

機関番号：12301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591183
 研究課題名（和文）ヒト臍帯血由来培養好塩基球の機能と細胞内シグナル伝達に関する研究
 研究課題名（英文）Function and intracellular signaling of human umbilical cord blood-derived cultured basophils
 研究代表者
 石塚 全（ISHIZUKA TAMOTSU）
 群馬大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：50302477

研究成果の概要（和文）：ヒト臍帯血由来単核球を 10 ng/ml IL-3 存在下に 2 週間培養すると Alcian blue 陽性細胞が得られ、IgE に受動感作後、抗 IgE 抗体で刺激すると IL-8 産生が確認されたが、末梢血から得た好塩基球に比べて、IgE Fc レセプターの発現は極めて小さかった。そこで、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を 10 ng/ml IL-3、500 ng/ml IgE 存在下に 2 週間以上培養することにより、IgE Fc レセプターを十分に発現した細胞を得ることができた。この細胞では抗 IgE 抗体刺激により IL-8、IL-4、LTC4 の産生が確認された。

研究成果の概要（英文）：Human umbilical cord blood-derived mononuclear cells were cultured in the presence of 10 ng/ml IL-3 for 2 weeks. Alcian blue stained cells were isolated after the culture. These premature basophils were passively sensitized with human IgE and stimulated by anti-human IgE polyclonal antibody (1 µg/ml). Substantial amount of IL-8 was detected in cell supernatants at 3h after the stimulation. Although the expression of IgE Fc receptors in these cells was analyzed by flowcytometry, the expression was a little. To increase the expression of IgE Fc receptors, CD34+ cells isolated from human cord blood were cultured in the presence of 500 ng/ml IgE as well as 10 ng/ml IL-3 for 2 weeks. Substantial expression of IgE Fc receptors was observed on cell surface of CD34+ cell-derived premature basophils cultured in this condition. IL-4, IL-8, and leukotriene C4 were detected in the supernatants of CD34+ cell-derived premature basophils following the stimulation of anti-IgE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床アレルギー学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ヒト好塩基球、IgE、臍帯血、CD34、IL-4、IL-8、ロイコトリエン

1. 研究開始当初の背景
 近年、好塩基球は抗原提示能を有することが明らかにされ、アレルギー性気道炎症のイニシエーターとしての役割が注目されつつあ

る。また、好塩基球は細胞あたりの産生量として IL-4 を最大量産生する細胞と予想されており、Th2 細胞、サイトカインによる慢性炎症、いわゆる好酸球性気道炎症を引き起こ

す中心的な役割をもつ細胞かもしれないと考えられるようになってきた。さらに、喘息発作で死亡した患者の気道には好塩基球が多く観察されることより、通常の治療では症状のコントロールが得られない難治性気管支喘息の病態への好塩基球の関与が示唆されている。

2. 研究の目的

ヒト好塩基球は末梢血白血球のわずか 0.5%に過ぎず、末梢血から十分量の細胞を得ることは困難である。アレルギー性疾患の研究においてヒト好塩基球の機能を解析することは重要であり、併せて細胞内シグナル伝達に関する研究を進めるためには 1 回の実験当たり 10^7 個以上の細胞が得られることが望ましい。また、好塩基球の生理的な刺激として、高親和性 IgE Fc 受容体 (FcεRI) に結合した IgE の架橋による刺激を用いるが、FcεRI を十分に発現した好塩基球性白血病細胞株がないため、ヒト好塩基球の IgE を介するサイトカイン産生、ロイコトリエン C4 産生などの機能に関与する細胞内シグナル伝達因子の研究をするためには、ヒト培養好塩基球をモデル細胞として使用するしかない。そこで、ヒト臍帯血単核球から、好塩基球を誘導、培養し、IgE を介するサイトカイン産生やロイコトリエン産生のモデル細胞としての妥当性を検証する目的で本研究を開始した。

