

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500367

研究課題名(和文) ウイルス・癌免疫応答を修飾するマスト細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of mast cells in immune responses against virus and cancer

研究代表者

牛尾 博子 (USHIO HIROKO)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号:30317391

研究成果の概要：

マスト細胞が即時型アレルギー応答だけではなく、自然免疫応答や獲得免疫応答に広く関与していること (Galli SJ *et al.* Nat Immunol, 6:135, 2005) に着目し、ウイルス感染や癌免疫応答におけるマスト細胞の役割を、マスト細胞欠損マウス (WBB6F1-W/W^v, Wsh/Wsh) にウイルス感染やNK細胞を活性化させる薬剤を投与して正常マウスと比較することにより行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：マスト細胞、ウイルス感染、Toll 様受容体、NK 細胞、レギュラトリーT細胞

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、細胞表面にIgE抗体に対する高親和性受容体をもつことから、アレルギー反応のエフェクター細胞として注目されてきたが、その生体内での分布(皮膚、気道、消化管など)やIgE抗体が関与しないさまざまな疾患での活性化像から、マスト細胞が自然免疫応答や獲得免疫応答においても重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。マスト細胞欠損WBB6F1-W/W^vマウスを用いた癌免疫実験は存在するものの、*in vivo*ウイルス感染実験の報告は皆無である。またマスト細胞の直接的な抗ウイルス作用

や抗癌作用はもとより、抗ウイルスや抗癌に関与する細胞とマスト細胞のクロストークの存在やそれらのウイルス感染や癌免疫における意義に着目した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

マスト細胞欠損WBB6F1-W/W^v, Wsh/Wshマウスを用いた*in vivo*ウイルス感染免疫応答や癌免疫応答を通じて、マスト細胞の直接的な抗ウイルス作用や抗癌作用はもとより、抗ウイルスや抗癌に関与する免疫細胞とマスト細胞とのクロストークの存在を明らかにすることにより、マスト細胞の新たな機

能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞欠損W/W^v、Wsh/Wshマウスおよび正常マウスにさまざまなウイルス（マウス肝炎ウイルス、mouse hepatitis virus: MHV、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV) や脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis: EMCV) を感染させ、感染後の生存率や血中サイトカインの産生を測定する。

(2) Toll様受容体 (TLR) 3やTLRのアダプター分子MyD88を欠損するマウスの骨髄からin vitroでマスト細胞を誘導し、上記ウイルスや合成二重鎖RNA (Poly I:C) を加えた際に産生されるサイトカインを測定する。

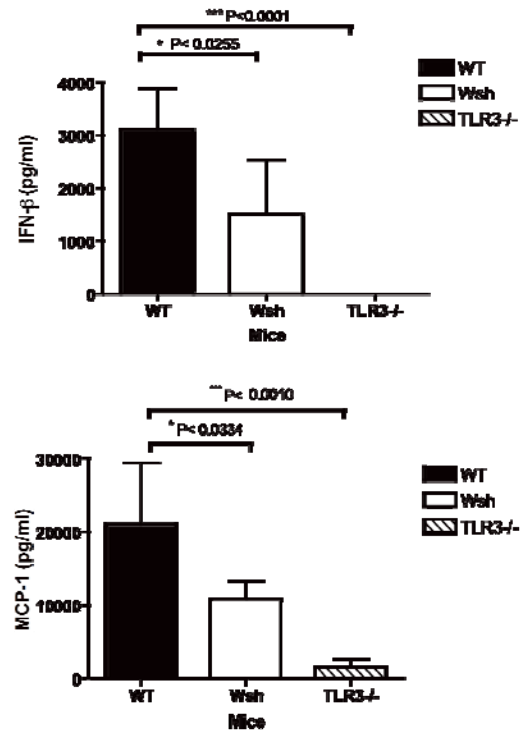
(3) マスト細胞欠損W/W^v、Wsh/Wshマウスおよび正常マウスに合成二重鎖RNAを投与前後にNK細胞を採取し、その細胞傷害活性をYAC-1細胞をターゲットに比較する。

