

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目： 基盤研究 C
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19591182
 研究課題名（和文） DNA マイクロアレイ解析による肥満細胞のアポトーシス誘導因子の同定とクローニング
 研究課題名（英文） Identification and Cloning of an Apoptosis-Inducing Factor of Mast Cells by DNA Microarray Analysis
 研究代表者
 胡 志青 (ZHI-QING HU)
 昭和大学・医学部・准教授
 研究者番号： 60245826

研究成果の概要

IL-4 はマウスマスト細胞の増殖因子としてよく知られているが、我々は IL-4 がマスト細胞の分化誘導において主な抑制因子でもあることを初めて確認した。IL-4 の刺激によってマクロファージからマスト細胞のアポトーシスを誘導する未知の因子が産生されることを解明した。この未知のアポトーシス誘導因子を同定するために、二色法 DNA マイクロアレイ解析 (2 回、13 アレイ) を実行し、信頼できる結果を得た。41267 個の遺伝子から IL-4 によって発現量が増減した数千種類の遺伝子を一挙に捉えることに成功した。さらに、アポトーシスと関連性のある 673 個の遺伝子に焦点をおいて、GeneSpring で解析した結果、約 20 個の候補遺伝子に限定することができた。今後、更なる努力によって、一層の成果が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード： マスト細胞、アポトーシス誘導因子、マイクロアレイ、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

我々はマウスの脾細胞から大量のマスト細胞を分化・誘導する培養方法を開発した。この実験系を用いて、マスト細胞の分化と誘導

における lipopolysaccharide、prostaglandin E、cholera toxin、dibutyryl cyclic AMP、TNF- α 、IL-6、IFN- γ および IL-12 p70 と IL-12 p40 等の役割について研究してきた。マスト細胞の分化誘導には、IL-3 が必須であるが、IL-3 のみ

では不十分であり、prostaglandin E など細胞内の cAMP 産生を促進する物質および多種のサイトカインとの協同作用を必要とすることを報告した。

IL-4 はマウスマスト細胞の増殖因子としてよく知られている。しかし、我々は、誘導されたマスト細胞の数が培養上清中の IL-4 量に反比例していることに気付いた。IL-3 と stem cell factor (SCF) を加えてマウスの脾細胞、腹腔滲出細胞および骨髓細胞を培養すると大量のマスト細胞が誘導されたが、IL-4 を IL-3・SCF と一緒に加えると、マスト細胞の分化誘導が完全に抑制された。この結果は従来の報告とは異なり、マスト細胞の生存と分化には、IL-4 が主な抑制因子であることが初めて確認された (Down-regulation by IL-4 and up-regulation by IFN- γ of mast cell induction from mouse spleen cells. **J. Immunol.** 156:3925-31, 1996)。以来、我々はこの興味深い IL-4 の抑制作用のメカニズムに焦点をおいて研究してきた。

マスト細胞株および精製したマスト細胞を、IL-4 の刺激を受けた腹腔滲出細胞から収集した培養上清に培養すると、マスト細胞はアポトーシスをを行った。高濃度の IL-3 と SCF を加えてもこのアポトーシス誘導活性を拮抗することはできなかった。この結果から、マスト細胞のアポトーシスを誘導する因子が細胞培養上清に存在していることが判明した。さらに、この誘導因子は多種の癌細胞にも強いアポトーシス誘導活性を示した。種々のサイトカインや中和抗体を培養系に加えた実験と B6-lpr/lpr、B6-gld/gld、PKO (perforin knock out) などのマウスを用いた実験により、このアポトーシス誘導因子は既知の TNF- α 、TNF- β 、TGF- β 、TRAIL、Fas/FasL、Perforin 等のアポトーシス誘導因子ではないことが明らかになった。この未知のアポトーシス誘導因子の産生と IL-4 刺激との関連性を調べるために、STAT6^{-/-} マウスの腹腔滲出細胞を用いた。STAT6^{+/+} マウスの腹腔滲出細胞とは対照的に、IL-4 は STAT6^{-/-} マウスの腹腔滲出細胞からのマスト細胞への分化誘導を抑制できず、かえってそれを促進した。また IL-4 の刺激を受けた STAT6^{-/-} マウスの腹腔滲出細胞から収集した培養上清中にはアポトーシス誘導因子が存在しないことも確認した。すなわち、マスト細胞の分化誘導における IL-4 の抑制作用およびアポトーシス誘導因子の産生は STAT6 シグナルに依存している。この未知のアポトーシス誘導因子を産生する細胞を同定するために、腹腔滲出細胞の培養系から付着性細胞を除去し、また再び加えることによって、IL-4 によるアポトーシス誘導因子の産生は付着性細胞の存在に依

存していることを判明した。さらに、この付着性細胞がマクロファージであることをマクロファージの欠損マウス (M-CSF knockout op/op mice) を用いて確認した。

