

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790817
 研究課題名（和文） Notch シグナルによるマスト細胞分化・機能制御とアレルギー炎症性疾患への関わり
 課題名（英文） Regulation of mast cell differentiation and function by Notch signaling and its involvement in allergic inflammatory disease
 研究代表者
 中野 信浩（NAKANO NOBUHIRO）
 順天堂大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：30420839

研究成果の概要（和文）：マスト細胞は Notch1 と Notch2 を恒常的に発現しており、Notch シグナルがマスト細胞に MHC class II 分子と補助刺激分子 OX40L の発現を誘導することを明らかにした。さらに、MHC class II と OX40L を発現したマスト細胞は CD4 陽性 T 細胞に対して抗原提示を行い、Th2 細胞分化を誘導したことから、抗原提示細胞としてのマスト細胞がアレルギー性疾患の発症および増悪に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that mast cells constitutively expressed Notch1 and Notch2 on the cell surface, and Notch signaling induced the expression of MHC class II molecules and the costimulatory molecule OX40L on the mast cells. Furthermore, we showed that MHC class II⁺OX40L⁺ mast cells functioned as an antigen-presenting cell for CD4⁺ T cells and induced the differentiation of Th2. These results suggest that the mast cells as the antigen-presenting cells involve in the development of allergic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：アレルギー、マスト細胞、Notch、抗原提示、Th2

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は皮膚や消化管等の外界との境界領域に特に多く存在し、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、喘息等のアレルギー性疾患の病態形成に強く関与している細胞である。40年以上前から IgE を介したアレルギー

反応の主要なエフェクター細胞として知られていたが、マスト細胞の機能や分化過程にはいまだに謎が多い。例えば、マスト細胞がアレルギー反応を起こすためだけに存在するとは考えにくいのだが、他にどのような機能をもっているのか？ マスト細胞は

所属している組織によって形態や顆粒内のプロテアーゼ組成が異なるが、それにはどのような生理的意義があってどのようにしてその違いが生じるのか？ これらの謎を解明することで、アレルギー性疾患をはじめとするマスト細胞が関与する疾患の新規療法開発にきわめて有用な情報が得られるはずである。

近年の研究によって、マスト細胞は細菌感染時の自然免疫反応の誘導に重要な細胞であることが明らかにされたが、自然免疫反応があまり関与しない遅延型接触過敏症や喘息等のT細胞が主体となる幾つかの疾患においても、病態形成にマスト細胞が関わっている可能性が以前から示唆されていた。この知見は、マスト細胞が獲得免疫系に重要なT細胞の活性化や機能修飾を調節する機能をもつことを示唆しているが、どのような機序で調節を行うのかについてほとんどわかっていなかった。最近になって、マスト細胞が産生するサイトカイン・ケモカイン・エイコサノイド類が、間接的にT細胞の活性化および機能修飾に関与することが幾つか報告されたが、マスト細胞が抗原提示細胞として直接T細胞を活性化させるという斬新な仮説も提案されていた。ただし、マスト細胞が抗原提示細胞であるという証拠は得られていなかった。

2. 研究の目的

(1) 予備的な実験結果から、われわれは、マウスマスト細胞表面に発現している Notch 受容体を介したシグナルが、マスト細胞に CD4⁺ T 細胞への抗原提示に必要な MHC class II 分子の発現を誘導する可能性を見いだした。そこで、Notch シグナルがマスト細胞の表面分子発現や機能に与える影響を解析するとともに、Notch シグナルによって MHC class II 分子を獲得したマスト細胞が CD4⁺ T 細胞に対する抗原提示細胞として機能するかどうかを検討した。

(2) また Notch シグナルは、成熟したマスト細胞のマーカー分子である mouse mast cell protease (mMCP)-1 の発現を顕著に増加させたことから、Notch シグナルとマスト細胞の成熟の関係について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞

