

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791091

研究課題名（和文） Notchシグナルによって制御されるマスト細胞の成熟と抗原提示細胞機能の解析

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanisms of Notch signaling-induced mast cell maturation and antigen-presenting cell functions

研究代表者

中野 信浩（NAKANO NOBUHIRO）

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：30420839

研究成果の概要（和文）：マスト細胞はアトピー性皮膚炎や食物アレルギー等のアレルギー炎症性疾患の発症や増悪において重要な役割を果たしている。我々は、マスト細胞表面に発現する Notch 受容体を介したシグナルが、マスト細胞における機能の発現や細胞成熟に寄与していることを見出した。本研究では、マウス骨髄細胞由来マスト細胞を用いて、Notch シグナルによって誘導される抗原提示細胞機能発現と細胞成熟の分子的な機序を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mast cells play an important role in the pathogenesis of allergic inflammatory disorders, such as atopic dermatitis and food allergy. We have previously shown that Notch receptor-mediated signaling contributes to expression of mast cell functions and mast cell maturation. In this study, we elucidated the molecular mechanisms by which Notch signaling induces the antigen-presenting cell functions and the cell maturation in mouse bone marrow-derived mast cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：アレルギー学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：マスト細胞、Notchシグナル、MHC class II、mast cell protease

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎や食物アレルギー等のアレルギー炎症性疾患の病態において、マスト細胞が主要なエフェクター細胞として働いていることはよく知られている。さらに、病理学的な観察結果や動物モデルを用いた研究結果から、マスト細胞はアレルギー炎症性疾患の病態の成立や増悪過程にも関与していることが強く示唆されている。しかし、病態の成立過程や増悪過程におけるマスト

細胞の具体的な役割については不明な点が多い。最近、接触性皮膚炎、喘息、リウマチ、多発性硬化症等のヘルパーT細胞が主体となる疾患のマウスモデル研究から、これらの疾患の発症にもマスト細胞が関与していることが報告されている。これら研究結果は、マスト細胞がT細胞の活性化や機能修飾を介して疾患の発症に関与していることを示唆しており、アレルギー炎症性疾患の病態成立過程においても同様なマスト細胞とT細胞の相

相互作用が予測される。しかし、その相互作用の機序の詳細は明らかでない。

我々はこれまでに、マウスのマスト細胞表面上に Notch 受容体が恒常的に発現しており、Notch リガンドで刺激することによりマスト細胞表面上に MHC class II 分子と補助刺激分子 OX40 リガンドの発現が誘導されることを報告している。MHC class II 分子と補助刺激分子はヘルパー T 細胞に抗原を提示して活性化させるための必須の分子であり、*in vitro* の実験系において Notch リガンドで刺激されたマスト細胞は抗原提示により CD4⁺ T 細胞を活性化できることも報告している。しかし、マスト細胞において Notch 受容体を介したシグナルがどのように MHC class II 分子の発現を誘導するのか、具体的な機序は全く不明であった。この機序の解明は、マスト細胞が抗原提示細胞としての機能を持つことに説得力を与えるだけでなく、どのような状況下において T 細胞と直接相互作用するのか推定できるため、アレルギー炎症性疾患の病態成立機序の理解においても必須である。

また、我々は Notch 受容体を介したシグナルがマスト細胞の成熟マーカーである mouse mast cell protease の発現を顕著に誘導することも明らかにしている。Notch シグナルとマスト細胞の機能的・形態的な成熟の関係およびその機序の解明も、アレルギー炎症性疾患の病態の成立や増悪の機序を明らかにするために重要である。

2. 研究の目的

(1) Notch シグナルがマスト細胞に MHC class II 分子の発現を誘導する分子的機序を解明する。また、MHC class II 分子を発現し、抗原提示細胞機能を持つマスト細胞の生理的意義を明らかにする。

(2) Notch シグナルがマスト細胞の成熟を誘導する分子的機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞の調製

BALB/c マウスから骨髓細胞を採取し、interleukin (IL)-3 と stem cell factor (SCF) 存在下で 3~4 週間培養して、マスト細胞へと分化させたマウス骨髓由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell: BMMC) を得た。

(2) マスト細胞と Notch リガンド強制発現細胞株の共培養

BMMC を Notch リガンドで刺激するため、BMMC と各 Notch リガンド強制発現 CHO 細胞株を 6~7 日間共培養させた。共培養後、磁気標識ビーズを用いてマスト細胞のみを回収し、リアルタイム-PCR 法、ウエスタンブロッ

ト法、クロマチン免疫沈降法による解析に使用した。Notch リガンド強制発現 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) レトロウイルスベクターを用いた BMMC への遺伝子導入

