

## 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、およびこれまでの結果より転写因子に Co-PCB が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結果、有意な上昇が6遺伝子に見られた。そこで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。

## 材料と方法

### 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。

### PCB-126 によるマスト細胞前処理

$2 \times 10^6$  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は Primer Express 3.0（ABI）を使用した。使用したプライマーは先に示した gene accession no. から設計された Lysosome: AGAGATCCCCAAGGCATTCG, GGACAGATCTCGGTTTTGACAGT, Cd1: AAGGCAATCCA GGCAATATCAG, TTGGGTTCTGCCGAATGG, Cathpsin S: GCCACTAAAGGGCCTGTCTCT, GACACCGCTTTTGTAGAAGAAGAAG, Keratocan: TCATGCAGTTAAATATGGCGAAGA, TCATGCAGTTAAA TATGGCGAAGA, RAB27A: AAGTACGGAATCCCCTATTTTGAA, CATCTCAATCGCGTGGCTTA, Crp-ductin: CCACCAATCTCCTTTGTCAGTCA, GAATAGCCCATGGACTGAAGGT, Hyaluronan: CGTGAGGTCA TGTACACAGCTTTC, TCTGAGTCACAGACCTGCACGTA, Cathepsin L: GCAGCACGGCTTTTCCAT, CCACCTGCCTGAATTCCTCAT を使用し、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。

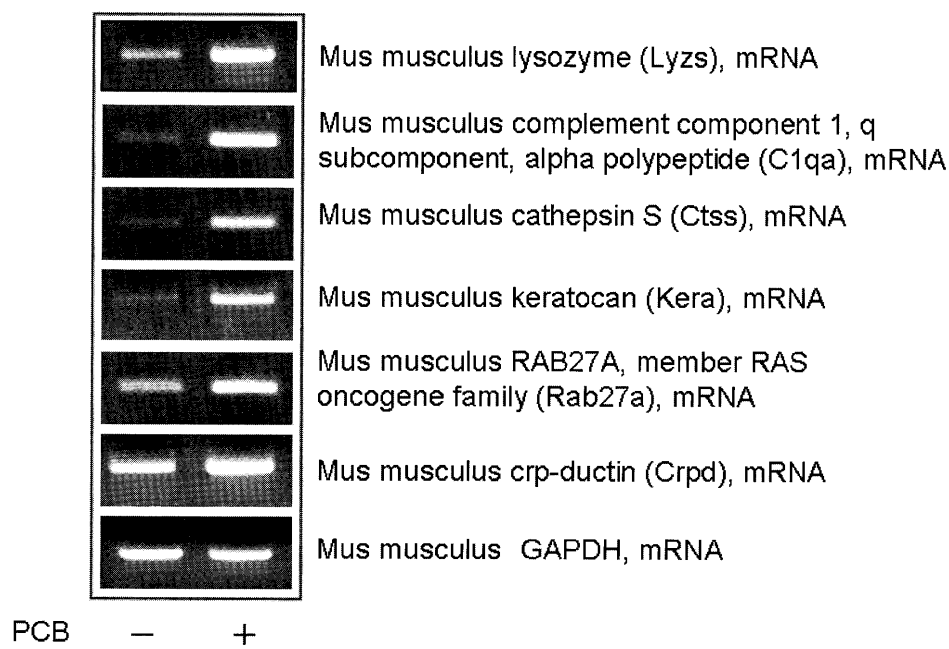


Fig. 1. RT-PCR of mRNA up-regulated by coplanar PCB126 in DNA array

## 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 による測定

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 (C1qa), *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。

### 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  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-6}$ , MCP-1, 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。

