

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580352  
 研究課題名（和文）多機能マスト細胞の戦略的分化誘導と免疫応答における調整機構の包括的解析  
 研究課題名（英文）Comprehensive analyses of regulational mechanism and strategic inductational differentiation in multifunctional mast cells.  
 研究代表者  
 池田 輝雄（IKEDA TERUO）  
 麻布大学・獣医学部・准教授  
 研究者番号：60151297

## 研究成果の概要（和文）：

アレルギー反応におけるマスト細胞の機能については広く調べられている。しかしながら、新たなマスト細胞機能の報告されたことから、マスト細胞は適応免疫同様、自然免疫の調整においても重要な役割を担っていることが認識されるに至っている。我々はリポポリサッカライド (LPS) 刺激されたマスト細胞での細胞増殖における IL-9 の役割について調べた。マスト細胞増殖における IL-9 の効果は、SCF が存在するときだけに見られた。マスト細胞は持続的に IL-9 受容体を発現していることから、IL-9 オートクラインによるマスト細胞の増殖が示唆される。一方、LPS 刺激マスト細胞での IL-9 産生は IL-3 で促進される。MyD88DN 発現プラスミドを導入したマスト細胞では、IL-9 のルシフェラーゼ活性が阻害されたが、TLR-2DN 発現プラスミドでは見られなかった。さらに IL-9 産生が部分的に p38 と ERK のシグナル伝達経路によることを示す p38 および ERK の阻害剤である SB203580 と PD98059 処理による IL-9 産生の部分的に阻害が見られた。これらの結果は、IL-9 が IL-3 と SCF とともに LPS 刺激によるマスト細胞増殖促進を調整し、微生物抗原に対する宿主の自然免疫応答において重要であることを示している。

## 研究成果の概要（英文）：

The functions of mast cell in allergy responses have been extensively investigated. However, according to the detection of new mast cells functions, mast cell has been recognized as key players in the regulation of innate as well as adaptive immunity. We investigated the role of IL-9 related to the regulation of proliferation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mast cells. The effect of IL-9 for mast cell proliferation was found only with SCF. These data suggest that number of mast cell increased by autocrine of IL-9, because mast cells constitutively express IL-9R. On the other hand IL-9 production in LPS-stimulated mast cells enhanced with IL-3. Transduction of dominant-negative (DN) form of MyD88, but not that of TLR-2 reduced IL-9 reporter activity. Moreover the treatment with the p38 inhibitor SB203580 and ERK inhibitor PD98059 suppressed IL-9 secretion, indicating the IL-9 induction through p38 and ERK signaling pathway. These data indicate that IL-9 is an essential positive regulator of LPS-induced mast cell autocrine proliferation accompany with IL-3 and SCF and, therefore, is crucial for the host innate immune-responses to microbial products.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,740,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：分科：畜産学・獣医学、細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：(1)マスト細胞 (2)細胞増殖 (3)自然免疫 (4)IL-9 (5)シグナル伝達経路 (6)オートクライン (7)マスト細胞増殖因子 (8) SCF

### 1. 研究開始当初の背景

(1)マスト細胞は、アレルギー反応特に即時型過敏症において中心的な役割を果たす細胞として知られているが、近年では炎症むしろでの種々な炎症性メディエーターの放出や生体外に直接接する部位に特異的に数多く存在することなどの理由からその生理学的意義がアレルギー反応以外の重要な免疫担当細胞としてもマスト細胞は注目され始めた。

(2)特にマスト細胞が感染部位において化学的走化因子(例えばTNF $\alpha$ )などのメディエーターを放出することによって、致死的な細菌感染に対する感染防御を成立させるための中心的な細胞であることを我々が報告(JI, 1994, Nature, 1996)したのを皮切りにその後数多く報告されてきており(JBC, 1993, Infect. Immun, 1994, Am. J. Therapeutic, 1996, JCI, 1997, JBC, 1999, Immun Lett, 2003, Vet Immunol Immunopathol. 2004)、感染免疫免疫応答におけるマスト細胞の機能が現在では確認されている。

(3)一方、北村らの研究により成熟型マスト細胞が骨髄由来であることは解明されたが、成熟型マスト細胞までの分化誘導機構あるいは局所での分化・成熟過程は依然として不明のままである。

(4)我々はこれまで、未分化の骨髄由来マスト細胞を用いて成熟型マスト細胞への分化誘導能を検討した結果 TGF $\cdot$ ファミリー分子にその作用があることを見出し、その分化調整機構と分子機構について明らかにしてきた(Biochim Biophys Acta. 2006, Cell Immunol. 2006, Cell Signal. 2006, Cell Immunol. 2005, Cell Signal. 2005, Clin Diagn Lab Immunol. 2004, Biochem Biophys Res Commun. 2003, J Biol Chem. 2003, Cell Biol Int. 2003, J Leukoc Biol. 2003, Cell Signal. 2003)。