4. 研究成果

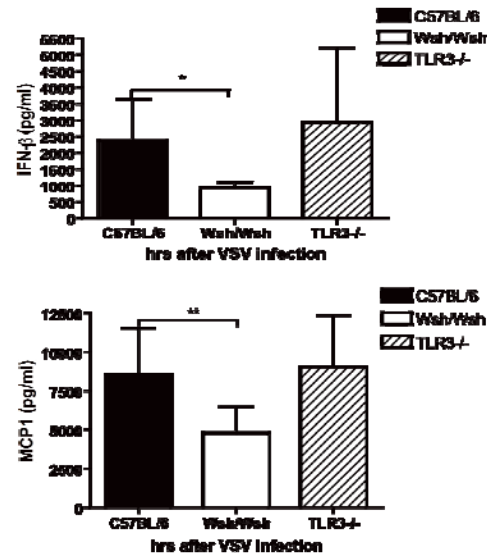
(1) マスト細胞欠損W/W^v、Wsh/Wshマウスおよび正常マウスに合成二重鎖RNAやさまざまなウイルス（マウス肝炎ウイルス、mouse hepatitis virus: MHV、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV) や脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis: EMCV) を投与し、感染後の生死や血中サイトカインの産生を測定した。その結果、合成二重鎖RNAの投与における血中サイトカインの産生は、マスト細胞欠損マウスで有意に低下しており、TLR3欠損マウスで著しく障害されていた (図1)。ウイルス感染においても、マスト細胞欠損マウスではIFN-βやMCP-1の産生低下を呈したものの、PolyI:C投与の時とは異なり、TLR3欠損マウスのサイトカイン産生の障害はみられなかった。しかしながら、実際のin vivoのウイルス感染において、マスト細胞欠損マウスで生存率の低下がみられたのはMHV感染だけであった (図3)。MHV感染では、各臓器におけるウイルスタイターもマスト細胞欠損マウスで高値を示した。正常マウスからの骨髄由来マスト細胞の移植により腹腔のマスト細胞を修復したのもこの症状は改善されず、MHVによるマスト細胞欠損マウスの生存率の低下には、マスト細胞欠損マウスのその他の欠損や全身性のマスト細胞の関与が示唆された。

(図1) 合成二重鎖RNA投与による血中サイトカインの産生: 合成二重鎖RNAの投与によ

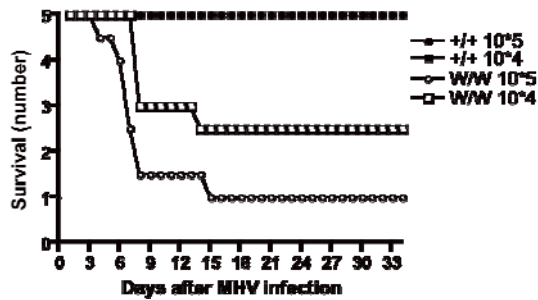
るIFN-β、MCP-1の産生はマスト細胞欠損マウスで低下しており、TLR3欠損マウスでは著しく障害されていた。



(図2) VSVウイルス感染後の血中サイトカイン産生: VSV感染によるIFN-β、MCP-1の産生はマスト細胞欠損マウスで低下しているがTLR3欠損マウスでは低下していなかった。また、これらのマウス群でVSV感染による致死率に差はみられなかった。



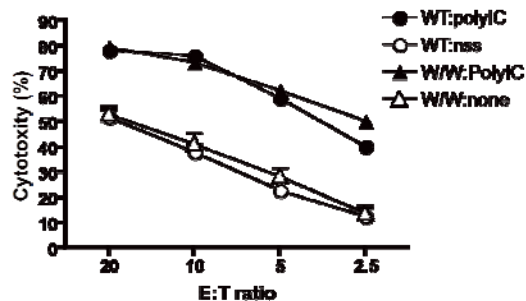
(図3) MHV感染における生存率: MHV感染によりマスト細胞欠損W/W^vマウスは正常マウスに比べて高い致死率を示した。



(2) In vitroで骨髄から培養したマスト細胞をこれらのウイルスで刺激すると、ウイルスの用量に依存してI型IFNやケモカインの産生が観察された。TLR3やTLRのアダプター分子MyD88を欠損するマスト細胞でも正常マウスと同レベルのサイトカイン産生がみられたことから、これらのウイルスによるマスト細胞の活性化にはTLR以外の細胞質内RNA認識分子の関与が示唆された。

(3) 合成二重鎖RNAを投与する前後でマスト細胞欠損W/W^v、Wsh/Wshマウスおよび正常マウスの脾臓から採取したNK細胞の細胞傷害活性を比較したところ、合成二重鎖RNAの投与により、いずれのマウスのNK細胞も細胞傷害活性が高まったものの、その活性化の過程にマスト細胞の有無による差異はみられなかった(図4)。

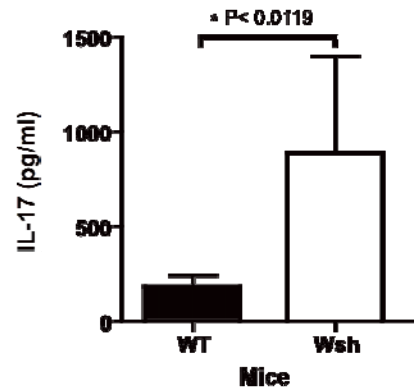
(図4) 合成二重鎖RNA(PolyI:C)投与前後の脾臓NK細胞の細胞傷害活性: 正常マウスもマスト細胞欠損マウスもPolyI:C投与によりNK活性の亢進がみられるが、その程度に差はみられなかった。またPolyI:C投与前のNK活性にも差はみられなかった。



