

免疫応答におけるマスト細胞活性化機構に関する研究： 細菌抗原による活性化

Activation of mast cell due to bacterial antigen in immune response

池田輝雄¹, 舟場正幸¹, 松田浩珍²

¹麻布大学大学院獣医学研究科

²東京農工大学大学院連合獣医学研究科

Teruo Ikeda, Masayuki Funaba¹, Hiroshi Matsuda²

¹Graduate School of Veterinary Science, Azabu University;

²United Graduate School of Veterinary Science,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Abstract: Toll-like receptors (TLRs) transmit signals of bacterial components such as lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PG) in the innate immunity. Our previous studies revealed that mast cells function as effector cells for protecting mice against lethal enterobacterial infections. In the present study we examined gene expression of molecules related with the TLR signaling, and effects of LPS and PG in bone marrow derived cultured mast cells (BMCMC). The mRNA expression of TLR 2, 4 and 6 was detected in BMCMC. In addition, CD-14, MD2 and MyD88, which are also involved in the TLR pathway, were also expressed. Neither LPS nor PG affected degranulation in BMCMC. In contrast, release of tumor necrosis factor was slightly increased in response to LPS and PG. Both LPS and PG enhanced expression of pro-matrix metalloproteinase (MMP)-9 in a dose-dependent manner, and DNA fragmentation was induced by LPS but not by PG. These results suggest that mast cells are targets of LPS and PG and that the functions of these molecules produced exclusively by bacteria are partly overlapped but distinct.

目 的

本研究では、マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMCMCs) においてどのような TLR のシグナル伝達に関連する遺伝子の発現が発現し、細菌抗原によるマスト細胞の活性化を誘導しているかを検討した。また、それに伴い炎症部位において必要とされている pro-matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) のリポポリサッカライド (LPS) およびペルチドグリカン (PG) による発現調整およびアポトーシスの誘導についても検討し、マスト細胞における TLR を介した

活性化の機序の一端を知ることを目的とした。

方 法

マウス骨髄由来培養マスト細胞：常法に従い分離した [1]。

RT-PCR：常法に従い実施した [2]。

β -Hexosaminidase 測定法：常法に従い実施した [3]。

TNF 測定：Flick and Gifford [21] らの方法に準じて行った [4]。

ゼラチンザイモグラフィー法：常法に従い実施し

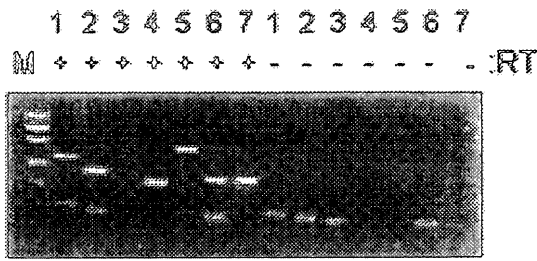


Fig 1 Expression of TLR2(1), TLR4(2), TLR5 (3), TLR6 (4), CD14(5), MD-2(6) and MyD88(7) mRNAs in BMCMCs. Total RNA was isolated from BMCMCs, and reverse transcripts were analyzed by PCR. RT(-) and(+) : reverse transcription in the absence and presence of reverse transcriptase, respectively. M: marker.

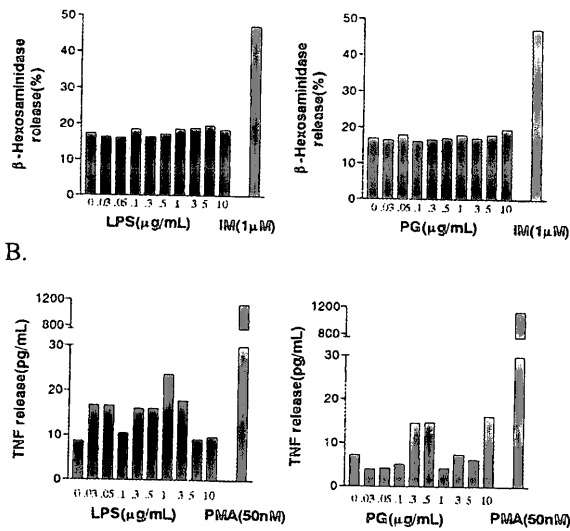


Fig 2 Degranulation and TNF release in BMCMCs in response to LPS or PG. BMCMCs is degranulation and TNF release experiments were incubated with LPS or PG for 40 min and 4 h, respectively. As a positive control, ionomycin or PMA was also added. (A) Degranulation was assessed by beta-hexosaminidase release and (B) TNF release was measured by cytotoxic assay using TNF-sensitive L929 cells. Representative results from three independent experiments are shown. The data are expressed as the mean SE.

た [5].

DNA フラグメンテーション測定法：常法に従い実施した [6].