(5)これまでのマスト細胞研究の多くは、アレルギー反応すなわちIgE-抗原複合体のFc $\epsilon$ RI結合によるマスト細胞活性化機序について精査しているが、その他の活性化機構については不明な点が数多く残されている。

(6)申請者らは、生体において現在知ら

れているよりも多くの機能を有していることが解明されつつあるマスト細胞について、多機能性成熟マスト細胞の戦略的分化誘導機序と免疫応答におけるコンダクター機能の包括的解析を目的として本研究を実施する。

### 2. 研究の目的

近年、上記した我々の研究およびその他の研究により、マスト細胞が多機能を有する成熟型細胞であることが明らかとなったが、分化機序はほとんど不明であり、また成熟型マスト細胞は自然免疫においても重要な役割を担っていることが認識されてきたが、そのほとんどの報告は生物学的な理解に留まっており作用機序に関する研究はほとんど行われていない。

本研究では、『多機能マスト細胞の戦略的分化誘導と免疫応答における調整機構の包括的解析』を明らかにすることを目的とし、1) マスト細胞におけるサイトカインの分化誘導への影響、2) 細菌抗原刺激によるマスト細胞受容体の発現とそれによって誘導されるサイトカイン分子の影響、3) 細菌抗原刺激に関連するシグナル分子の発現とサイトカイン分子の影響、4) シグナル伝達に誘導される分子の発現変動、5) 抗原刺激によって誘導される遺伝子群とそれによって誘導される遺伝子群ならびにマスト細胞の機能との関連を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マスト細胞

マスト細胞は、マウス骨髄由来培養マスト細胞(Bone-marrow derived cultured mast cells:BMMCs)、マウスマスト細胞株であるMC/9およびヒトマスト細胞株であるHMC-1を使用した。

#### (1) LPSによるマスト細胞の刺激

Escherichia coli O111:B4 (Sigma)を使用し、記載された濃度および時間でマスト細胞を刺激した。

#### (2) mRNAの測定

各プライマーを作製し、常法に従いRT-PCRおよびreal-time PCRにより定量した。

#### (3) IL-9の定量

Anti-mouse IL-9およびBiotinylated anti-mouse IL-9 (PeprTec, England)を用いて、サンドイッチELISA法により定量した。

(4) 細胞増殖測定

IL-3,SCF(Sigma),IL-9(PeproTec)の有無により、MTT法あるいはカウント法を用いて測定した。

(5) IL-9R の測定

特異的プライマーによる IL-9mRNA の定量および anti-IL-9R (Sigma) により定量した。

(6) プラスミド

TLR-2DN および MyD88DN は pcDNA3.1 発現ベクターにクローニングされ構築されたものを使用した。IL-9 プロモーター領域は pGL4 ルシフェラーゼベクターにクローニングしたものを使用した。レポーターアッセイは、ルシフェラーゼアッセイキット (Promega) を使用し測定した。

4. 研究成果

本研究目的である『多機能マスト細胞の戦略的分化誘導と免疫応答における調整機構の包括的解析』を明らかにする目的で、自然免疫の中心的な受容体である TLR4 を介した LPS 刺激に対するマスト細胞の挙動を検討した。

(1) LPS 刺激によってマスト細胞の局所での増殖には IL-9 が関与する。

LPS 刺激によって BMMC (マウス骨髄由来培養マスト細胞) で発現が著しく増加する mRNA は IL-1β, IL-6, IL-9, IL-13, TNFα, MCP-1, MIP-1 であることが RT-PCR およびリアルタイム PCR によって確認された。このうち IL-9 はマスト細胞の増殖因子として機能することが知られていることからこれに注目した (Fig. 1)。

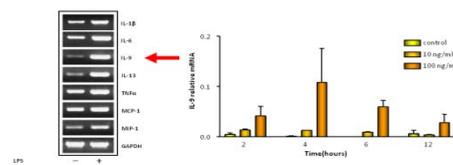


Fig.1 RT-PCRにける LPS刺激(10 ng/ml) BMMCでのサイトカインmRNA発現

(2) IL-9 は相乗的に SCF 増殖作用を促進する。

マスト細胞増殖因子として知られている IL-3, SCF に対する IL-9 の BMMC 増殖への効果を検討したところ、IL-3 および SCF はそれぞれ単独で増殖促進を示すが、IL-9 は効果がなくその促進作用は IL-3 および SCF との共培養により促進作用が見られ、特に SCF との共培養で強く見られた (Fig. 2)。

