

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870757

研究課題名(和文) マスト細胞の分化におけるIgEの作用 ～細菌易感染の機序解明を目指して～

研究課題名(英文) Effects of IgE on mast cell differentiation

研究代表者

阪中 麻利子 (SAKANAKA, Mariko)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：00425109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞の分化とそれに伴う機能獲得に与えるIgEの影響を実験的に明らかにすることを目的とし、有用な培養ツールの構築を目指し、新しい初代培養マスト細胞である「高IgE培養マスト細胞」を確立することに成功した。高IgE培養マスト細胞を詳細に解析した結果、高レベルのIgE添加により、マスト細胞の分化程度と刺激応答性が著しく変化する、IgEの抗原結合部位のアミノ酸配列の違いにより、マスト細胞の刺激応答性が変化する、グラム陰性細菌構成成分であるリポ多糖(LPS)刺激に対するサイトカイン、特にTNF-alphaの産生が著しく低下する、ことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：I established a new primary mast cells; high-dose IgE treated mast cells (HIMCs) to study the effects of IgE on differentiation and functions. Using HIMCs, I identified that IgE has a critical role of mast cell differentiation and functions. To site a case, LPS-induced cytokine production are markedly reduced in HIMCs. Interestingly, only a modest of amino acid sequence of antigen binding site changes mast cell properties. I proposed that to better understand IgE effects on mast cell differentiation and functions, how important it is that not only levels but also profiles.

研究分野：生物系薬学

キーワード：マスト細胞 IgE 分化

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎などの慢性アレルギー性疾患では、血中 IgE レベルは正常の 100-1,000 倍に増大している。こうした高 IgE 血症を伴う慢性アレルギー性疾患では細菌感染がおりやすい(Buckley RH, *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2001)。その原因は不明であり、細菌感染による疾患の難治化は患者の肉体的・精神的・経済的な負担を著しく増大させるため、原因解明は急務である。

高親和性 IgE 受容体を発現するマスト細胞は、様々な免疫応答で重要な働きを担う。マスト細胞は骨髄に由来し、前駆細胞として循環血に移行し、浸潤した組織において最終的な分化を遂げる。そのためマスト細胞の分化は、骨髄・血中・組織の環境に影響を受けると考えられる。

従来、マスト細胞の IgE 受容体を介した活性化は、IgE 受容体に結合した IgE と、それを架橋する特異抗原の存在が必要であると考えられていた。しかし近年、マウス接触性皮膚炎モデルの病態が成立する上で、特異抗原の存在は必須でなく、マスト細胞に IgE が結合している状態こそが重要であると示された(Bryce PJ et al., *Immunity*, 2004)。この知見は、IgE に抗原との特異的結合を介さない新しい作用がある可能性を強く示唆している。

申請者は、マスト細胞の分化に与える IgE の影響を調べることができる有用な培養ツールの構築を目指し、常時 IgE を加えてマウス骨髄から分化させた新しい初代培養マスト細胞、高 IgE 培養マスト細胞を確立することに成功した。さらにこの細胞において、グラム陰性細菌構成成分であるリポ多糖(LPS) 刺激に対する TNF-alpha の産生が著しく低下していることを見出した。TNF-alpha には、好中球の血管外漏出や殺菌能を高める作用がある(Galli SJ et al., *Curr Opin Immunol.; J Exp Med.*, 1991)。また、マスト細胞が産生する TNF-alpha が好中球による細菌排除応答に必須であることも報告されている(Malaviya R. and Abraham SN., *J Leukoc Biol.*, 2000)。これらの知見から申請者は、「血中 IgE レベルの持続的な上昇」は、マスト細胞の分化過程に作用し(図 1)、その分化や応答を抑制するために「細菌感染がおりやすい」という仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マスト細胞の分化、およびその過程で獲得する刺激応答性という機能面に IgE がどのような影響を与えているかについて、申請者が構築した高 IgE 培養マスト細胞を足がかりに、細胞レベルと個体レベルの両方から明らかにすることである。さらに、マスト細胞の性質の変化が個体レベルでの細菌排除応答にどのように寄与しているのかを解明する。これにより、高 IgE 血症を伴う慢性アレルギー性疾患患者が抱える細菌

