2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

学　校　名	**岩　手　医　科　大　学**	研究所名等		
研 究 課 題	マスト細胞の分泌刺激に対する即時型応答の全容理解 ー3Dイメージングによる脱顆粒とマイクロベシクル産生の解析ー		研 究 分 野	医　　学
キ ー ワ ー ド	① マスト細胞　② 脱顆粒　③ マイクロベシクル			

〇研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
東　尾　浩　典	岩　手　医　科　大　学 教 養 教 育 セ ン タ ー	准　教　授	研究統括、分子生物学／生化学実験、ライブイメージング

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
齋　野　朝　幸	岩　手　医　科　大　学 医　　学　　部	教　　授	ライブイメージング

マスト細胞の分泌刺激に対する即時型応答の全容理解
－3D イメージングによる脱顆粒とマイクロベシクル産生の解析－

1. 研究の目的

マスト細胞は、花粉症・気管支喘息・アナフィラキシーといった I 型(即時型)アレルギーへの関与で知られる、本来感染防御を担う免疫細胞である。抗原と IgE によって細胞膜上の IgE 受容体が架橋されると活性化され、細胞内 Ca^{2+}濃度上昇およびプロテインキナーゼ C (PKC)活性化を直接の引き金として、分泌顆粒に貯留している生理活性物質等の内容物を脱顆粒(開口放出)する。脱顆粒様式は細胞膜―分泌顆粒間、分泌顆粒―分泌顆粒間の膜融合が組み合わさった compound exocytosis を中心とするものと考えられているが実態は未解明である。そこで私共は、分泌顆粒の挙動と脱顆粒を同時検出可能な脱顆粒インジケーターCD63-pHluorin/mCherry を考案し、3D タイムラプス観察によるマスト細胞株 RBL-2H3 の脱顆粒様式の可視化に取り組んでいる。本脱顆粒イメージング系では「1 細胞丸ごとの少々マクロな視点」で「分泌顆粒の挙動と compound exocytosis の軌跡」をモニターする。これまでの低倍率での観察により、1) 分泌顆粒は複数が集合して大きなクラスターを形成している、2) 抗原刺激(IgE 感作+抗原添加)では細胞辺縁で脱顆粒が生じている、また 3) TPA+A23187 刺激(細胞内 Ca^{2+}濃度上昇および PKC 活性化を惹起する薬剤の添加)ではクラスター内で脱顆粒が compound exocytosis 様に生じていることを示唆する結果を得た。

また、イメージング後の細胞外液に、数百 nm～1.5 μm 程度の大きな膜構造が分泌刺激依存的に含まれてくること、それらがしばしば脱顆粒インジケーターの蛍光を伴っていることが見出され、分泌顆粒を内包するマイクロベシクル(細胞膜由来の細胞外小胞)の産生が示唆された。マイクロベシクルについては細胞種を問わず知見がないが、多胞体由来のエクソソーム(30～150 nm)と同様に、細胞間情報伝達ツールとして働いている可能性がある。この結果から、マイクロベシクル形成も分泌刺激に対する即時型応答の一つであると考えられた。

私共の脱顆粒イメージング系は、従来の系とは異なり、マイクロベシクルが形成されうる「細胞上部表面」を観察することが可能である。本研究では、分泌刺激に対する即時型応答の包括的理解を目指し、本イメージング系を用いて「細胞内外の」膜構造とその変化を精細に捉え、それらを支える分子機構を「目で見る」遺伝子機能解析により明らかにすることを試みている。

2. 研究の計画

(1) 抗原刺激／TPA+A23187 刺激に対する即時型応答の高倍率 3D タイムラプス観察

上記脱顆粒インジケーターおよび細胞膜マーカー(細胞膜タンパク質と近赤外光タンパク質 miRFP713 の融合タンパク質)を RBL-2H3 細胞に発現させ、各分泌刺激の存在下／非存在下で共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3D タイムラプス観察を行う。miRFP713 蛍光は細胞膜を、mCherry 蛍光は分泌顆粒の挙動を、また pHluorin 蛍光は脱顆粒を(脱顆粒が生じると蛍光を発する)それぞれ可視化する。×100 対物レンズ・×5 デジタルズーム・Z 軸 0.1 μm 刻み・1024×1024 pixels にて 2 分おきに 20 分間画像取得を行ったのち立体構築し、分泌顆粒クラスターの構造と動態、TPA+A23187 刺激時のクラスター内の compound exocytosis 様脱顆粒の進展、抗原刺激時の細胞辺縁での脱顆粒、細胞表層からのマイクロベシクル形成過程を精細に捉える。

(2) 高倍率 3D タイムラプス観察による脱顆粒制御分子の時空間的機能解析、およびマイクロベシクル形成機構の解析

現在知られている脱顆粒制御分子のほとんどが、分泌刺激に対するアウトプット(顆粒内容物の放出)のみに着目した従来の生化学的脱顆粒アッセイ系により同定されたものである。これらの分子を本イメージング系で脱顆粒の実態に則して再解析し、いつ・どこで・どう働いているか等の知見を得る。

マスト細胞以外の細胞でのマイクロベシクル形成において、細胞膜ダイナミクスを制御す

る分子(Arf6, ホスホリパーゼ D)、アクトミオシン、および脂質膜の変形と切断に関与する I-BAR タンパク質 MIM の関与が示されている。また、マイクロベシクルへの積荷の輸送があるならば、他の細胞骨格関連分子やモーター分子の関与も想定される。これらの分子のマスト細胞のマイクロベシクル形成への関与を本イメージング系で検討する。