以上の研究より、マスト細胞増殖因子である IL-4 は、同時にマクロファージに作用してマスト細胞のアポトーシスを誘導する未知の因子を産生させるという二重の役割を持っており、この過程は STAT6 シグナルに依存することを初めて報告した (Interleukin 4-triggered, STAT6-dependent production of a factor that induces mouse mast cell apoptosis. **Eur. J. Immunol.** 36:1275-1284, 2006)。

2. 研究の目的

マスト細胞の分化・誘導における増殖因子についてはよく研究されている。しかし、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、Fas/FasL、Perforin 等のアポトーシス誘導因子以外に、マスト細胞のアポトーシスを誘導する因子はまだ報告されていない。本研究は DNA マイクロアレイ技術を用いて、この未知のアポトーシス誘導因子の同定およびクローニングを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Total RNA の抽出と精製

C57BL/6N マウスから腹腔滲出細胞を分離し、二つのサイトカイン (IL-3 + SCF) または三つのサイトカイン (IL-3 + SCF + IL-4) を加えて培養した。12、24、48、72 時間後、アジレント社の Total RNA 抽出・精製キットを用いてそれぞれの培養細胞から Total RNA を抽出した。

(2) 二色蛍光色素を用いた RNA のレベル化

アジレント社の Low RNA input リニア増幅&ラベル化キットを用いて、Total RNA から逆転写酵素によって cDNA を合成し、この cDNA から Cyanine 3 (Cy3) および Cyanine 5 (Cy5) ラベル化 cRNA を合成した。

(3) 二色法による Cy3-cRNA・Cy5-cRNA とマイクロアレイのハイブリダイゼーション

Cy3-cRNA と Cy5-cRNA の等量混合溶液をアジレント社の 44 k フォーマットのマウス in-situ オリゴ DNA マイクロアレイ上に滴下し、17 時間ハイブリダイゼーションさせた。この反応によって Cy3-cRNA と Cy5-cRNA はアレイ上にスポットされた遺伝子と競合的に結合した。

(4) ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化と数値化

アレイに結合していない余分な cRNA を洗浄した後、スポットに結合した Cy3-cRNA と Cy5-cRNA の量をアジレント社のスキャナーで読み取って画像化した。各プローブ DNA (各スポット) の Cy3-cRNA と Cy5-cRNA シグナルをソフトウェア Feature Extraction で数値化・補正し、解析した。

(5) GeneSpring によるマイクロアレイデータの解析

専用ソフトウェア GeneSpring を用いて、マイクロアレイデータをさらに解析し、IL-4 の

刺激によって発現差が現れた遺伝子のリストを作成した。

4. 研究成果

二色法 DNA マイクロアレイ解析 (2 回、13 アレイ) を実行し、信頼できる結果を得た。41267 個の遺伝子から IL-4 によって発現量が増減した数千種類の遺伝子を一举に捉えることに成功した (Figure 1)。さらに、アポトーシスと関連性のある 673 個の遺伝子に焦点をおいて、GeneSpring で解析した結果、約 20 個の候補遺伝子に限定することができた (Table 1)。