易感染の問題について、その原因の解明を図る。

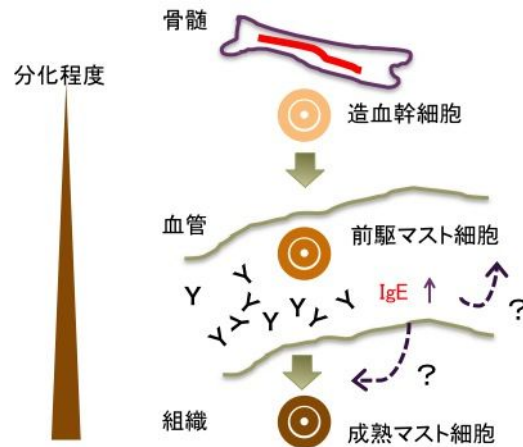


図 1: マスト細胞分化過程での IgE の作用

3. 研究の方法

マスト細胞の分化過程での IgE の影響を明らかにするため、(1) 高 IgE 培養マスト細胞の分化レベルを解析する。さらに、LPS 刺激による TNF-alpha 産生能が低下する原因を分子レベルで明らかにする。(2) 高 IgE 血症モデル動物を確立し、その腹腔より高純度に精製したマスト細胞の分化レベルを調べ、*in vitro* で得られた知見を *in vivo* で検証する。さらに、高 IgE 培養マスト細胞でみられた LPS 刺激による TNF-alpha 産生能低下が、個体レベルでの細菌排除応答にどのように寄与しているかを検証するため、(3) マスト細胞欠損マウスの局所に高 IgE 培養マスト細胞を移植して再構成させたモデルを利用し、細菌感染時の局所への好中球の動員を調べる。

4. 研究成果

(1) 高 IgE 培養マスト細胞の分化レベル

高 IgE 培養マスト細胞の調製

マウス骨髄細胞を、IL-3 および IgE 存在下でマスト細胞を調製し高 IgE 培養マスト細胞を得た。本研究においては、抗原結合部位の異なる 2 種の IgE を用いて、2 種類の高 IgE 培養マスト細胞 IgE clone A および IgE clone B を調製した。また、IgE 非存在下で調製したマスト細胞をコントロールとし、高 IgE 培養マスト細胞と比較した。

マスト細胞の分化への IgE の影響

IgE によりマスト細胞の分化にどのような変化がもたらされるのかを明らかにするため、高 IgE 培養マスト細胞の分化程度を検討した。具体的には、顆粒プロテオグリカンの硫酸化程度、IgE 受容体発現量、ヒスタミン含量、顆粒プロテアーゼ活性を検討した。IgE 受容体の発現量は、高 IgE 培養マスト細胞で顕著に増加していた。ヒスタミン含量は、高 IgE 培養マスト細胞 IgE clone A で増加して

いたが、clone B では変化がなかった。顆粒プロテアーゼの CPA 活性は、IgE clone A で低下していたが、clone B では変化がなかった。また、トリプターゼおよびキマーゼの活性はいずれも変化が認められなかった。

高 IgE 培養マスト細胞における LPS のシグナル伝達解析

高 IgE 培養マスト細胞において、グラム陰性細菌構成成分 LPS に対する TNF-alpha 産生能が著しく低下することを既に見出している。本研究では、その原因となるシグナル伝達分子の同定を試みた。

・Toll 受容体 4 (TLR4)の発現量：高 IgE 培養マスト細胞とコントロールのマスト細胞を用いて LPS 受容体 TLR4 の発現量を比較した結果、TLR4 の発現量に差異は認められなかった。

・TLR4 と MyD88 分子との会合：TLR4 の細胞内領域に MyD88 分子が会合し、いくつかの分子の活性化を介して TNF-alpha の産生誘導に重要な 2 つの転写因子 AP-1 と NF-κB の活性化を誘導することが知られている。そこで、高 IgE 培養マスト細胞とコントロールのマスト細胞に LPS をそれぞれ刺激した後、そのライセートを用いて抗 TLR4 抗体で免疫沈降を行った。さらに、MyD88 の抗体でイムノプロットを行い、TLR4 と MyD88 の会合を調べた。MyD88 の発現量は、高 IgE 培養マスト細胞とコントロールのマスト細胞との間で差異は認められなかった。次に、LPS 刺激時の TLR4 と MyD88 の会合を調べた結果、高 IgE 培養マスト細胞の IgE clone A では、LPS 刺激の有無に関わらず、常時 TLR4 と MyD88 が会合していることがわかった。一方、IgE clone B ではそのような変化は認められず、コントロールマスト細胞と同様の結果であった。

