

免疫応答におけるマスト細胞活性化機構に関する研究： Toll-like receptor によるマスト細胞の活性化について

*Activating mechanism of mast cell in immuno-responses:
mast cell activation due to Toll-like receptor*

池田輝雄¹, 村上 賢², 森田英利³

¹獣医免疫学研究室, ²分子生物学研究室, ³食品科学研究室

Teruo Ikeda¹, Masaru Murakami², Hidetoshi Morita³

¹ Laboratory of Veterinary Immunology,

² Molecularbiology,

³ Food Science, School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. It is well known that mast cell play critical role in bacterial infection especially due to gram negative bacteria. Mast cell was activated by binding LPS to Toll-like receptor, however the mast cell functional changes have not been still unexplained. In present study, we investigated the cytokine profiles and its roles in mast cell stimulated with LPS through TLR signaling.

We observed that in addition to the proinflammatory and Th2 cytokines, TNF- α , IL-1 β , MIP-1, MCP-1, IL-4, IL-6 and L-13, LPS induced the mRNA expression of IL-9 which is recognized mast cell proliferation capacity. The IL-9 mRNA expression indicated LPS-dose dependent matter and IL-9R mRNA shown constitutively high level. Next we investigated the effect of IL-9 for the proliferation of mast cell by MTT and cell count assay.

In both of assay, IL-9 was not shown mast cell proliferation. In contrast, IL-9 with IL-3 or SCF and both induced synergistically increasing mast cell.

Taken together, these observations provide strong evidence indicating IL-9 response of mast cell to LPS involves mast cell proliferation in infectious site. These mechanisms may play critical role in mast cell of both innate and adaptive immunity.

1. 目 的

近年感染免疫におけるマスト細胞の機能が注目され、特に innate immunity における役割についての詳細な研究が期待されている (1, 6, 8, 9, 10, 11)。

本研究では、従来から行ってきた我々のマスト細胞活性化機構の解析を元に、培養マスト細胞での TLR を介したシグナル伝達機構とその関連分子、及びそれに関連した機能発現を総合的に解析することを目的としている。TLR のリガンドを用いて、

TLR2, 4, 6 への刺激により誘導される各種分子の解析と遺伝子発現を検討する。また同時にそれに関連した機能発現の測定も行う。

現在まだ不明であるマスト細胞における TLR 依存性の免疫機構を分子レベル及びタンパクレベルで明らかにすることは、微生物並びに免疫分野に多大な貢献をもたらすとともに、臨床的に困難であった innate immunity の改善やその他の免疫系への応用が期待される。

2. 方 法

材料と方法

マスト細胞の培養

マスト細胞は既報に従い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 (2, 3, 4, 5)。

LPS によるマスト細胞前処理

マスト細胞は *Escherichia coli* B4:O111 (Sigma) で刺激された。

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 SBYR 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は Primer Express 3.0 (ABI) を使用した。そのほかは TaqMan アッセイキットを使用した。

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。

3. 結果と考察

1). 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 $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-4 , IL-6 , MCP-1, MIP-1 などが早期より誘導されるほか, IL-9 , IL-13 や TLR の mRNA 上昇も認められた (Fig. 1A)。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 (Fig. 1B)。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 (1, 8, 9)。(Fig. . 1)。

2. LPS 刺激による誘導されるマスト細胞 IL-9 および IL-9R

マスト細胞での IL-9 mRNA 発現は LPS での刺激に特異的に上昇した。その発現は LPS 濃度依存的および刺激後 4 時間以内の早期に観察された。以上の結果から, 部ラム陰性桿菌感染症において局所で IL-9 が誘導されることが示唆された。一方, IL-9 レセプター発現は僅かに上昇するものの, IL-9 に見られるような優位な上昇は認められなかった。IL-9R mRNA は十分に発現しており, IL-9 発現により新たな IL-9 レセプターの誘導は起きないことが示唆され