### 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 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

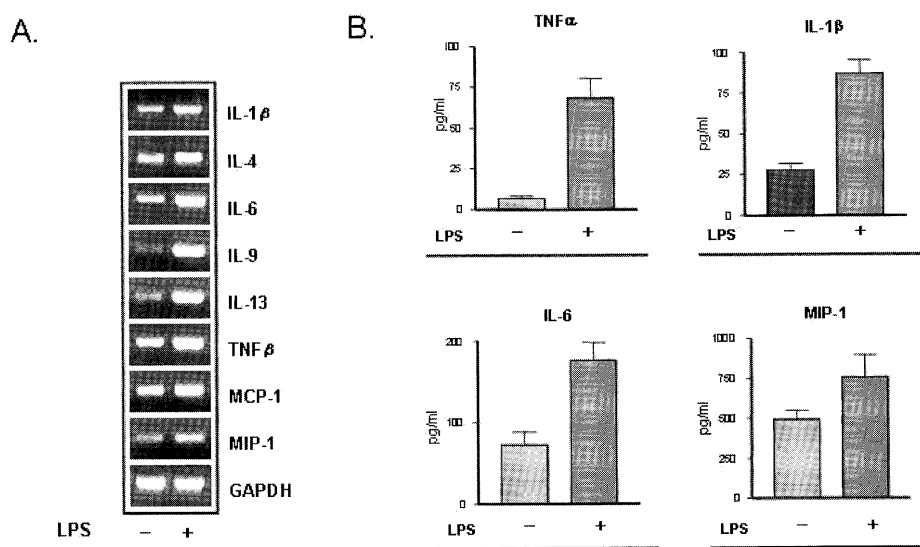


Fig. 2. Gene and protein expressions of pro-inflammatory and chemokine in mast cell treated with LPS.

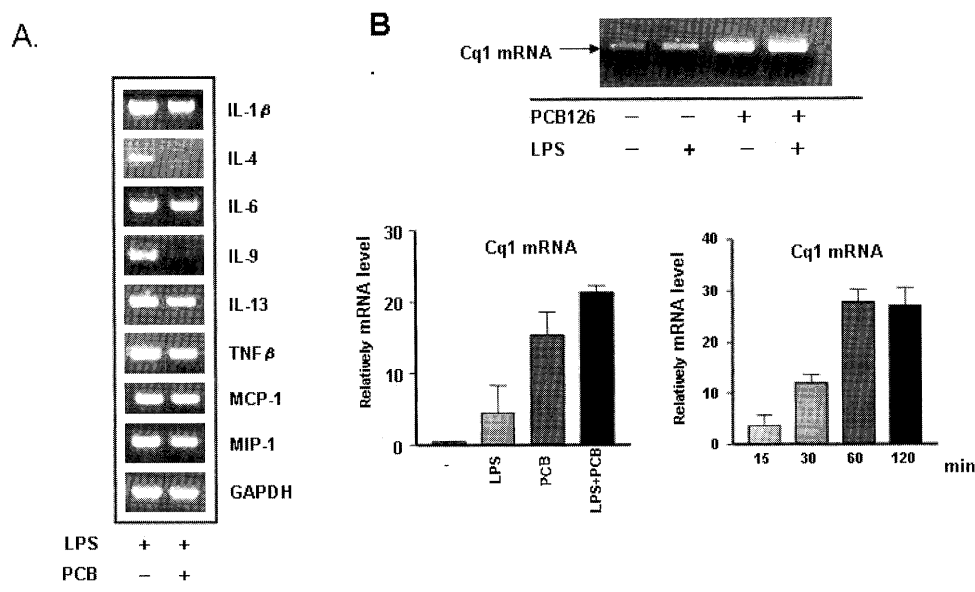


Fig. 3. PCB126 inhibit gene expression of pro-inflammatory cytokiness and chemokines and induce Cq1 mRNA in mast cell.

用の存在が示唆されている。そこで 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 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 などのほかケモカイン, Th2 サイトカインなどが抑制されることがわかった (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。

## 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NFκB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NFκBにおける競合による可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Varadaradjalou S, Feger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol*. 2003 Apr; 33(4): 899-906.
- 2) McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH, Marshall JS. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol*. 2003 Feb 15; 170(4): 1625-9.
- 3) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2001 Aug 15; 167(4): 2250-6.
- 4) Qiao H, Andrade MV, Lisboa FA, Morgan K, Beaven MA. FcεpsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood*. 2006 Jan 15; 107(2): 610-8. Epub 2005 Sep 20.
- 5) Talreja J, Kabir MH, B Filla M, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine induces Toll-like receptor 2 and 4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall components.. 2004 Oct; 113(2): 224-33.
- 6) Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol*. 2004 May;75(5):721-30. Epub 2004 Jan 14. Review.
- 7) Matsushima H, Yamada N, Matsue H, Shimada S. TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol*. 2004 Jul 1; 173(1): 531-41.

## 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 cell plays central regulators of innate and acquired immunities through production of various chemical mediators and cytokines. It has been mentioned that Co-PCB influence host immune systems, however the mechanism remains unclear. We have previously reported that LPS stimulates mast cells to produce various cytokines. In the present study, we have studied the effect of PCB126 on LPS-mediated cytokine and chemokine production from mast cell. Administration of PCB126 reduced production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. Interestingly, PCB126 specifically enhanced Cq1 mRNA expression which is regulated by NFκB signaling pathway. Pro-inflammatory cytokine and c1q induction are mediated by the same NFκB signaling pathway, therefore the reduction of LPS-mediated cytokine production from mast cell pretreated with PCB126 might be competed NFκB signaling pathway.