結果と考察

RT-PCR において BMCMCs では TLR2, TLR4, TLR6 の発現は見られたが, TLR は発現していな

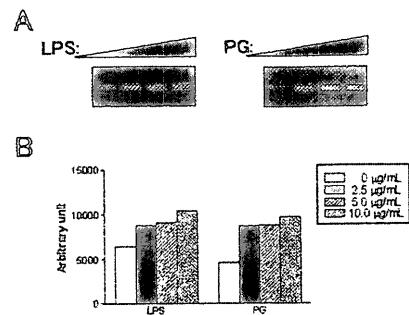


Fig 3 Gelatinolytic activity of BMCMCs in response to LPS or PG. BMCMCs were incubated with LPS or PG (A) After 72 hours, the culture supernatant was subjected to gelatin zymography. (B) Semi-quantitation of the band intensity

った (図1)。LPS と複合体を形成し TLR のシグナリングを誘導することが知られている CD14 も発現していた (図1)。さらに TLR シグナリングに欠かすことのできないアクセサリタンパク質である MD-2 および MyD88 の mRNA の発現も認められた (図1)。これらの結果は, マスト細胞が細菌抗原による TLR を介した活性化が誘導されることを示している。

次にマスト細胞における LPS および PG の作用を調べるため, 脱顆粒の誘導と TNF の産生を調べた。LPS および PG 共に脱顆粒の誘導は認められなかった (図2)。一方 TNF の産生は LPS および PG とともに濃度依存性に増加した (図2)。

マスト細胞の浸潤の重要であると考えられる MMP-9 の産出は LPS および PG 刺激によって共に誘導された (図3)。このことは, MMP のレギュレーションが TLR によって誘導されるかもしれないことを示唆している。

細菌抗原は炎症において細胞のアポトーシスを誘導することが知られているが, マスト細胞での TLR を介した誘導を検討したところ LPS によるアポトーシスの誘導は認められたが, PG では見られなかった (図4)。この結果から LPS と PG では TLR シグナリングの一部に異なった経路が存在することが示唆された。

以上の結果から, マウス骨髄由来マスト細胞は細菌抗原である LPS および PG による TLR および関連分子を介しての活性化が誘導されることがわかった。

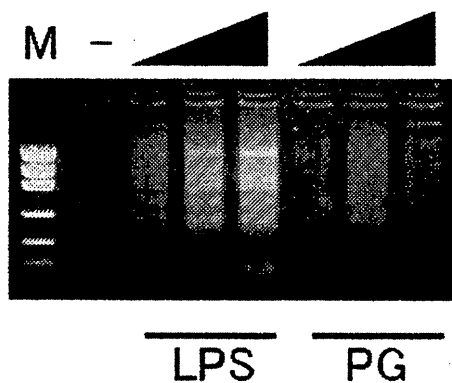


Fig 4 DNA fragmentation of BMCMCs in response to LPS or PG BMCMCs were incubated with LPS or PG. After 72 hours, DNA from the cells was recovered and electrophoresed. M: marker.

なお、本研究は Ikeda, T., Funabe, M. (2003). Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immun. Lett.*, 21-26. に掲載されている。

要約

Toll-like receptors (TLRs) は自然免疫応答において、リポポリサッカライド (LPS) やペプチドグリカン (PG) などの細菌構成物質によるシグナル伝達を司る分子として知られている。本研究では TLR シグナル伝達に関連する遺伝子のマウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMCMCs) での発現および細菌抗原と

して主要な分子である LPS および PG のマスト細胞機能に対する効果を検討した。BMCMCs は TLR2, TLR4, TLR6 の mRNA を発現していた。さらに TLR シグナリング関連分子である CD-14, MD-2, MyD88 も発現していた。LPS および PG はマスト細胞の脱顆粒を誘導しなかったが TNF 放出は僅かに上昇した。また、両物質は MMP-9 の発現を濃度依存性に促進した。アポトーシスの誘導は LPS のみに認められた。これらの結果はマスト細胞は細菌抗原である LPS および PG による標的細胞のひとつであり、部分的に異なるもののマスト細胞における機能および分子を誘導することが示された。

References

- 1) H. Matsuda, Y. Kannan, H. Ushio, Y. Kiso, T. Kanemoto, H. Suzuki, Y. Kitamura, *J. Exp. Med.* 174 (1991) 7-14.
- 2) K. Ogawa, M. Funaba, L. S. Mathews, T. Mizutani, *J. Immunol.* 165 (2000) 2997-3003.
- 3) DA. Flick, G. E. Gifford, *J. Immunol. Methods* 68 (1984) 167-175.
- 4) T. Matsuguchi, T. Musikacharoen, T. Ogawa, Y. Yoshikai, *J. Immunol.* 165 (2000) 5767-5772.
- 5) T. Matsuguchi, T. Takagi, T. Musikacharoen, Y. Yoshikai, *Blood* 95 (2000) 1378-1385.
- 6) R. R. Ingalls, B. G. Monks, R. Savendra Jr, W. J. Christ, R. L. Delude, A. E. Mdevedev, T. Espevik, D. T. Golenbock, *J. Immunol.* 161 (1998) 5413-5420.