamura Y., *Blood*, **101**, 2601–2608 (2003).
- 46) Furuno T., Ito A., Koma Y., Watabe K., Yokozaki H., Bienenstock J., Nakanishi M., Kitamura Y., *J. Immunol.*, **174**, 6934–6942 (2005).