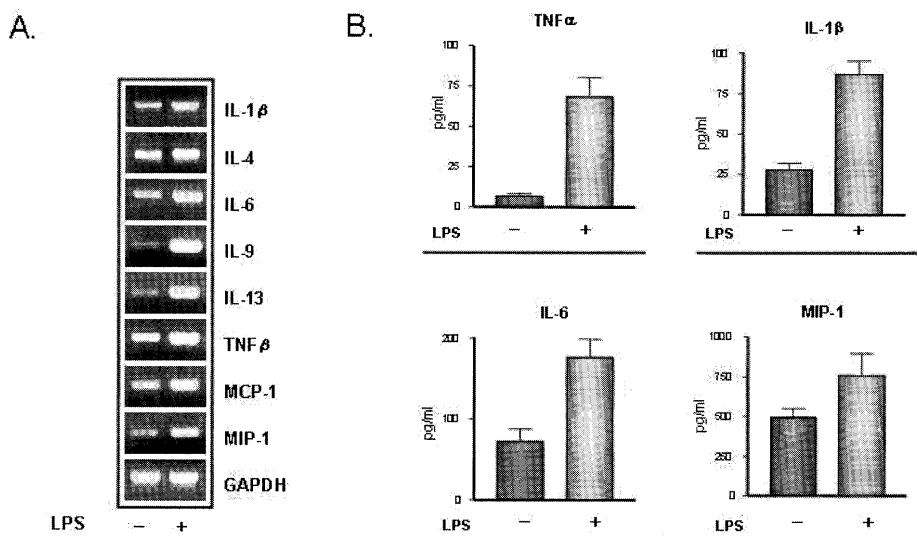


Fig. 1. Gene and protein expressions of pro-inflammatory and chemokine in mast cell treated with LPS.

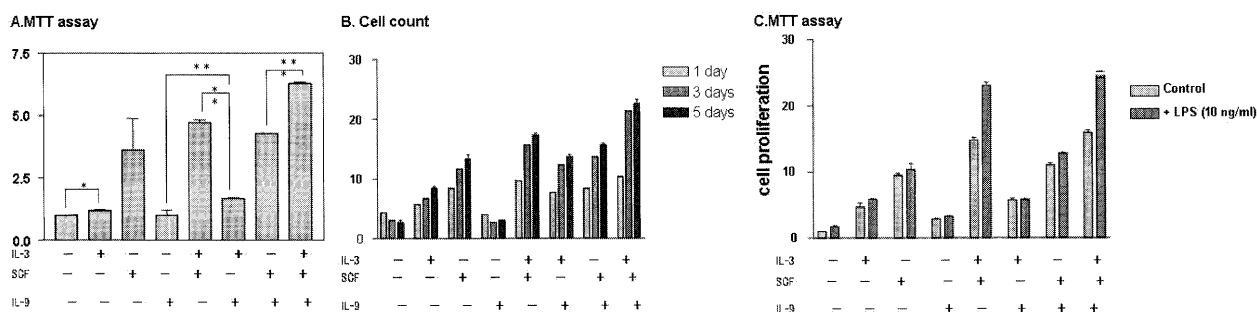


Fig. 3. Mast cell proliferation due to stimulation with cytokines. A. MTT assay, B. Cell count, C. Influence of co-stimulation with LPS.

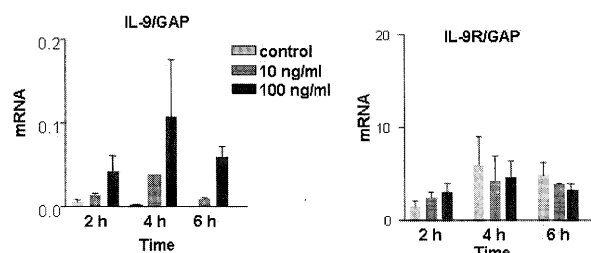


Fig. 2. IL-9 and IL-9 mRNA expressions in BMMC stimulates with LPS.