BALB/c マウスの骨髄細胞を IL-3, SCF 存在

下で 2~4 週間培養してマスト細胞へと分化誘導させた、マウス骨髄由来培養マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell: BMMC) を作製した。

(2) Notch リガンド発現細胞

4 種の Notch リガンド Jagged (Jag) 1, 2, Delta-like (Dll) 1, 4 をそれぞれ強制発現させた CHO 細胞株は、筑波大学大学院血液内科・千葉 滋 教授より供与されたものを使用した。

(3) マスト細胞と Notch リガンド発現 CHO 細胞の共培養

BMMC と各 Notch リガンド発現 CHO 細胞株を 4~5 日間共培養させた後、磁気標識ビーズを用いてマスト細胞のみを回収し、各種解析に使用した。

(4) マスト細胞の抗原提示能の検討

CD4⁺ T 細胞は、オボアルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス D011.10 から磁気標識ビーズにより調製。Dll1 発現 CHO 細胞株と 5 日間共培養させた BMMC と CD4⁺ T 細胞を OVA ペプチド存在下で共培養させた。T 細胞の活性化は [³H]チミジンの取り込み量により測定、また 4 日間共培養後 T 細胞を再刺激し、培養上清中の各種サイトカイン濃度を測定することで誘導された Th のサブタイプを検討した。

4. 研究成果

(1) マスト細胞における Notch 受容体の発現

Notch は細胞膜一回貫通型の受容体で、哺乳動物には 4 種の受容体 (Notch1, 2, 3, 4) が存在している。フローサイトメトリーによる解析の結果、BMMC および腹腔マスト細胞が細胞表面に Notch1 と Notch2 を恒常的に高発現していることを確認した。

(2) Notch シグナルによって誘導される MHC class II および OX40L 発現

フローサイトメトリーによる解析から、BMMC を Dll1 強制発現 CHO 細胞株と共培養させたとき最も強く MHC class II 発現が誘導されることを確認した。またこのとき、補助刺激分子の一種である OX40 リガンド (OX40 ligand: OX40L) の発現も顕著に増加していた (図 1)。

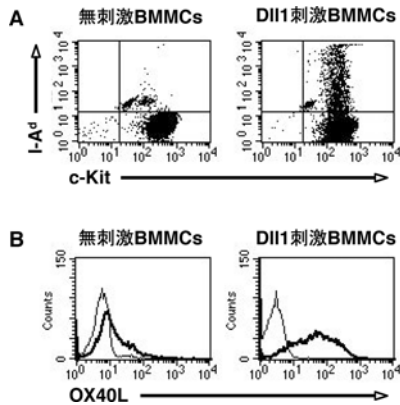


図 1. D111 刺激によって誘導されるマスト細胞の MHC class II および OX40L 発現 (発表論文⑤より引用改変)

(A) FcεRI⁺細胞集団を c-Kit と MHC class II (I-A^d) で展開。D111 刺激した FcεRI⁺c-Kit⁺BMMC の約 14% が MHC class II 陽性。(B) FcεRI⁺c-Kit⁺BMMC における OX40L の発現レベル。D111 刺激によりマスト細胞の OX40L 発現レベルが顕著に増加した。

(3) マスト細胞による抗原提示

In vitro での抗原提示アッセイにより、D111 刺激された BMMC が DO11.10 由来 CD4⁺ T 細胞を OVA ペプチド存在下で活性化させることを確認した (図 2、左図)。また、BMMC と T 細胞の間を培地成分は通過させるが細胞同士は接触できない Transwell 膜で仕切ると、T 細胞の活性化は見られなくなる (図 2、右図) ことから、細胞同士の直接的な接触、すなわちマスト細胞による抗原提示により CD4⁺ T 細胞が活性化されることを証明した。