(3) IL-9 はオートクラインによりマスト細胞増殖に関与する。

LPS 刺激により IL-9mRNA の発現が強く見られたことから、オートクラインの可能性を検討した。はじめに IL-9 レセプターの発現を mRNA および間接蛍光抗体法で解析したところ、ともに恒常的に強い発現が認められた (Fig. 3)。

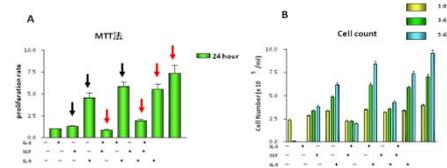


Fig.2 サイトカイン(IL-3,SCF,IL-9)添加によるBMMC増殖への影響。

A: MTT法による測定。B: ヘモサイトメーターを用いた直接細胞カウントによる測定。

(4) IL-3 は LPS 刺激による IL-9 の産生を促進する。

次に BMMC からの LPS による IL-9 産生量を ELISA 法を用いて検討したところ、IL-9 の産生が見られ、その産生は IL-3 存在下で最も多く見られた。以上の結果から、LPS 存在下におけるマスト細胞増殖のメカニズムとして、IL-9 の産生が誘導され、それは自身の IL-9 受容体に結合してオートクラインが誘導される。BMMC からの IL-9 産生は IL-3 存在下で促進され、IL-9 によるオートクラインでの増殖促進には SCF が促進効果を示すという機構が存在することが示唆された (Fig. 4)。

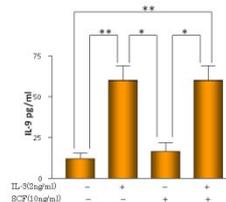


Fig.4 Effect on IL-9 secretion in BMMCs co-stimulated with LPS and IL-3 and/or SCF. BMMCs (1x10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated for 24 h with LPS(1 mg/ml) ± IL-3(2 ng/ml) ± SCF(10 ng/ml). Culture supernatants were tested for cytokine IL-9 by ELISA. Data are representative of three independent experiments, showing the means ± SD from triplicate cultures. (\*p < 0.05 \*\*p < 0.01)

(5) LPS刺激はTLR-4を介してIL-9プロモーター活性が促進される。

IL-9のプロモーター領域をクローニングし、レポーターアッセイ用のベクターを作製し、これまで得られた条件での IL-9プロモーター領域での活性化を検討し、LPS依存的にIL-9プロモーター領域が動くことおよびその受容体はTLR-4であることをレポーターアッセイで確認した (Fig. 5, 6)。これまで得られたLPSによるマスト細胞での詳細なIL-9の産生機構が確認された。

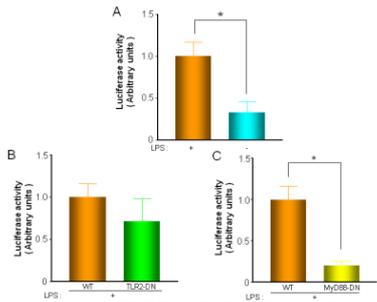


Fig.6. Gene activation of IL-9 by WT, TLR2-DN and MyD88-DN. TLR2-DN and MyD88-DN were transiently transfected with reporter gene (IL-9-Luc),  $\beta$ -galactosidase in BMMC cells. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity, and luciferase in the cell lysate treated with LPS was set to 1. A representative result from three independent experiments is shown. The data are expressed with the mean  $\pm$  SEM (\* $p$ <0.05).

LPS刺激がTLR2ではなくTLR4を介してIL-9転写を誘導していることが示唆された。

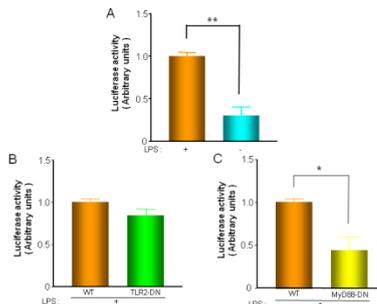


Fig.5. Gene activation of IL-9 by WT, TLR2-DN and MyD88-DN. TLR2-DN and MyD88-DN were transiently transfected with reporter gene (IL-9-Luc),  $\beta$ -galactosidase in MC/9 cells. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity, and luciferase in the cell lysate treated with LPS was set to 1. A representative result from three independent experiments is shown. The data are expressed with the mean  $\pm$  SEM (\*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05).

