

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, 舟場正幸², 村上 賢³

¹獣医学部病態生化学・免疫学研究室, ²栄養学研究室, ³分子生物学研究室

Teruo Ikeda¹, Masayuki Funaba², Masaru Murakami³

¹Laboratory of Pathobiochemistry and Immunology, ²Nutrition, ³Molecular Biology, School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. It is well known that mast cell proliferation is shown in the infectious site of bacteria. However the mechanism of mast cell proliferation in infectious site is unclear at present. The up-regulated genes in mast cell induced with LPS were proinflammatory and Th2 cytokines. Among these genes, expression of IL-9, is known as inducible cytokine to proliferate mast cell, was up-regulated dependent on time and LPS concentration. It is shown that mast cell proliferation following LPS stimulation is due to the mast cell growth-promoting cytokine IL-9 from MTT assay with anti-IL-9. Our results suggest that mast cell proliferation in infectious site is regulated with both IL-3 and IL-9 alone or in combination.

1. 目的

我々の研究, すなわちマスト細胞が細菌感染初期の innate immunity に重要な役割を果たすことが一般的に認められ, さらに初期免疫応答だけでなく獲得免疫応答への関連も示唆されることからさらなる詳細な研究が期待されている。本研究では, 従来から行ってきた我々の細菌感染におけるマスト細胞活性化機構の解析を元に, 特に TLR に着目し, 初代分離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, およ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 の中心的なリガンドであるリポポリサッカライドの TLR2,4,6 へのリガンド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した。

2. 方法

マウス

静岡実験動物(株)から BALB/c マウス, 雌 6-8 週令を購入し使用した。

試薬

牛胎児血清は Hyclone (Logan, UT) を使用した。細胞培養に使用した培地およびリポポリサッカライドは Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。

マウス骨髄由来マスト細胞

マウスマスト初代培養細胞である Born-marrow-derived cultured mast cell (BMCMC) は P-cell medium (alpha-MED に 10% FCS, 10% PWM-SCM (脾臓細胞を porkweed mitogen (0.1 mg/ml), 10% FCS 含有

alpha-MEMで4-5日間培養した上清)))で3週間培養後、トルイジンブルー染色およびCD117の発現によりマスト細胞であることを確認後使用した。BMCMCは培養4-6日目に継代され、使用した。

RT-PCRによる遺伝子の測定

マスト細胞からのTotal RNAの分離にはRNeasy mini kit (Qiagen, Japan) が用いられた。Total RNAはDNase処理後、SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いてcDNAを作製した。PCRはthe Expand High-Fidelity PCR System (Roche, Indianapolis, IN) を使用した。PCRは、94℃ 30秒、58℃ 30秒、72℃ 45秒の35サイクルで行われた。用いたマウス各標的遺伝子に対するプライマーはプライマー設計ソフト (Primer Express 3, AB1) により設計され、Operonにより合成されたものを使用した。PCR産物は2%アガロースで電気泳動され、エチジウムブロマイドで可視化され測定された。

細胞増殖測定法

マスト細胞の増殖反応の検出にはMTT法 (3-[2,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) を用いた。すなわち、 0.1×10^5 個/mlのBMCMCとmouse IL-9を96穴マイクロプレートに入れ、37℃ 48時間培養する。そこにMTT10 μ lを加え37℃ 4時間培養して活性化細胞の代謝によるformazan結晶を形成させる。そのformazan結晶は0.01N塩酸を含む10%SDS溶液で37℃一昼夜溶解させ、各々のウエルの吸光度を540 nmで測定した。

3. 結果と考察

LPSによって誘導されるサイトカイン

RT-PCRの解析の結果、有意に誘導される遺伝子にはTNF-alpha, IL-3, IL-6, IL-9, IL-1beta., IL-4, IL-13, MCP-1, MIP-1であった。それぞれに遺伝子は、LPS刺激後自然免疫期間にあたる極初期に誘導されるもの、獲得免疫初期に誘導されるものおよび刺激期間を通して誘導されるものなどの特徴が認められた。特にIL-9の誘導は自然免疫期間後期から獲得免疫にかけて強く誘導されることが示された (図1)。細菌感染における局所でのマスト細胞増殖には自然

