

## 研究サブ・グループ4

### マスト細胞活性化機構の解析を中心としたアレルギー疾患に及ぼすコプラナー PCBs の影響

池田輝雄（獣医学部）

舟場正幸（獣医学部）

村上 賢（獣医学部）

## 目 的

自然免疫を中心に適応免疫への関与も知られつつあるマスト細胞に対するコプラナー PCB の影響が、一部のサイトカインに見られることおよびその発現経路が他の発現経路とクロストークすること、またこれまでの結果より転写因子にコプラナー PCB へ影響を及ぼすことから、多岐にわたる遺伝子群への影響を網羅的に解析するために DNA マイクロアレイを実施した。その結果有意な上昇が6遺伝子に見られた。今回はそれら遺伝子群の動態とサイトカインを中心とした遺伝子発現との相互作用について、さらに詳細に検討した。

## 方 法

### マスト細胞の培養

マスト細胞は骨髓由来培養マスト細胞 bone marrow derived cultured mast cells (BMCMCS), MC/9 および HMC-1 を使用した。

### コプラナー PCB (PCB126) 処理マスト細胞

$2 \times 10^6$  cells/ml のマスト細胞は 10 nM の PCB126 で 24-48 時間処理された。

### RT-PCR およびリアルタイム PCR

マスト細胞からの Total RNA の調整は RNeasy Mini kit（キアゲン）を使用した。cDNA の調整は SuperScript™ III First-Strand を用いた。RT-PCR には High Fidelity Expand PCR（Roche），リアルタイム PCR には TaqMan アッセイおよび Cyber Green アッセイを用いた。それぞれの遺伝子に対するプライマーおよびプローブの設計には Primer Express 3.0（ABI）を使用した。

### サイトカインの定量

前炎症性サイトカインの定量には ELISA 法（Biosource）を用い、説明書に従い実施した。

## 結果と考察

### PCB126 処理により発現が増幅されたマスト細胞遺伝子群の RT-PCR

無処置マスト細胞と比較して RT-PCR での発現が2倍以上上昇した遺伝子群は、Mus musculus lysozyme (Lyzs), Mus musculus complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide (C1q $\alpha$ ), Mus musculus cathepsin S (Ctss), Mus musculus keratocan (Kera), Mus musculus RAB27A, member RAS oncogene, Mus musculus crp-ductin (Crpd) の6遺伝子であった（前回報告）。それぞれの遺伝子に対するプライマーを作製し RT-PCR を実施した（図1）。DNA マイクロアレイにおいて、増幅が認められたいずれの遺伝子も RT-PCR において PCB126 24時間処理によって増幅が確認された。BMMCばかりでなく、マスト細胞の細胞株である MC/9 および HMC-1 においても同様の結果が得られた（データ未掲載）。

上記の6種の遺伝子はいずれも免疫応答における抗原認識および提示に関連する遺伝子群であり、今回の結果からも示されるようにマスト細胞に対する免疫応答に PCB126 が強く関与していることが示唆された。