た（この結果は、蛍光抗体法による IL-9 レセプターの発現に LPS 処理細胞と対照マスト細胞で差が見られなかったことから確認されている。データ未掲載）（Fig. 2）

3. IL-9 はマスト細胞の増殖に影響するか？そして感染の局所で働くか？

サイトカイン添加によるマスト細胞増殖への影響を MTT アッセイおよび直接細胞カウントにより測定した結果を Fig. 3A, B 示した。IL-9 による細胞増殖能はほとんどないが、IL-3 および SCF との相乗効果が見られた。この結果は MTT アッセイおよび直接細胞カウントとも同様の結果であった。さらに Fig. 3C で示したように LPS 共刺激により細胞増殖はさらに促進された。これらの結果は、感染局所でのマスト細胞増殖が抗原刺激に伴って持続的に行われることを示唆している。（Fig. 3）

以上の結果より、LPS 刺激によるマスト細胞が産生する IL-9 は感染局所でのマスト細胞の増殖に関与し、自然免疫および適応免疫へのマスト細胞の機能発現に重要であることが示唆された（1, 8, 9）。

4. 要 約

マスト細胞は細菌感染、特にグラム陰性菌による

感染に対し重要な役割を果たしていることは良く知られている。マスト細胞は LPS がトール様受容体に結合することによって活性化するが、そのマスト細胞の機能的な変化はまだ十分に説明されていない。本研究では、TLR を介して LPS 刺激を受けたマスト細胞におけ種々なサイトカインとその役割を調査した。LPS 刺激によってマスト細胞では、前炎症性サイトカインおよび Th2 サイトカインである $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , MIP-1, MCP-1, IL-4, IL-6, IL-13 に加え、マスト細胞の増殖因子である IL-9 の mRNA の発現が観察された。IL-9 mRNA 発現は、LPS 濃度依存性に発現が増加し、その受容体である IL-9 レセプターは持続的に強い発現がマスト細胞で認められた。次にマスト細胞増殖に対する IL-9 の効果を MTT 法および細胞測定法で調査した。IL-9 単独ではマスト細胞の増殖は見られなかったが、IL-3, SCF およびその両者との混合培養では相乗的なマスト細胞の増殖が見られた。

これらの結果から、LPS により誘導されるマスト細胞の IL-9 は感染局所におけるマスト細胞の増殖に関連することが強く示唆された。それらの機構は、自然免疫あるいは適応免疫において重要な役割を果たしているかもしれない。

文 献

- 1) Abraham SN, Thankavel K, and Malaviya R. Mast cells as modulators of host defense in the lung. *Front Biosci* 2: d78-d87, 1997.
- 2) Funaba, M., T. Ikeda, K. Ogawa, M. Murakami, and M. Abe. 2003. Role of activin A in murine mast cells: modulation of cell growth, differentiation, and migration. *J. Leukoc. Biol.* 73: 793-801.
- 3) Funaba, M., T. Murata, H. Fujimura, E. Murata, M. Abe,

- M. Takahashi, and K. Torii. 1996. Unique recognition of activin and inhibin by polyclonal antibodies to inhibin subunits. *J. Biochem. (Tokyo)* 119: 953-960.
- 4) Funaba, M., T. Murata, H. Fujimura, E. Murata, M. Abe, and K. Torii. 1997. Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain. *J. Neuroendocrinol.* 9: 105-111.
- 5) Funaba, M., T. Ikeda, M. Murakami, K. Ogawa, K. Tsuchida, H. Sugino, and M. Abe. 2003. Transcriptional activation of mouse mast cell protease-7 by activin and transforming growth factor-beta is inhibited by microphthalmia-associated transcription factor. *J. Biol. Chem.* 278: 52032-52041.
- 6) Ikeda, T., and M. Funaba. 2003. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol. Lett.* 88: 21-26.
- 7) Murakami, M., T. Ikeda, K. Ogawa, and M. Funaba. 2003. Transcriptional activation of mouse mast cell protease-9 by microphthalmia-associated transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 4-10.
- 8) Malaviya R and Abraham SN. Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *J Mol Med* 76: 617-623, 1998.
- 9) Malaviya R, Ikeda T, Ross E, and Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381: 77-80, 1996.
- 10) Malaviya R, Ross E, Jakschik BA, and Abraham SN. Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. *J Clin Invest* 93: 1645-1653, 1994.
- 11) Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, and Abraham SN. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* 152: 1907-1914, 1994.