3. 研究の方法

ヒト臍帯血由来単核球を 10% Fetal bovine serum (FBS)、10 ng/ml IL-3、2-メルカプトエタノール含有 RPMI 1640 培養液で培養した。細胞を 1×10^6 /ml で培養を開始し、1 週間後に培養液を交換し、以後 2~3 日毎に継代培養を行った。2 週間後に得られた細胞から Basophil isolation kit II を用いて CD3、CD4、CD7、CD14、CD15、CD16、CD36、CD45RA、HLA-DR、CD235a 陽性細胞を除去して実験に供した (単核球由来培養好塩基球)。ヒト末梢血好塩基球は Lymphoprep™ を用いて末梢血より分離した単核球を上記 Basophil isolation kit II を用いて単離した。次に、細胞表面に発現する高親和性 IgE Fc レセプター (FcεRI) を増加させるために、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を 0.5-1 μg/ml ヒト IgE 存在下に上記培養液中で 2 週間培養した。細胞を $2 \sim 3 \times 10^5$ /ml で培養を開始し、2~4 日毎に継代培養した (CD34 陽性細胞由来培養好塩基球)。単核球由来培養好塩基球、末梢血好塩基球はヒト IgE (1 μg/ml) を添加し、2 時間培養後、洗浄した細胞を抗ヒト IgE 抗体 (1 μg/ml) により刺激した。刺激後回収した上清中のサイトカインは Antibody array および ELISA キットにより、ロイコトリエン C4 (LTC4) は EIA キットにより測定した。細胞の染色には

Wright 染色と Alcian blue 染色を用いて観察した。細胞の IgE Fc レセプターの発現はヒト IgE (1 μg/ml) を添加し、2 時間インキュベーション後洗浄し、FITC 標識抗ヒト IgE モノクローナル抗体または FITC 標識コントロール抗体と反応させ、フローサイトメトリーにより解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト臍帯血単核球由来培養好塩基球およびヒト末梢血好塩基球の IL-8 産生

臍帯血単核球由来培養好塩基球および末梢血より分離した好塩基球を IgE で感作、洗浄後、抗ヒト IgE 抗体を添加し、overnight で刺激した上清を Ray Bio 社の Antibody array を用いて産生されたサイトカインのスクリーニングを行った。単核球由来培養好塩基球からの IL-8、MCP-1、MIP-1β、IL-13、IL-16、RANTES、末梢血好塩基球からの IL-8 の産生が確認された。単核球由来培養好塩基球の抗 IgE 抗体による IL-8 産生を ELISA 法により、詳細に検討した結果、抗 IgE 抗体 (1 μg/ml) 刺激 1 時間後より、有意な IL-8 産生が確認され、刺激後 2 時間でほぼ最大 (約 $1.5 \text{ ng}/10^6$ 細胞) に達した。刺激時間を 3 時間として、抗 IgE 抗体の濃度を変えて検討した結果、IL-8 産生量は 0.3-3 μg/ml 刺激で最大に達し、0.1 μg/ml、10 μg/ml 刺激では IL-8 産生は明らかに低下した。抗 IgE 抗体 (1 μg/ml) 刺激 1 時間後の IL-8 mRNA 発現を Taqman プローブを用いた real time PCR で半定量すると、無刺激の細胞に比べて 4~5 倍の発現を認めた。ヒト末梢血より分離した好塩基球も同様に抗 IgE 抗体 (1 μg/ml) 刺激後 3 時間では 10^6 個の細胞あたり約 1 ng の IL-8 を産生した。以上の IL-8 産生に関する検討では 10% FBS、10 ng/ml IL-3 を含む培養液を用いた。

(2) ヒト臍帯血単核球由来培養好塩基球の IL-8 産生におよぼす Fetal bovine serum (FBS) の影響

臍帯血単核球由来培養好塩基球を 1~10% FBS を含む RPMI 1640 培養液と 0.1% BSA を含む無血清培養液中で、抗 IgE 抗体 (1 μg/ml) 刺激後 3 時間の IL-8 産生を比較すると、FBS 非存在下では IL-8 産生は僅かであり、FBS 濃度に依存して抗 IgE 抗体刺激による IL-8 産生は増加した。単核球由来培養好塩基球が IL-8 を十分に産生するためには FBS 中の何らかの因子が必要であると予想された。また、抗 IgE 抗体刺激時の IL-3 の有無による IL-8 産生への影響を検討したところ、10 ng/ml IL-3 存在下で IL-8 産生が若干増加したが、FBS による影響の方が大きかった。