・JNK、p38 および NF-κB の活性化：転写因子 AP-1 を活性化する JNK および p38 のリン酸化レベルを解析した。その結果、LPS 刺激の有無に関わらず高 IgE 培養マスト細胞において、JNK および p38 が顕著にリン酸化されていることがわかった。また、高 IgE 培養マスト細胞における転写因子 NF-κB のリン酸化レベルを調べたところ、JNK および p38 と同様に、LPS 刺激の有無に関わらず高 IgE 培養マスト細胞において、NF-κB の顕著なリン酸化がおこっていることがわかった。高 IgE 培養マスト細胞 Clone A では、常時 TLR4 と MyD88 の会合がおこっており、LPS 刺激の有無に関わらず、その下流のシグナル伝達部分分子 JNK、p38、NF-κB が常時活性化されていることが明らかとなった。一方、Clone B は Clone A とは異なり、TLR4 と MyD88 の会合は常時おこっていなかった。しかしながら、LPS 刺激の有無に関わらず、JNK、p38、NF-κB が常時活性化されていることが明らかとなった。このことから、IgE clone A は TLR4/MyD88 の会合に影響を及ぼ

し(図 2)、IgE clone B は TLR4/MyD88 より下流のシグナル伝達のどこかに影響を及ぼしている可能性が考えられ(図 2)、IgE clone による作用の違いが見出された。いずれにしても、高 IgE 培養マスト細胞は活性化されにくい状態にあり、それにより LPS 刺激による TNF-alpha サイトカインの産生量が著しく低下するものと推察された。

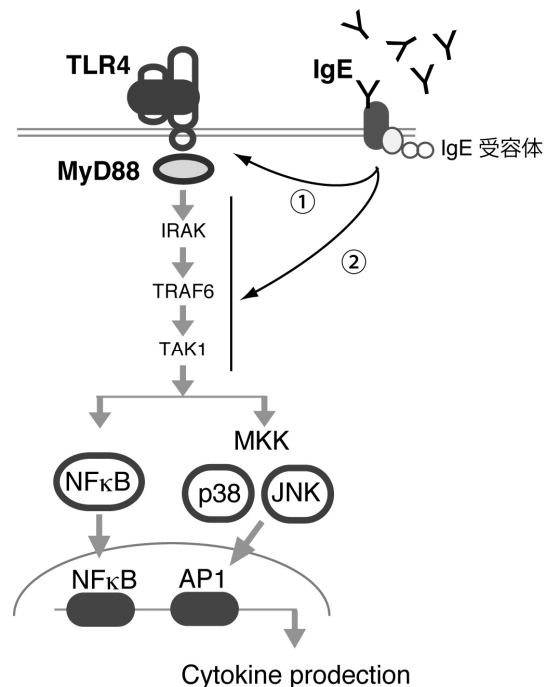


図 2：LPS 刺激応答性への IgE の作用

(2)高 IgE 血症モデル動物における組織マスト細胞の解析

高 IgE 血症モデル動物は、Finkelman 等の論文を参考に(*J. Immunol.* 1987)、抗 IgD 抗体を用いることで、確立することに成功した。また、そのマスト細胞を詳細に解析し、皮膚組織におけるマスト細胞のヒスタミン含量の増加、耳介における即時型アレルギー反応の亢進、腹腔細胞中のマスト細胞数の低下、を見出だした。

さらに、高 IgE 血症モデルとコントロール群で、腎臓、脾臓、胸腺のマイクロアレイ解析を行った。現在 R を用いて詳細な結果を解析しており、解析が済み次第、論文投稿を予定している。

(3)マスト細胞欠損マウスの高 IgE 培養マスト細胞再構成モデルを利用した細菌感染応答

武庫川女子大学の動物実験委員会において、感染実験の全面的な禁止が発表されたため、本実験は行わなかった。

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1件)

Sakanaka M, Kurimune Y, Yamada K, Hyodo N, Natsuhara M, Ichikawa A, Furuta K, Tanaka S.

Down-modulation of antigen-induced activation of murine cultured mast cells sensitized with a highly cytokinergic IgE clone.

Immunol Lett. 2016 Jun; 174: 1-8.

(査読あり)

DOI: 10.1016/j.imlet.2016.04.003.

〔学会発表〕(計1件)

阪中麻利子、高橋悟、市川厚、田中智之
マウス骨髄由来培養マスト細胞の分化過程における IgE の機能の解析

日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
発表番号; 29AB-am-250

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪中 麻利子 (SAKANAKA, Mariko)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号: 00425109