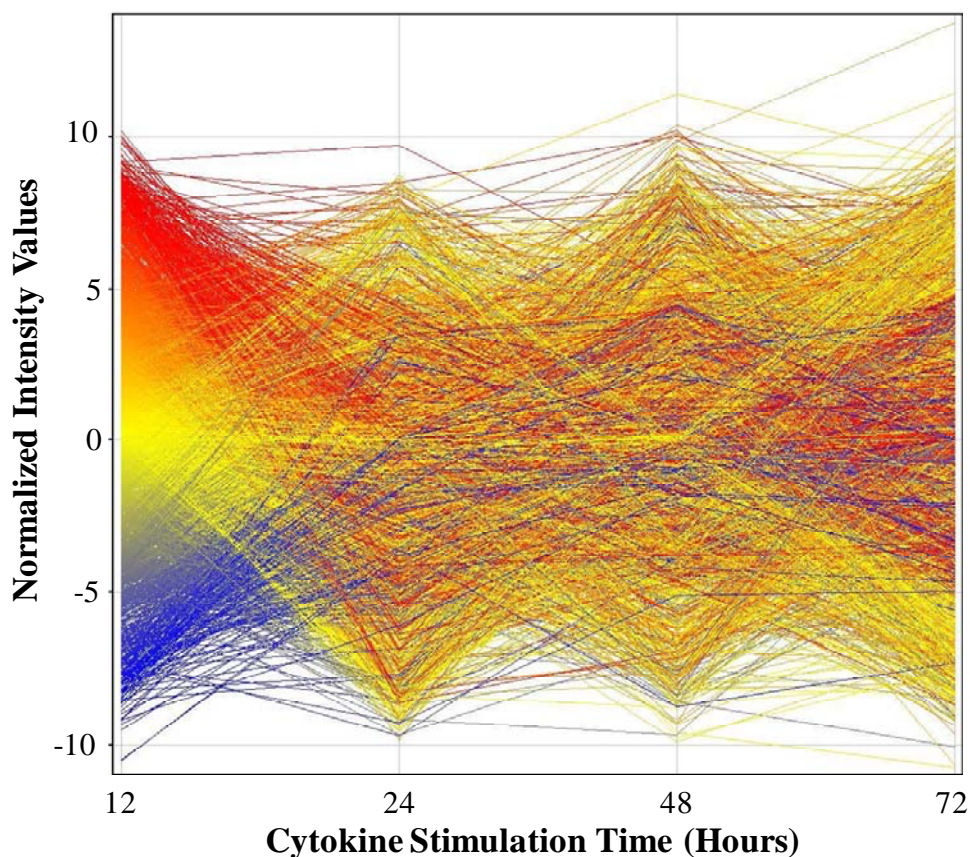


Figure 1. Dye Swap Average of Microarray

Table 1 に示す候補遺伝子と我々が目的としている未知のアポトーシス誘導因子との関連性を確認するために、今後、高感度のリアルタイム PCR アレイ解析法を用いて、二次スクリーニングを行い、候補遺伝子の数をさらに限定する。また、特異的な中和性抗体、サイトカイン、ELISA 測定キット等を用いて、

未知のアポトーシス誘導因子を効率的且つ経済的に同定することが可能だと考えられる。進展している DNA マイクロアレイ解析法は、我々のアポトーシス誘導因子の同定とクローニングの成功の後押しになっている。更なる努力によって、一層の成果が期待される。

Table 1. Apoptosis-Related Genes Identified by Microarray

Gene	GeneBank Accession No.	Normalized Intensity Values			
		12h	24h	48h	72h
Granzyme A	NM_010370	4.49842	3.978069	5.628962	4.275386
Granzyme F	NM_010374	0.939413	4.071324	3.412867	0
Granzyme M	NM_008504	0.152575	-0.18892	0.383786	0.693415
Granzyme C	NM_010371	0.568987	2.455942	2.388704	0.30941
Granzyme G	NM_010375	0	-3.52706	4.274099	6.695159
Granzyme D	NM_010372	0.553941	0.493577	0.58916	-0.56663
Granzyme N	NM_153052	6.647871	0.682158	4.135134	0
Granzyme B	NM_013542	2.594649	2.698148	2.269251	-0.08995
Granzyme D	NM_010372	3.125838	0	-0.10063	2.737732
Inhibin A	NM_008380	1.250068	1.640974	2.678612	3.126638
Inhibin B	NM_008381	0.475284	0.410406	0.605901	0.492389
Inhibin C	NM_010565	1.184659	0.220565	1.278115	0.674011
STEAP 3	NM_001085409	1.417685	0.775358	1.128153	0.489514
TNFSF-6	NM_010177	1.024005	0.890216	1.946315	1.428079
TNFSF-8	NM_009403	1.254126	0.26568	0.820192	0.988963
TNFSF-4	NM_011616	4.716803	1.923719	1.202047	-1.23274
TNFSF-11	NM_011613	4.336321	-2.66589	2.349542	4.64305
TNFSF-5	NM_134138	0.667004	0.363161	0.329471	0.455495
TNFRSF-10c	NM_175540	5.810688	2.091928	2.684787	2.278145
TNFRSF-10b	NM_020275	2.154691	0.853062	1.950384	1.515841
TNFRSF-12a	NM_013749	0.441197	0.319816	1.088969	1.279498
TNFRSF-8	NM_009401	1.175984	0.437296	0.317249	0.705504

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Zhi-Qing Hu, Wei-Hua Zhao and Tadakatsu Shimamura. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. Current Medicinal Chemistry 14:3044-3050, 2007.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Zhi-Qing Hu, Wei-Hua Zhao and Tadakatsu Shimamura

Mechanism of interleukin-4-triggered mast cell apoptosis

International Conference on Immunology 2007 (Shanghai 2007, 7)

- ② Wei-Hua Zhao, Zhi-Qing Hu and Tadakatsu Shimamura
Promotion of SCF-dependent survival and proliferation of mouse mast cells by IL-12 p70
International Conference on Immunology 2007 (Shanghai 2007, 7)

[図書] (計 2 件)

- ① Zhi-Qing Hu, Wei-Hua Zhao and

Tadakatsu Shimamura. Chapter XI. What can be learned from the discrepant results in mast cell research? Mast Cells: Roles, Interactions and Disorders 231-241, 2008 (Monograph, Nova Science Publishers, NY, USA).

- ② **Zhi-Qing Hu, Wei-Hua Zhao** and Tadakatsu Shimamura. Chapter VI. Regulation of mast cell development and apoptosis by Th1 and Th2 cytokines. New Cell Differentiation Research Topics 213-227, 2007 (Monograph, Nova Science Publishers, NY, USA).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

胡 志青 (ZHI-QING HU)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号： 60245826

(2) 研究分担者

趙 維華 (WEI-HUA ZHAO)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号： 90327916

(3) 連携研究者