実験方法としては、上記分子の機能を RNA 干渉法による遺伝子発現の抑制あるいは阻害剤処理により抑制し、(1)と同様にイメージングする。

3. 研究の成果

(1) TPA+A23187 刺激存在下／非存在下での高倍率 3D タイムラプス観察

分泌刺激非存在下の分泌顆粒クラスターはソフトクリーム様の形状であり、その高さは細胞の厚みの 1/2 を超えるものが多かった。常に変形・伸縮しており、近接する別のクラスターとの接着／分離、またクラスター間の一過的なチューブル形成が見られた。

分泌刺激添加後直ちに、分泌顆粒クラスターの局所への pHluorin 蛍光の出現(脱顆粒を示す)、およびクラスターの弛緩（円盤状の分泌顆粒が繋がりつつ層状に積み重なったトルネードポテト様の形状への変化）が見られた。pHluorin 蛍光はクラスター内を不均一に（時にチューブル状に）進展しつつ強度を増し、10 分以内にクラスター全体に行き渡り、強度もプラトーに達した。また、頻度は低いが、クラスター間の接着やチューブル形成を介した pHluorin 蛍光の伸展もあった。

また、分泌刺激添加後 2 分経過した頃から、細胞上部表面で激しいラッフリングと細胞突起の形成が起こり、突起の先端から多数のマイクロベシクルが飛び出した。マイクロベシクル形成は次第に減衰し、刺激添加後 10 分以内には収束した。突起は、分泌顆粒クラスター上端近傍の細胞膜より形成され、弛緩したクラスターの一部が突起内部へ伸びていた。なお、放出されたマイクロベシクルの多くが分泌顆粒マーカーを含んでいたが、pHluorin 蛍光を伴うものと伴わないものがあった。

(2) 抗原刺激存在下(IgE 感作+抗原添加)／非存在下(IgE 感作のみ)での高倍率 3D タイムラプス観察

IgE 感作により分泌顆粒クラスターの多くは個々の分泌顆粒が見える程度に弛緩し、非常に動的であった。抗原添加後 2 分経過した頃に、細胞辺縁で激しい細胞突起の形成が起こり、そこへの分泌顆粒の集積と pHluorin 蛍光の出現が観察された。この現象は突起の持続時間と相関があり、突起がすぐ退縮する細胞では pHluorin 蛍光は弱く一過的である一方、突起が持続する細胞ではさらなる分泌顆粒の集積と pHluorin 蛍光強度の増大が見られた。この間、クラスター上には pHluorin 蛍光はほとんど出現しなかった。

上記の細胞辺縁での激しい突起形成時に、突起の先端がちぎれるようにマイクロベシクルが形成されていた。そのサイズは TPA+A23187 刺激時よりも小さかったが、分泌顆粒マーカーを含むものが多く、pHluorin 蛍光を伴うものと伴わないものがあった。

(3) 高倍率 3D タイムラプス観察による脱顆粒制御分子の時空間的機能解析

分泌顆粒膜上に存在する低分子量 GTPase Rab37 は、従来の生化学的脱顆粒アッセイ系により脱顆粒を負に制御する分子として同定された(Higashio et al., *Sci. Rep.* 6:22539, 2016)。この分子が実際の脱顆粒様式において何を・どう抑制しているかを知るため、Rab37 ノックダウン細胞をイメージングに供した。TPA+A23187 刺激での脱顆粒にはノックダウンの影響は見られなかった。一方、抗原刺激における脱顆粒では、(非ノックダウン細胞と比較して）細胞突起における pHluorin 蛍光の強度と持続性の増大、また分泌顆粒クラスター内への pHluorin 蛍光の出現と compound exocytosis 用の部分的進展が見られた。マイクロベシクル形成については、分泌刺激の種類を問わず Rab37 ノックダウンの影響は見られなかった。

4. 研究の反省・考察

生理的な分泌刺激である抗原刺激(IgE 感作＋抗原添加)では、IgE 感作によって分泌顆粒クラスターが緩んで分泌顆粒が動きやすい状態になり、抗原添加によって細胞突起が形成され、その先端まで分泌顆粒が輸送されて脱顆粒を生じていると考えられた。この時、Rab37 はクラスターにおいて脱顆粒を妨げていること、また突起において過度な脱顆粒を抑制しているこ

とが示唆され、特に前者には分泌顆粒貯蔵庫としてのクラスターを維持する意義があると考えられた。一方、TPA+A23187 刺激時にはクラスター内で compound exocytosis が生じていることが示唆されたが、これは、この人工的な強い分泌刺激が（上記のような）クラスター内での脱顆粒を妨げる仕組みを打ち破ってしまった結果だと考えられた。抗原刺激時にも突起において compound exocytosis が生じているのかは今後の検討課題である。

マイクロベシクルは、分泌刺激依存的に生じる細胞突起の先端から形成されること、また分泌顆粒マーカーの積込みが示唆されたことから、マスト細胞の即時型応答において何らかの生理的意義を有すると考えられた。

今年度の研究活動を通じて、私共の脱顆粒イメージング系は、脱顆粒とマイクロベシクル形成という、アレルゲン刺激に対する 2 種類の即時型応答を観察可能であり、それぞれのメカニズム解析の技術基盤になり得るとの自信を得た。今年度は本イメージング系しか用いておらず、また一部の計画しか遂行できなかった。次年度以降は、今年度の計画を引き続き遂行しつつ、可視化された「細胞内外の」膜構造とその変化を、他の実験手法（電子顕微鏡観察、フローサイトメーターなど）で随時検証しながら研究を進める。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

なし

(3)出版物

なし