(3) ヒト臍帯血単核球由来培養好塩基球およびヒト末梢血好塩基球の IgE Fc 受容体 (FcεRI) の発現

ヒト臍帯血単核球由来培養好塩基球を IgE で感作後、抗 IgE 刺激を行った場合、非感作細胞を抗 IgE 刺激した場合に比べて有意な IL-8 産生が確認されたことより、機能的な IgE Fc レセプター (FcεRI) の発現が予想されたので、細胞当たりの発現量をフローサイトメトリーにより解析した。Positive control として末梢血から分離した好塩基球を用いた。末梢血好塩基球に比べて、単核球由来培養好塩基球の FcεRI の発現レベル (蛍光強度) は遙かに低かったため、IgE を介する細胞内シグナル伝達や IL-4 産生を研究するうえでは若干問題であると思われる。そこでヒト臍帯血 CD34+細胞を IL-3 存在下で培養することとし、さらに FcεRI の発現を増加させるために、ヒト IgE (500 ng/ml) を培養液に添加して培養し、添加しない場合と比較した。その結果、CD34+細胞から培養した細胞では単核球から培養した細胞よりも、若干 FcεRI の発現が増加したが、IgE を添加して培養することにより、FcεRI の発現レベルは著明に増加した。

(4) CD34+細胞由来培養好塩基球の IL-8 および IL-4 産生

CD34+細胞から IgE 存在下に培養した好塩基球では、IgE 非存在下に培養して得られた好塩基球と比較して、抗ヒト IgE 抗体で刺激した際に産生される IL-8 産生が約 2 倍、IL-4 産生量が約 3 倍に増強された。ヒト好塩基球からの IL-4 産生のアレルギー疾患における重要性が強調されて久しいが、IL-4 産生量そのものは IL-8 に比べ、わずかであり、高感度 ELISA を用いて測定するレベル (20pg/ml 未満) であった。IgE 存在下に CD34+細胞より培養した好塩基球では 10⁶ 細胞あたり 40 pg 以上の IL-4 が産生されることより、IL-4 産生機構の研究にも適したモデル細胞となることが確認された。

(5) CD34+細胞由来培養好塩基球のロイコトリエン C4 (LTC4) 産生と細胞内グルタチオン

ヒト臍帯血 CD34+細胞を 500 ng/ml IgE、10 ng/ml IL-3 存在下に 10% FBS 含有 RPMI1640 で 2 週間以上培養すると、FcεRI を十分に発現する幼若な好塩基球が得られた。この細胞を用いて IgE を介するロイコトリエン C4 (LTC4) 産生について検討した。培養好塩基球を 0.1% BSA 含有 RPMI1640 で洗浄後、抗ヒト IgE 抗体 (1μg/ml) を添加し、30 分後に遠心して得られた上清中の LTC4 を EIA により測定した結果、細胞 1x10⁶ 当たり 2 ng 以上の LTC4 が産生された。LTC4 産生経路における律速段階は LTA4 から LTC4 への変換であり、この反応は LTC4 synthase によって LTA4 にグルタ

チオンが付加されることによる。すでに、私はマウス肥満細胞株ではグルタチオン産生に係わる g-glutamylcysteine synthetase を阻害する L-buthionine-sulfoximine (BSO) や一部のプロスタノイドの作用により細胞内グルタチオン濃度が低下すると LTC4 産生が低下し、逆に Glutathione reduced ethyl ester を用いて、細胞内グルタチオン濃度を増加させると LTC4 産生が増大することを確認しており、細胞内グルタチオン濃度により LTC4 産生量が規定されると考えている。培養好塩基球においても Glutathione reduced ethyl ester 存在下および非存在下に 0.1% BSA 含有 RPMI1640 で 6 時間インキュベーションした後、抗 IgE 抗体で 30 分間刺激し、上清中の LTC4 を測定した結果、Glutathione reduced ethyl ester 処理により LTC4 は約 4 倍に増加した。また、BSO で 24~48 時間処理すると LTC4 産生は 35~60% まで低下した。

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 43 件)