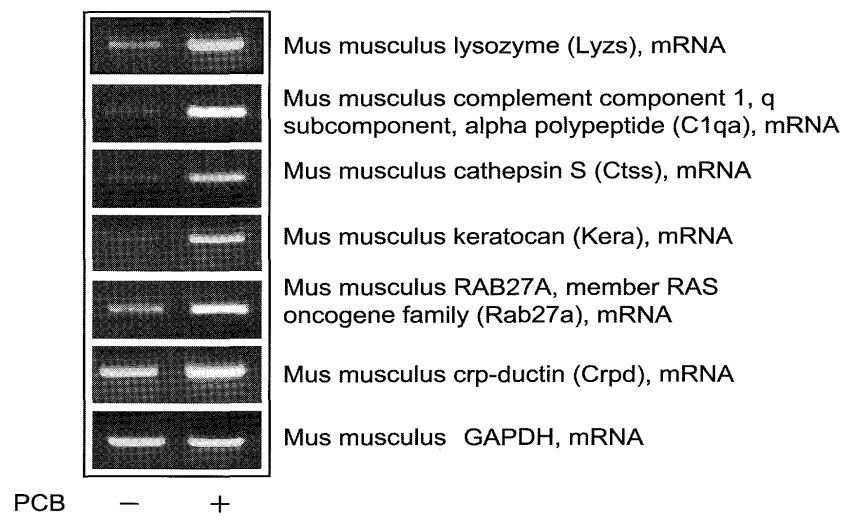


Fig.1. RT-PCR of mRNA up-regulated by coplanar PCB126 in DNA array

### LPS 刺激による誘導されるマスト細胞のサイトカイン

マスト細胞の活性化指標である脱顆粒は LPS による刺激によってわずかに誘導されただけであった (既報)。しかしながら、前炎症性サイトカインである  $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-4}$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{MCP-1}$ 、 $\text{MIP-1}$  などが早期より誘導されるほか、 $\text{IL-9}$ 、 $\text{IL-13}$  や TLR の mRNA 上昇も認められた (図 2A)。LPS 刺激によるマスト細胞サイトカイン発現は、mRNA だけではなく蛋白レベルの発現も同様に誘導されていた (図 2B)。これらの結果は、細菌感染における自然免疫および適応免疫誘導にマスト細胞が調整の中心的な役割を担っていることを示唆している。

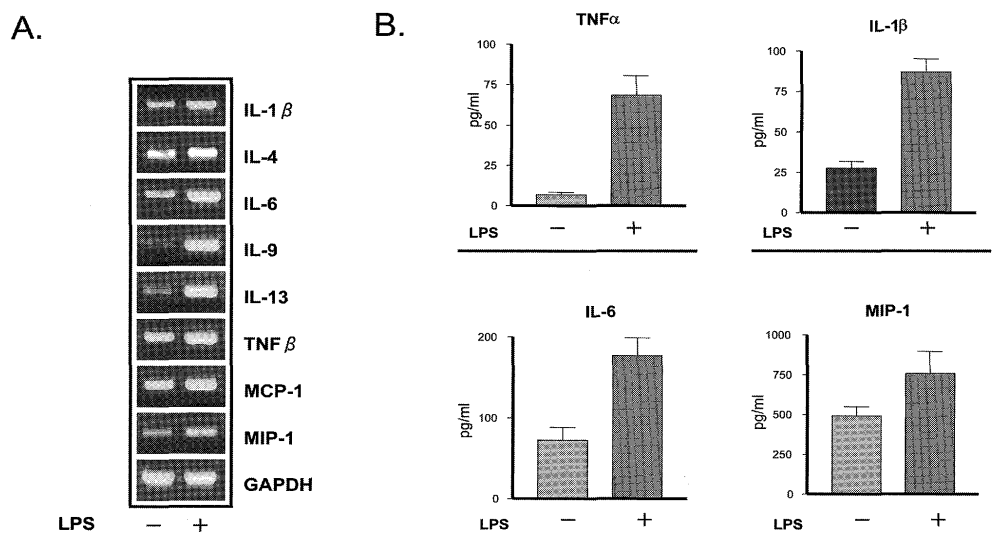


Fig.2. Gene and protein expressions of pro-inflammatory and chemokine in mast cell treated with LPS.

### PCB は LPS 刺激によるマスト細胞の免疫応答を抑制する

PCB126 にはマスト細胞における脱顆粒誘導能および顕著なサイトカイン誘導能も認められない (既報)。しかしながら LPS 刺激後での PCB126 処理では  $\text{Cyp1A1}$  の発現が阻害され、また PCB126 処理後に LPS での刺激に対しては  $\text{TNF}\alpha$  の発現が阻害された (既報)。このことは両者の間で共通するシグナル伝達経路での拮抗作用の存在が示唆されている。そこで  $\text{TNF}\alpha$  以外の PCB126 によるサイトカイン産生を検討した。前炎症性サイトカインである  $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$  などの他、ケモカイン、 $\text{Th2}$  サイトカインなどの抑制がみられた (図 3A)。そこでこの阻害機構を調べる目的で、先の DNA マイクロアレイの解析で有意な PCB126 による発現上昇が見ら

れた Cq1 についてその作用を検討した。Cq1 は免疫応答において重要な補体蛋白であり、種々な免疫機構に関与していることが知られている。図 3B で見られるように、Cq1 mRNA の発現は PCB126 特異的に誘導され、刺激後早期から高い誘導が生じることが明らかとなった。マスト細胞はその他の食細胞と同様、Cq1 受容体を発現している。Cq1 のシグナル伝達は TLR と同様 NF $\kappa$ B 経路を利用することが知られていることから、今回の結果に見られるような PCB126 によるサイトカイン抑制機構は核内での拮抗ではなく、細胞質内での NF $\kappa$ B 利用に対する競合作用である可能性が示唆された。