(4) LPSの投与では、マスト細胞欠損マウスにおいて、IL-17の産生の亢進がみられ、レギュラトリーT細胞の誘導や機能にマスト細胞が影響する可能性を示唆する結果を

得た(図5)。

(図5) リポポリサッカライド投与後の血中IL-17の産生: 正常マウスに比べマスト細胞欠損マウス(Wsh、W/W^v)でIL-17の産生が有意に高かった。



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 10 件)

Ebihara N, Chen L, Tokura T, Ushio H, Iwatsu M, Murakami A. Distinct functions between Toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelia cells, *Ophthalmic Res*, 39, 155-163, 2007, 有

Ebihara N, Yamagami S, Chen L, Tokura T, Iwatsu M, Ushio H, Murakami A. Expression and function of toll-like receptor-3 and -9 in human corneal myofibroblasts, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 3069-3076, 2007, 有

Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, Jayawardana STM, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H, The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor4, *J Leuk Biol*, 82, 657-665, 2007, 有

Jayawardana TMS, Ushio H, Niyonsaba F, Gondokaryono SP, Takenaka H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H., Monomeric IgE and lipopolysaccharide synergistically prevent mast-cell apoptosis, *Biochem*

Biophys Res Commun, 365, 137-42, 2008, 有
Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, Ikeda S, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa, Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. Immunology, 124, 357-367, 2008, 有
Ishikawa Y, Tokura T, Nakano N, Hara M, Niyonsaba F, Ushio H, Yamamoto Y, Tadokoro T, Okumura K, Ogawa H., Inhibitory Effect of Honeybee-Collected Pollen on Mast Cell Degranulation in vivo and in vitro, J Med Food, 11, 14-20, 2008, 有
Niyonsaba F, Suzuki A, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. Br J Dermatol, 160, 243-249, 2009, 有
Kinoshita H, Takai T, Le AT, Kamijyo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Ogawa T, Gunawa H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA, J All Cli Immunol, 123, 179-186, 2009, 有
Ishikawa Y, Tokura T, Ushio H, Niyonsaba F, Yamamoto Y, Tadokoro T, Ogawa H, Okumura K. Lipid- soluble components of Honeybee-Collected Pollen exert anti-allergic effect by inhibiting IgE-mediated mast cell activation in vivo, Phytotherapy Research, in press, 2009, 有
Ebihara N, Nakayama M, Tokura T, Ushio H, Murakami A. Expression and function of fibroblast growth factor-inducible 14 in human corneal myofibroblasts, Exp Eye Res, in press, 2009, 有

[学会発表] (計 7 件)

田原口元子、牛尾博子、滝本一広、山田靖子
マウス肝炎ウイルス感染におけるマスト細胞の役割、第 143 回日本獣医学会 (つくば国際会議場)、2007 年 4 月

海老原伸行、中山勝文、戸倉智子、牛尾博子、山上 聡、村上 晶、角膜実質細胞における TWEAK/Fn14 システム、第 32 回角膜カンファランス (東京)、2008 年 2 月

Takenaka H, Ushio H, Niyonsaba F, Suto H, Okumura K, Ikeda S. Synergistic activation of murine mast cells by monomeric IgE and Toll-like receptor ligands、第 5 回国際研究皮膚科学会 (京都)、2008 年 5 月

Kinoshita H, Takai T, Tuan LA, Kamijyo S, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Ogawa T, Wang XL, Gunawan H, Suto H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. TSLP production by keratinocytes stimulated with double-strand RNA and Th2/TNF cytokine、第 5 回国際研究皮膚科学会 (京都)、2008 年 5 月

竹中洋史、牛尾博子、ニヨンサバ フランソワ、須藤 一、池田志孝、奥村康、単量体 IgE と Toll-like receptor リガンドによる相乗的なマスト細胞活性化の検討、第 58 回日本アレルギー学会 (東京)、2008 年 11 月

ニヨンサバ フランソワ、牛尾博子、小川秀興、奥村康、Human β -defensins and cathelicidin LL-37 on IL-31 production in human mast cells、第 58 回日本アレルギー学会 (東京)、2008 年 11 月

ニヨンサバ フランソワ、牛尾博子、小川秀興、奥村康、Human β -defensins and cathelicidin LL-37 on IL-31 production in human mast cells 第 38 回日本免疫学会 (京都)、2008 年 12 月

[図書] (計 1 件)

牛尾博子、マスト細胞による殺菌作用、科学評論社 臨床免疫・アレルギー科、49 巻、595-598、2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛尾博子 (USHIOHIROKO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30317391

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者