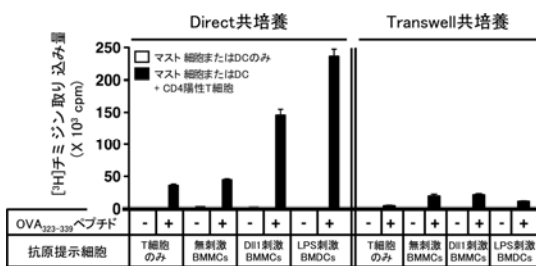


図 2. マスト細胞の抗原提示によって誘導される CD4 陽性 T 細胞の活性化 (発表論文⑤より引用改変)

D111 強制発現 CHO 細胞株またはコントロール CHO 細胞株と 5 日間共培養した BMMC を、DO11.10 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞と OVA ペプチド存在下で共培養し、T 細胞の増殖を [³H]チミジン取り込み量で測定した。LPS 刺激した骨髓由来培養樹状細胞 (BMDc) はポジティブコントロールとして用いた。

(4) マスト細胞による Th2 細胞分化誘導

BMMC と共培養した CD4⁺ T 細胞を、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で再刺激したときの

サイトカイン産生を検討した結果、IL-4, -5, -10, -13 が検出され、Th2 細胞への分化が示唆された。

(5) マスト細胞への抗原特異的 IgE 感作と抗原提示能の向上

D111 刺激された BMMC と DO11.10 由来 CD4⁺ T 細胞を OVA タンパク存在下で共培養する実験系において、BMMC をあらかじめ抗 OVA IgE 抗体で感作しておくことで T 細胞の活性化の程度は約 2 倍に増加した (図 3)。この結果は、マスト細胞が抗原特異的 IgE を介して抗原を取り込むことで抗原提示能が向上したことを示している。

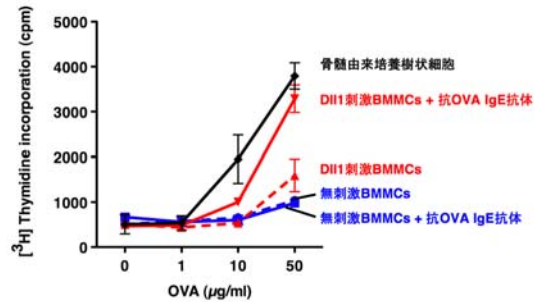


図 3. マスト細胞の抗原提示における抗原特異的 IgE 感作の影響

D111 強制発現 CHO 細胞株またはコントロール CHO 細胞株と 5 日間共培養した BMMC を、抗体 OVA IgE 抗体を感作した群としない群にわけ、DO11.10 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞と OVA タンパク存在下で共培養し、T 細胞の増殖を [³H]チミジン取り込み量で測定した。

(6) マスト細胞の成熟と Notch シグナルの影響

D111 刺激された BMMC では抗原提示に関連する分子の発現が認められたが、同時に成熟したマスト細胞のマーカー分子である顆粒内プロテアーゼ mMCP-1, -2, -4 の発現誘導も認められた。抗原提示に関連する分子の発現は Notch リガンド D111 および Jag2 においてのみ観察されたが、顆粒内プロテアーゼの発現誘導はすべての Notch リガンドにおいて確認された。以上のことから、Notch シグナルはマスト細胞に成熟を促すとともに、リガンドの種類によっては抗原提示細胞機能も付与する役割をもつと考えられる。

(7) 本研究結果のまとめ

Notch シグナルはマスト細胞の成熟を促進させる役割をもち、また、特に D111 による Notch シグナルはマスト細胞に抗原提示細胞機能を獲得させる役割ももつことが示された。

(8) 本研究結果の意義と今後の課題

マスト細胞の分化過程には不明な点が多いが、骨髄においてマスト細胞前駆細胞が発生し、血流に乗って各組織に到達した後、それぞれの所属組織において成熟すると考えられている。本研究結果から、各組織に発現しているNotchリガンドがマスト細胞の成熟を促している可能性が示唆された。