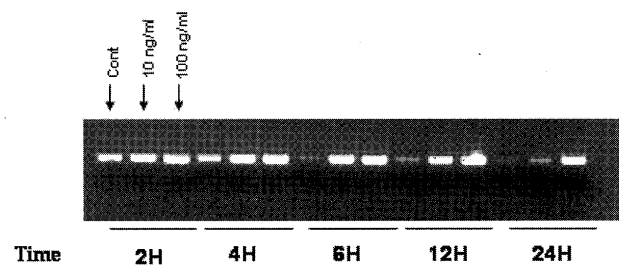


Fig. 1. Induction of IL-9 mRNA in mast cell after exposure to lipopolysaccharide (LPS). Mast cells were incubated with LPS for the times indicated. Total RNA was extracted from the cells using an RNaseasy RNA isolation kit. Specific transcripts for IL-9 and GAPDH were determined by reverse transcription and the amplification of the cDNA. Resulting cDNA was run on a 2% agarose gel and the DNA fragment co-migrating with the molecular weight marker was identified.

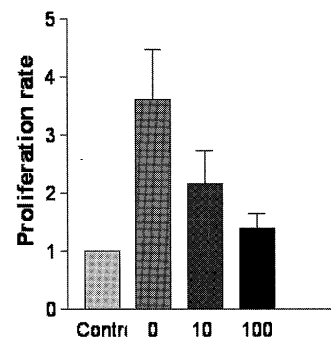


Fig. 2. Inhibition of LPS induced mast cell proliferation by anti-IL-9 antibody. BMCMC were cultured in 96-well tissue culture plates at a cell density of 0.1×10^5 cells/ml with LPS (100 ng/ml) in 100ml media (without IL-9) for 48 h at 37 C. Anti-IL-3 antibody was added to the wells at the dose indicated. The cell proliferation induced by LPS was determined using MTT assay. An increase or decrease in the absorbance of cells with respect to PBS treated control is indicative of change in the cell number. The data has been presented as mean S.E.M. from three independent experiments performed.

免疫初期でのIL-3によるオートクラインが重要であることはすでに報告されているが、この結果は自然免疫後期および獲得免疫でIL-3よりもむしろIL-9のオートクラインによる局所マスト細胞の増殖維持が感染防御に重要であることを示唆している。

LPSによるマスト細胞増殖

LPSによって誘導されるマスト細胞のIL-9がマスト細胞増殖に関与しているかを確認するために、抗IL-3抗体存在下でマスト細胞とLPSを培養したときにマスト細胞の増殖を検討した。マスト細胞の増殖測定はMTT測定法を用いた。図2に見られるように、

抗IL-9抗体は濃度依存的にマスト細胞の増殖を阻害した。それらの結果は、明らかにマスト細胞の増殖は、LPSにより誘導されたIL-9により誘導されることを示しており、したがってマスト細胞の増殖はこのIL-9によって誘導されたことが示唆された。

4. 要約

マスト細胞がアレルギーや感染局所などの免疫応答部位で増殖していることはよく知られているが、その増殖機構については現在までよく知られていない。そこでLPS刺激に対して変動する遺伝子群の中から増殖に関連する遺伝子について検討した。すでに我々が報告したIL-3以外に増殖に関連する遺伝子としてIL-9が見られ、その発現は免疫応答の経過およびLPS濃度依存的に増加し、MTTアッセイの結果から、増殖に関係するものであった。これらの結果

から、グラム陰性桿菌感染におけるマスト細胞免疫応答における局所でのマスト細胞の増殖には、自然免疫初期ではIL-3が、自然免疫および獲得免疫でIL-9が関与することが示唆された。

文 献

- 1) Thankavel K., Madison B., Ikeda T., Malaviya R., Shah AH., Arumugam PM., Abraham SN. J. Clin. Invest 100, 1123-1136, 1997.
- 2) Malaviya R., Ikeda T., Ross EA., Jackschik BA., Abraham SN. Am. J. Ther. 2, 787-792, 1995.
- 3) Malaviya R., Ikeda T., Ross EA., Abraham SN. Nature 381, 77-80, 1996.
- 4) Malaviya R., Ross EA., MacGregor JI., Ikeda T., Little JR., Jackschik BA., Abraham SN. J. Immunol. 152, 1907-1914, 1994.
- 5) Malaviya, R., Ikeda, T., Abraham, SN., Malaviya, R. Immun. Lett. 91, 103-111.2004.