レトロウイルスベクター pMXs-puro に Notch1 または Notch2 の細胞内領域 (intercellular domain: IC) をコードする cDNA を組み込み、パッケージング細胞株 PLAT-E を用いて作製したレトロウイルスを BMMC に感染させ、puromycin によるセクションを経て、Notch1^{IC} または Notch2^{IC} を安定的に発現するマスト細胞を得た。pMXs-puro ベクターおよび PLAT-E 細胞株は東京大学医学研究所・北村俊雄 教授より供与されたものを使用した。また、本実験は順天堂大学組換え DNA 安全委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) Notch1 を介したシグナルが type III-CIITA の発現を介してマスト細胞に MHC class II 分子の発現を誘導する

マスト細胞には Notch1 と Notch2 の 2 種類の Notch 受容体が発現している。レトロウイルスベクターを用いて Notch1^{IC} または Notch2^{IC} cDNA を BMMC に導入し解析した結果、マスト細胞における MHC class II 発現には Notch1 を介したシグナルが重要であることが示された。

次に、MHC class II mRNA の発現は class II transactivator (CIITA) と呼ばれる転写因子により直接制御されていることから、CIITA 発現に対する Notch シグナルの影響を解析した。マウス CIITA には 3 種のサブタイプがあり、type I-CIITA はミエロイド系細胞、type III-CIITA はリンパ球系細胞、type IV-CIITA はインターフェロン- γ 刺激に応じて発現が誘導され、MHC class II 発現を制御している。本研究において、マスト細胞では Notch シグナルにより type III-CIITA の発現が誘導されること、Notch シグナルは type III-CIITA mRNA 発現に重要なプロモーター III 領域への転写調節因子 PU.1 結合を促進させることが明らかとなった (図 1)。

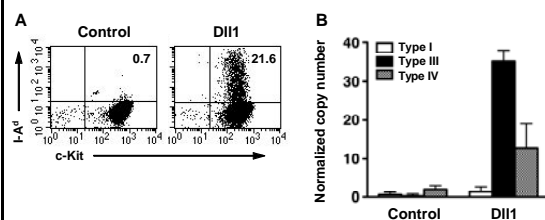


図 1. Notch リガンド刺激された BMMC の MHC class II と CIITA の発現 (発表論文 (2) より引用改変)
A. Notch リガンド D111 で刺激した BMMC の約 22% に MHC class II (I-A^d) 発現が誘導された。B. I-A^d-BMMCs では type III-CIITA mRNA の発現が優位であった。

また、マウス脾臓内に存在するマスト細胞の約38%はMHC class II陽性であり、脾臓マスト細胞においてもtype III-CIITAの優位な発現が確認された(図2)。

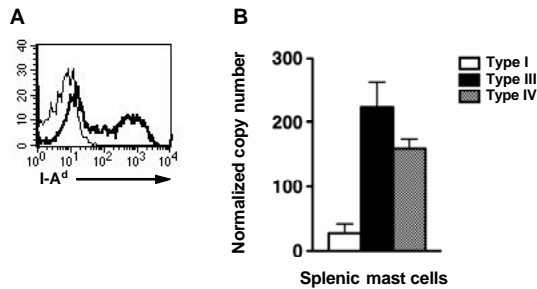


図2. マウス脾臓マスト細胞のMHC class IIとCIITAの発現(発表論文(2)より引用改変)

A. BALB/cマウス脾臓中に存在するマスト細胞の約38%はMHC class II (I-A^d)陽性。B. BALB/cマウスの脾臓マスト細胞におけるCIITA mRNA発現。BMMCをNotchリガンドで刺激したときと同様に、type III-CIITAが優位に発現している。

以上の結果から、マスト細胞におけるMHC class II発現の分子の機序が解明され、生体内においても同様の機序が働いていることが示された。

(2) Notchシグナルによるマスト細胞の成熟にTescalcinが寄与している

Notchリガンドで刺激されたBMMCでは、通常のBMMCでは発現が認められない成熟した粘膜型マスト細胞のマーカー分子であるmouse mast cell protease (mMCP)-1, 2, 4の発現が見られた。また、β-hexosaminidase releaseアッセイの結果から、Notchリガンド刺激されたBMMCにおける脱顆粒能の亢進も見られた。マスト細胞は成熟に伴い脱顆粒能が亢進すると報告されていることから、Notchシグナルがマスト細胞の成熟を誘導または促進していることが示された。