また、Notch シグナルによって抗原提示細胞機能を獲得したマスト細胞は、抗原特異的IgEの感作により抗原の取り込みとCD4⁺T細胞への抗原提示能が向上し、Th2細胞分化を誘導することから、同種の抗原に繰り返し曝される状況においてアレルギー性疾患の増悪に強く関わっている可能性が考えられる。アレルギー性疾患の病態形成に中心的な役割を果たすTh2細胞がナイーブT細胞から分化してくるメカニズムはいまだに確定されておらず、本研究結果が示すように、マスト細胞が抗原提示細胞として働きTh2細胞分化を誘導するのであれば、マスト細胞による抗原提示を防ぐことが慢性的なアレルギー性疾患の治療に有効である可能性がある。

しかしながら、本研究は主に *in vitro* における解析結果であるため、今後 *in vivo* の実験系によりNotchシグナルの機能を検証しなければならない。また、われわれはマウスの脾臓やリンパ節にMHC class II陽性マスト細胞が存在することも確認しているが、マスト細胞による抗原提示が各種疾患の病態形成にどの程度寄与しているのか、疾患モデル動物を用いて明らかにする必要がある。

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7件) すべて査読有り

- ① Potaczek DP, Wang QH, Sanak M, Tokura T, Matsuda H, Dziedzina S, Nakano N, Hara M, Ogawa H, Szczeklik A, Okumura K, Nishiyama C. Interaction of functional FCER2 promoter polymorphism and phenotype-associated haplotypes. *Tissue Antigens*. (2009) **74**:534-8.
- ② Potaczek DP, Maeda K, Wang QH, Nakano N, Kanada S, Stepień E, Branicka A, Fukai T, Hara M, Tokura T, Ogawa H, Undas A, Okumura K, Nishiyama C. FcεRIα gene -18483A>C polymorphism affects transcriptional activity through YY1

binding. *Immunogenetics*. (2009) **61**:649-55.

- ③ Fukai T, Nishiyama C, Kanada S, Nakano N, Hara M, Tokura T, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Involvement of PU.1 in the transcriptional regulation of TNF-α. *Biochem Biophys Res Commun*. (2009) **388**:102-6.
- ④ Ito T, Nishiyama C, Nakano N, Nishiyama M, Usui Y, Takeda K, Kanada S, Fukuyama K, Akiba H, Tokura T, Hara M, Tsuboi R, Ogawa H, Okumura K. Roles of PU.1 in monocyte- and mast cell-specific gene regulation: PU.1 transactivates CIITA pIV in cooperation with IFN-γ. *Int Immunol*. (2009) **21**:803-16.
- ⑤ Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, Koyanagi A, Akiba H, Chiba S, Ogawa H, Okumura K. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. (2009) **123**:74-81.
- ⑥ Niwa Y, Nishiyama C, Nakano N, Kamei A, Kato H, Kanada S, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Opposite effects of PU.1 on mast cell stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*. (2008) **375**:95-100.
- ⑦ Nakano N, Nishiyama C, Tokura T, Nagasako-Akazome Y, Ohtake Y, Okumura K, Ogawa H. Procyanidin C1 from apple extracts inhibits FcεRI-mediated mast cell activation. *Int Arch Allergy Immunol*. (2008) **147**:213-21.

[学会発表] (計5件)

- ① 中野信浩、Role of Notch receptors in acquisition of mast cell functions、第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2日、大阪
- ② 中野信浩、マスト細胞の形質獲得における各種Notchリガンドの役割、第59回日本アレルギー学会秋季学術大会、2009年10月31日、秋田
- ③ 中野信浩、抗原提示細胞としてのマスト細胞の機能、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、福岡
- ④ 中野信浩、マスト細胞においてNotchシグナルにより誘導されるMHC class II発現のメカニズム、第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月3日、京都
- ⑤ 中野信浩、Notchシグナルによりマスト細胞が獲得する抗原提示細胞機能、第58回日

本アレルギー学会秋季学術大会、2008年11
月27日、東京

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/atopy_center/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 信浩 (NAKANO NOBUHIRO)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30420839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし