

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791178

研究課題名(和文) PU.1 を過剰発現させた肥満細胞による CD11c 蛋白の発現誘導の検討

研究課題名(英文) The study of CD11c expression by overexpressed PU.1 in mast cells

研究代表者

伊藤 友章 (ITO, TOMONOBU)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70398767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：転写因子PU.1を過剰発現させると肥満細胞から樹状細胞様細胞に変化する。CD11c陽性肥満細胞に分化する因子を見出すために、皮膚組織内で共存する、線維芽細胞の影響を重点にしぼり、増殖因子により樹状細胞様細胞に誘導しうるか検討した。肥満細胞と線維芽細胞との共培養させた肥満細胞では、単球系遺伝子を誘導する事は出来なかった。しかし、共培養にIL-33を添加すると、MHC class IIの発現を認める事を確認した。IL-33で処理した肥満細胞では転写因子PU.1の発現上昇を認め、機能面では、T細胞活性能を認めた。IL-33は、転写因子PU.1によりMHC class IIを発現誘導させる。

研究成果の概要(英文)：We reported that over-expression of PU.1, a myeloid- and lymphoid-specific transcription factor belonging to the Ets family, induces monocyte-specific gene expression in mast cells. In order to identify the factor mediating differentiation into CD11c positive mast cells, we focused our research on fibroblasts co-existing within the dermal structure to determine whether the growth factors secreted by these fibroblasts could induce differentiation into dendritic cell-like cells. Mast cells co-cultured with fibroblasts did fail to express monocyte-specific genes. However, the addition of IL-33 to the co-culture induced MHC class II expression in the mast cells. In conclusion, IL-33 induced MHC class II expression via PU.1.

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：IL-33 MHC class II CD11c PU.1 肥満細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の細胞系列分化過程に種々の転写調節因子が関与していることが、近年明らかにされつつある。転写因子 PU.1 はリンパ球・単球・顆粒球系の分化に必須である。最近、高親和性受容体 (Fc R) プロモーター解析により肥満細胞にも転写因子 GATA-1 と PU.1 が協調的に発現していると報告されている。もともと肥満細胞の PU.1 の発現量は単球系細胞に比べ低い、造血幹細胞の分化過程において PU.1 が肥満細胞と単球系分岐とを決定している可能性が考えられる。我々は、マウス骨髄由来肥満細胞 (以下 BMDCs) に転写因子 PU.1 を過剰発現させ、分化過程において形態・機能とも肥満細胞から樹状細胞様細胞に変化することを見出した。また、成熟した BMDCs や腹腔肥満細胞に PU.1 を過剰発現させた場合にも同様な結果を得た。PU.1 を BMDCs に過剰発現させると、MHC class II が発現し抗原提示能が増強する。IFN- γ により発現制御され、MHC class II の転写因子 C/TA promoter に PU.1 が関与していることを見出した。さらに、PU.1 を過剰発現させた BMDCs は、樹状細胞様の機能を持ちながら Fc R の発現がみられる。アトピー性皮膚炎 (以下 AD) のランゲルハンス細胞では Fc R の発現がみられる。AD モデルマウス皮膚では、肥満細胞に CD11c タンパクの発現、また腹腔肥満細胞では、PU.1 発現の上昇を認めた。アトピー性皮膚炎では、PU.1 により肥満細胞が単球様細胞に分化している可能性があることを見出した。転写因子 PU.1 は血球系細胞に必須で、特に顆粒球系細胞、Bcell、Tcell、単球系細胞の分化に強く関わっており、それぞれ発現量に

差がある。白血病等の血液疾患の分野で研究が進んでいるが、肥満細胞においては PU.1 の機能解析は、研究代表者らによって世界に先駆けて実施された。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎 (以下 AD) のランゲルハンス細胞には Fc R の発現を認める。これまでの我々の研究により PU.1 を過剰発現させた肥満細胞は、Fc R の他に樹状細胞の発現分子である CD11c、CD11b、MHC class II を発現し、AD 皮膚内のランゲルハンス細胞と似た機能を持つことが判明した。PU.1 を過剰発現させた樹状細胞では、PU.1 の過剰発現により CD11b や F4/80 などの単球系遺伝子タンパクも誘導され、IFN- γ 刺激により MHC class II が発現誘導されることを確認した。しかし、樹状細胞特異的タンパク CD11c は、PU.1 単独過剰発現のみでは誘導されず、他の増殖因子等がさらに必要とされているが、現在は未だ同定されていない。本研究では、AD 皮膚内の Fc R 陽性樹状細胞は、転写因子 PU.1 の過剰な発現によって肥満細胞から樹状細胞に分化していることを明確にするため、肥満細胞が皮膚内で共存している線維芽細胞と PU.1 過剰発現した肥満細胞を共培養下に、樹状細胞特異的タンパクを発現するかどうか確認し、またこの現象に関与する線維芽細胞由来の増殖因子を同定し、肥満細胞の形態と機能の変化について