LPS刺激がTLR2ではなくTLR4を介してIL-9転写を誘導していることが示唆された。

(6) マスト細胞でのLPSによるIL-9産生は複数の経路を介して起こる。

LPSによるマスト細胞でのIL-9産生はMAPKおよびERK阻害剤により、部分的に産生が抑制され、NF $\kappa$ Bレポーター活性との結果から(未掲載)、少なくともMAPK、ERK、NF $\kappa$ Bの3経路を介して発現されることが示された(Fig.7)。

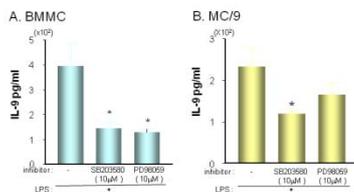


Fig.4. Effects of inhibitor on IL-9 secretion in LPS-stimulated BMMC or MC/9. BMMC and MC/9 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu$ g/ml) for 24 h. SB203580 ( $10 \mu$ M) or PD98059 ( $10 \mu$ M) added to cells for inhibit signaling at same time of stimulate. IL-9 in culture supernatants was measured by sandwich ELISA. A representative result from three independent experiments is shown. The data are expressed with the mean  $\pm$  SEM. (\* $p$ <0.05).

抑制が見られたことからp38MAPKの経路とERKの経路がIL-9発現に関係していることが示唆された。

## 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0件)

[学会発表] (計17件)

1. 池田輝雄他5名, 活性酸素関連酵素p47phoxの動態, 第146回日本獣医学会, 2008年9月25日, 宮崎県
2. 池田輝雄他3名, LPS刺激に対するBMMCでのシグナル伝達経路の阻害剤の及ぼす影響, 第146回日本獣医学会, 2008年9月25日, 宮崎県
3. 池田輝雄他7名, マスト細胞でのIL-9分泌転写調整機構, 第146回日本獣医学会, 2008年9月25日, 宮崎県
4. 池田輝雄他6名, マスト細胞の細胞内活性酸素産生能および抗原提示能, 第146回日本獣医学会, 2008年9月25日, 宮崎県
5. 池田輝雄他5名, PCB126によるマスト細胞免疫応答の抑制, 第146回日本獣医学会, 2008年9月25日, 宮崎県
6. 池田輝雄他7名, マスト細胞からのサイトカイン産生に対するアスコルビン酸の作用, 第146回日本獣医学会, 2008年9月25日, 宮崎県
7. 池田輝雄ほか4名, IL-9は単体では骨髄由来マスト細胞の増殖を促進しないが, IL-3およびSCFとの共刺激で増殖作用を示す, 第144回日本獣医学会, 2007年9月4日, 北海道江別
8. 池田輝雄ほか4名, 4種類の異なる精製度のLPS刺激に対するRaw 264での前炎症性サイトカインmRNA発現, 第144回日本獣医学会, 2007年9月4日, 北海道江別
9. 池田輝雄ほか4名, 4種類の異なる精製度のLPS刺激に対するRaw 264でのシグナル伝達, 第144回日本獣医学会, 2007年9月4日, 北海道江別
10. 池田輝雄ほか4名, 高感度マイクロプレート法によるchemiluminescence probeを用いた活性酸素測定法と異なるSODによる抑制

- 効果の違い、第144回日本獣医学会、2007年  
9月4日、北海道江別
11. 池田輝雄ほか7名、免疫担当細胞に対するアスコルビン酸の作用、第145回日本獣医学会、2008年3月29日、神奈川県相模原市
  12. 池田輝雄ほか7名、BMMCはLPS刺激によってIL-9を産生する、第145回日本獣医学会、2008年3月29日、神奈川県相模原市
  13. 池田輝雄ほか7名、マスト細胞とマクロファージでのLPS刺激によるサイトカイン発現プロファイルの相違、第145回日本獣医学会、2008年3月29日、神奈川県相模原市
  14. 池田輝雄ほか7名、細胞質因子p47<sup>phox</sup>の細胞膜での増加は活性酸素生成のマーカーとなりうるか？、第145回日本獣医学会、2008年3月29日、神奈川県相模原市
  15. 池田輝雄ほか7名、LPS刺激に対するBMMCでのシグナル伝達について、第145回日本獣医学会、2008年3月29日、神奈川県相模原市
  16. 池田輝雄ほか7名、骨髓由来培養マスト細胞の増殖に対するzymosanの影響、第145回日本獣医学会、2008年3月29日、神奈川県相模原市
  17. 池田輝雄ほか7名、マスト細胞とマクロファージにおける食作用と活性酸素産生能の比較、2008年3月29日、神奈川県相模原市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 輝雄 (IKEDA TERUO)  
麻布大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：60151297

### (2) 研究分担者

村上 賢 (MURAKAMI MASARU)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：80271360  
代田 欣二 (SHIROTA KINJI)  
研究者番号：70147974

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