加えて、BMMCにおいてNotchリガンド刺激による成熟に伴いTescalcin (*Tesc*) 遺伝子の発現上昇が見られた。*Tesc*は細胞膜タイプNa⁺/H⁺ exchanger NHE1に会合し、細胞内pHの調節に関与していると考えられている。蛍光性pH指示薬BCECFを用いた解析から、Notchリガンドで刺激されたBMMCやサイトカインを用いて成熟させたBMMCでは細胞内pHが低下していることが認められた。また、レトロウイルスベクターを用いて*Tesc* cDNAをBMMCに導入したところ、細胞内pHの低下が見られたことから、Notchシグナルは*Tesc*の発現誘導を介して細胞内pHを低下させることが示された。今後、細胞内pHの低下とマスト細胞の形態的、機能的変化の関係をより詳細に解析することで、マスト細胞の成熟や分化過程に関する重要な情報が得られると

考えている。

(3) 本研究課題により得られた研究成果の意義と今後の展開

MHC class IIはヘルパーT細胞への抗原提示を介して獲得免疫反応を開始させる重要な分子である。樹状細胞やマクロファージがMHC class IIを発現する抗原提示細胞として知られているが、生体内にMHC class II陽性マスト細胞が存在することも以前から報告されていた。しかし、研究に使用できる量のマスト細胞を組織から分離することが困難であることや、BMMCにおいてMHC class IIの発現が認められないこと等から詳細は不明であった。本研究において、マスト細胞におけるMHC class IIの発現機序が解明できた意義は大きいと考えている。今後は、MHC class II陽性マスト細胞がどのようにアレルギー炎症性疾患の発症や増悪に関わっているのか、個体レベルで解析することが必要である。また、Notchシグナルがマスト細胞の成熟を誘導することの生理的意義についても個体レベルでの解析が必要であり、これらの解析を行うことでアレルギー炎症性疾患の病態解明に重要な情報が得られると期待している。

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8件)

- (1) Kitamura N, Yokoyama H, Yashiro T, Nakano N, Nishiyama M, Kanada S, Fukai T, Hara M, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C. Role of PU.1 in MHC class II expression through transcriptional regulation of class II transactivator pI in dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* **129**:814-824. e6 (2012). (査読有り)
- (2) Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, Koyanagi A, Ogawa H, Okumura K. Notch1-mediated signaling induces MHC class II expression through activation of class II transactivator promoter III in mast cells. *J Biol Chem.* **286**:12042-8 (2011). (査読有り)
- (3) Kanada S, Nishiyama C, Nakano N, Suzuki R, Maeda K, Hara M, Kitamura N, Ogawa H, Okumura K. Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood.* **117**:2211-22 (2011). (査読有り)
- (4) 中野信浩, マスト細胞機能とNotch, *臨床免疫・アレルギー科.* **55**(6):589-94

- (2011). (査読なし)
- (5) 中野信浩, 抗原提示細胞としての機能をもつマスト細胞と好塩基球, *化学と生物*. **49**(4):224-6 (2011). (査読なし)
- (6) Shimokawa N, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Suzuki R, Hara M, Fukai T, Tokura T, Miyajima H, Nakao A, Ogawa H, Okumura K. Suppressive effects of transcription factor GATA-1 on cell type-specific gene expression in dendritic cells. *Immunogenetics*. **62**:421-9 (2010). (査読有り)
- (7) Wang QH, Nishiyama C, Nakano N, Kanada S, Hara M, Kitamura N, Shimokawa N, Lu CL, Ogawa H, Okumura K. Opposite effects of Trichostatin A on activation of mast cells by different stimulants. *FEBS Lett*. **584**:2315-20 (2010). (査読有り)
- (8) 中野信浩, マスト細胞による抗原提示と Th2 細胞の誘導, *臨床免疫・アレルギー科*. **53**(6): 620-5 (2010). (査読なし)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 中野信浩、マスト細胞の IL-4 産生が Notch シグナルによって増強されるメカニズムの解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都
- (2) 中野信浩、Antigen-presenting cell function induced in mast cells by Notch1-mediated signaling、The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology、2011 年 12 月 9 日、京都
- (3) 中野信浩、Tescalcin contributes to maturation of mucosal-type mast cells、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 29 日、千葉
- (4) 中野信浩、マスト細胞の IL-4 産生が Notch シグナルによって増強される機序の解析、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2011 年 11 月 12 日、東京
- (5) 中野信浩、Notch シグナルによるマスト細胞の IL-4 産生能の増強、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月、東日本大震災のため要旨集のみ発行、口頭発表中止
- (6) 中野信浩、マスト細胞の成熟に寄与する遺伝子 Tescalcin の解析、第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010 年 11 月 27 日、東京

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/lab/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・医学研究科・助教
研究者番号：30420839