- ① Kamide Y, Utsugi M, Dobashi K, Ono A, Ishizuka T, Hisada T, Koga Y, Uno K, Hamuro J, Mori M: Intracellular glutathione redox status in human dendritic cells regulates IL-27 production and T-cell polarization. J Immunol 査読有、in press
- ② 石塚 全、難治性喘息に対する白血球除去療法、臨床免疫・アレルギー科、査読無 (依頼原稿)、Vol. 55、No.2、2011、pp. 202-209
- ③ Matsuzaki S, Ishizuka T, Hisada T, Aoki H, Komachi M, Ichimonji I, Utsugi M, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Kurose H, Tomura H, Mori M, Okajima F: Lysophosphatidic acid inhibits CC chemokine ligand 5/RANTES production by blocking IRF-1-mediated gene transcription in human bronchial

- epithelial cells. *J Immunol* 査読有、2010, 185: 4863-4872
- ④ Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Ono A, Koga Y, Sunaga N, Nakakura T, Okajima F, Dobashi K, Mori M: Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有、2010, 400: 128-133
- ⑤ Ichimonji I, Tomura H, Mogi C, Sato K, Aoki H, Hisada T, Dobashi K, Ishizuka T, Mori M, Okajima F: Extracellular acidification stimulates IL-6 production and Ca²⁺ mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 査読有、2010, 299: L567-577
- ⑥ Hisada T, Ishizuka T, Aoki H, Mori M: Resolvin E1 as a novel agent for the treatment of asthma. *Expert Opin Ther Targets* 査読有、2009, 13: 513-22
- ⑦ Utsugi M, Dobashi K, Ono A, Ishizuka T, Matsuzaki S, Hisada T, Shimizu Y, Kawata T, Aoki H, Kamide Y, Mori M: PI3K p110beta positively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages and dendritic cells and JNK1 plays a novel role. *J Immunol* 査読有、2009, 182: 5225-5231
- ⑧ Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A, Okajima F: Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol* 査読有、2009, 182: 3243-3251
- ⑨ Ono A, Utsugi M, Masubuchi K, Ishizuka T, Kawata T, Shimizu Y, Hisada T, Hamuro J, Mori M, Dobashi K: Glutathione redox regulates TGF-beta-induced fibrogenic effects through Smad3 activation. *FEBS Lett* 査読有、2009, 583: 357-362
- ⑩ Zhao JJ, Shimizu Y, Dobashi K, Kawata T, Ono A, Yanagitani N, Kaira K, Utsugi M, Hisada T, Ishizuka T, Mori M: The relationship between oxidative stress and acid stress in adult patients with mild asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 査読有、2008, 18: 41-45
- ⑪ Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Kawata T, Shimizu Y, Okajima F, Dobashi K, Mori M: Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有、2008, 367: 509-515
- ⑫ Ishizuka T, Hisada T, Aoki H, Mori M: Resolvin E1: a novel lipid mediator in the resolution of allergic airway inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 査読無 (依頼原稿)、2008, 4: 669-672

〔学会発表〕（計 11 件）

- ① 関 香織、石塚 全ほか、肥満細胞からの LTC₄ 産生は細胞内グルタチオン濃度によって規定される、第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010. 11. 25、東京国際フォーラム（東京都）
- ② 石塚 全ほか、パネルディスカッション 重症喘息の治療、難治性喘息に対する白血球除去療法の抗炎症作用と有効性に関する検討、第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010. 5. 8、国立京都国際会館（京都市）
- ③ 石塚 全ほか、ヒト臍帯血由来培養好塩基球の IgE Fc レセプター発現とサイトカイン産生、第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 2010. 4. 25、国立京都国際会館（京都市）
- ④ 石塚 全ほか、ミニシンポジウム 難治性喘息に対する高用量白血球除去療法による治療の試み、第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009. 10. 29、秋田ビューホテル（秋田市）
- ⑤ 石塚 全ほか、ヒト臍帯血由来培養付好塩基球の IL-8 産生、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 2009. 6. 12、東京国際フォーラム（東京都）
- ⑥ 石塚 全ほか、ミニシンポジウム 2 マスト細胞・好塩基球ヒト好塩基球の IgE を介する IL-8 産生、第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008. 11. 27、東京国際フォーラム（東京都）

〔図書〕（計 3 件）

- ① 石塚 全、土屋 智：気管支喘息．日本臨床内科医会編．内科診療実践マニュアル．日本医学出版，東京，246-256，2009．

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 全 (ISHIZUKA TAMOTSU)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50302477