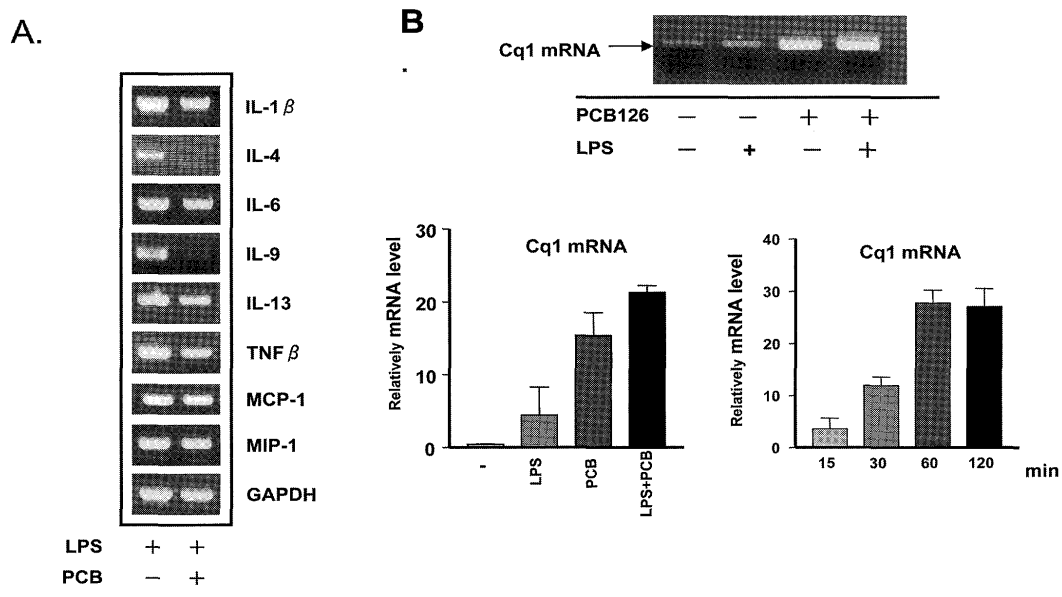


Fig.3. PCB126 inhibit gene expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines and induce Cq1 mRNA in mast cell.

## 要 約

マスト細胞は、自然免疫および適応免疫において様々なメディエーターを放出することにより細菌感染免疫応答関与している。PCB126のマスト細胞免疫応答に対する影響を調べるため、PCB126前処理マスト細胞におけるLPS刺激によるサイトカイン誘導能とその関連分子について検討した。LPS刺激によりマスト細胞は前炎症性サイトカイン、ケモカインの遺伝子および蛋白発現が上昇するが、PCB126で前処理されたマスト細胞ではその発現が阻害された。Cq1はPCB126特異的にマスト細胞内で強く誘導された。Cq1蛋白の作用機序がNF $\kappa$ Bを利用することから、PCB126によるLPS刺激後のマスト細胞サイトカイン産生抑制はNF $\kappa$ Bにおける競合による可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Murakami M, Abe M. J Leukoc Biol. 2003 Jun; 73(6): 793-801.
- 2) Ikeda T, Funaba M. 2003. Immunol Lett. Jul 3; 88(1): 21-6.
- 3) Funaba M, Ikeda T, Murakami M, Ogawa K, Tsuchida K, Sugino H, Abe M. J Biol Chem. 2003 Oct 2
- 4) Murakami M, Ikeda T., Ogawa K. and Funaba M. 2003 Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 4-10.
- 5) Malaviya, R., Ikeda, T., Abraham, SN., Malaviya, R. 2003. Immunol Lett. 15; 91(2-3): 103-111.
- 6) Ikeda T, Murakami M, Funaba M.2004. Clin Diagn Lab Immunol. Nov; 11(6): 1189-91.

*Research Group 4**“The effects of Co-PCB in allergic disorder: Analyses of mast cell functions in response to Co-PCB.”*

Teruo Ikeda, Masayuki Funaba, Masaru Murakami (School of Veterinary Medicine)

**Abstract:** Mast cells are involved in innate and Adaptive immune responses of bacterial infection by releasing various mediators. To investigate the influence of coplanar PCB126 in mast cell, gene expression of mediators and Cq1 which has an important role in immune-responses was assessed. Gene expression of mediator increased in mast cell stimulated with LPS, but rather inhibited them in PCB126 pretreatment mast cell with LPS. Gene expression of Cq1 which use the activation of transcription factor of the NFkB family was strongly and contentiously detected in PCB126 treat mast cell. Our results suggest the possibility that PCB126 may inhibit gene expression of mediators in mast cell by competing with NFkB molecules.