解析する。

3. 研究方法

(1). マウス骨髄細胞を、IL-3で4週間培養させたマウス骨髄由来培養肥満細胞(以下 BMMCs)を、マウス線維芽細胞株(NIH3T3)とIL-3存在下で10日間共培養する。その後、肥満細胞のみ回収し、mRNAレベルで、単球系遺伝子を検討。同様な方法で、Th1, Th2 サイトカインや線維化関連増殖因子で共培養刺激し遺伝子発現量をreal-time PCRで確認した。

(2). フロサイトメトリー

マウス線維芽細胞株(NIH3T3)と共培養させた BMMC を分離し、FcR, c-kit などの肥満細胞特異的マーカーやCD11b, MHC class II などの単球系マーカー、CD11 樹状細胞特異的マーカーを確認する。

(3). 抗原/IgE 応答性における検討
共培養させた肥満細胞を抽出し、抗原/IgE に応答した脱顆粒能やサイトカイン産生量を確認する。

(4). T 細胞の活性化と Western blotting, chip assay による解析
肥満細胞をOVA感作したCD4 T細胞と48時間共培養し、T細胞活性をBrdU法で測定。転写因子の発現や活性化はWestern blotting, chip assayで確認する。

4. 研究成果

BMMC と NIH3T3 との共培養した後の肥満細胞では、転写因子 PU.1 の発現や単球系遺伝子発現は認めなかった。しか

し、IL-33 を添加 BMMC では、mRNA と FACS で MHC class II 発現誘導をもたらした(図1)。BMMCs は、Ag/IgE 応答性の脱顆粒能の亢進を認めるが(図2)、IL-6 産生能に差を認めない。MHC class II を発現していることより、IL-33 で処理した BMMCs は、MHC class II transactivator(CIITA) gene 遺伝子を発現誘導させた CD4 陽性 Tcell 共培養では、T cell の活性化を示すが、co-stimulated molecules は発現しない。IL-33 で処理した BMMCs は、PU.1 の発現量の増加と pIII に対し PU.1 結合量と pIII と pIV に対し H4 アセチル化の亢進を認めた。

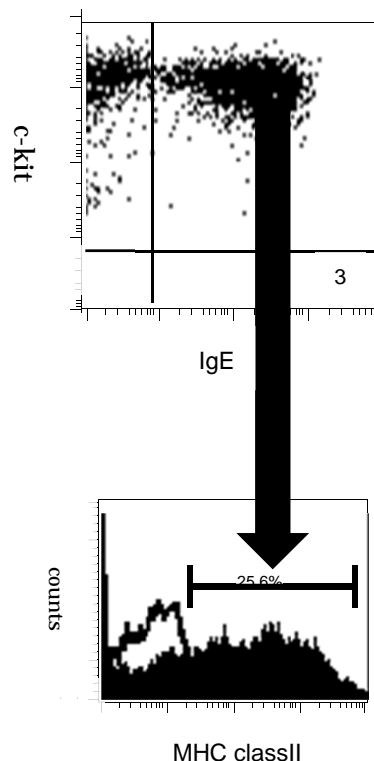


図1 4週間培養した BMMCs に IL-33 を10日間刺激すると MHC-class II の遺伝子が誘導される。

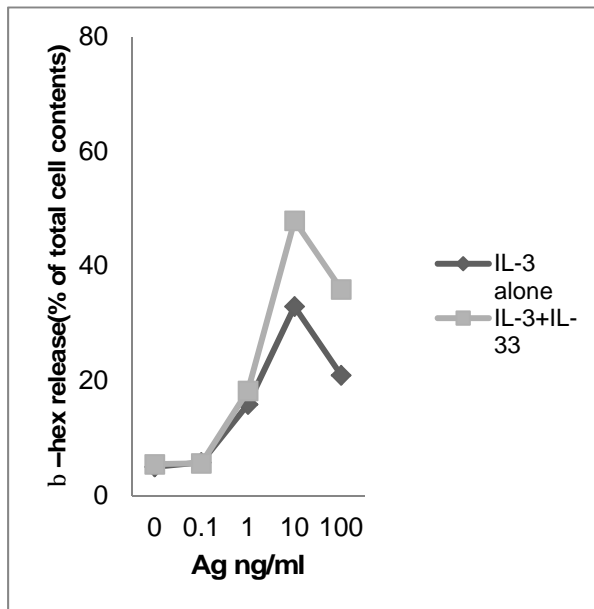


図2 4週培養した BMDCs に IL-33 を 10 日間刺激する抗原/IgE に応答した脱顆粒能が亢進することが確認できる。

結論、肥満細胞から CD11c の誘導させる事は出来なかったが、IL-33 は転写因子 PU.1 を介して成熟肥満細胞において MHC class II を誘導させる因子の一つである。アレルギー状態では血清 IL-33 が上昇する。肥満細胞も抗原提示を持つような役割を持つと期待できる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

1. 伊藤友章 他. 成熟マウス骨髄由来培養肥満細胞において、IL-33 は MHC class II を発現誘導させる. 第26回日本アレルギー学会 春季臨床大会 京都 2014年5月9日

図書

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 友章 (Tomonobu Ito)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70398767