

皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割

— マスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発 —

大阪大学医学部

北村 幸彦

Mast cell-deficient rats and mice were characterized in molecular and cellular levels. The *Ws* locus of rats and the *W* locus of mice encode the *c-kit* receptor tyrosine kinase. The *Ws* locus is a 12 base deletion at the tyrosine kinase domain of *c-kit*. The W^{jic} , W^n and W^f are three different point mutations of the tyrosine kinase domain of the *W* (*c-kit*) locus. The molecular characteristics of the W^{jic} , W^n and W^f mutant alleles were consistent with the numbers of skin mast cells in heterozygous and homozygous mutant animals. The coding region of the W^{sh} mutant allele was normal, but the *c-kit* gene was not transcribed in cultured mast cells derived from the spleen of W^{sh}/W^{sh} mice.

1. 緒言

マスト細胞は皮膚など外界と接する器官の結合組織に多く存在する細胞で、表面には高親和性のIgEレセプターが存在し、細胞質内には好塩基性色素により染色される顆粒を持っている。この好塩基性顆粒にはヒスタミンや蛋白質酵素とともに、プロテオグリカンが含まれており、好塩基性色素と結合するのはこのプロテオグリカンである。表面に高親和性IgEレセプターを発現すること、ヒスタミンを含む好塩基顆粒を細胞質内に含むことは、マスト細胞と好塩基球が共通に持つ特徴であり、この2種類の細胞のみが即時型アレルギー反応のエフェクター細胞として働く。

即時型アレルギー反応は、マスト細胞あるいは好塩基球の表面に発現しているIgEレセプター

に結合しているIgE分子が多価の抗原により架橋されることによりはじまる。IgEレセプター分子同士が架橋されたマスト細胞と好塩基球は好塩基顆粒を放出し、好塩基顆粒に含まれる活性物質により炎症反応が引き起こされるのである。

化粧品に対する過敏反応の中には、1) マスト細胞あるいは好塩基球が存在しなければ起こらない即時型アレルギー反応、2) マスト細胞の存在は必須でないが、マスト細胞が存在すれば、その反応が増強される反応、3) マスト細胞が関与しない反応、の3種類が含まれていると考えられる。本研究の本来の目的は、マスト細胞を遺伝的に欠損するマウスとラットを用いて、この3種類の反応を区別する検定法を開発することであるが、マスト細胞欠損動物について、最近その原因遺伝子が明らかにされたことによって、マスト細胞欠損の原因を分子レベルで解析できるようになった。そこで本研究では、使用するマスト細胞欠損動物の分子レベル、細胞レベルの解析が中心となった。

Roles of Mast Cells on Skin Hypersensitivity:
Development of Evaluating System by Using Mast Cell-Deficient Animals



Yukihiro Kitamura

Medical School
Osaka University

2. 材料と方法

材料と方法については、本研究助成金によって出版することができた原著論文に詳しく書いてあ

るので省略する。なお上記論文は本報告書に添付する。

3. 主な結果

3.1 マスト細胞欠損ラット

我々は八木記念パークの丹羽と近藤によって発見された *Ws/Ws* ラットがマスト細胞を欠損していることを見つけ、さらに *Ws* 遺伝子座がマウスにおいて、マスト細胞の分化に重要な役割をはたす *W* 遺伝子座と同様に *c-kit* レセプター・タイロシカイネースをコードしていることを示した。

マスト細胞の存在は、通常組織片を好塩基性色素で染色して調べている。好塩基性色素で染色されるのはプロテオグリカンである。マスト細胞の分化過程において、プロテオグリカンを含む好塩基顆粒の出現により、高親和性 *IgE* レセプター (*FcεRI*) の発現の方が早く起こると考えられているので、*FcεRI* のメッセンジャー RNA (mRNA) の発現を *Ws/Ws* ラットと正常対照 (+/+) ラットの皮膚組織から抽出した RNA を逆転写酵素で cDNA にかえ、PCR で増幅した後、Southern blot を行って調べた。また *Ws/Ws* ラットと +/+ ラットの皮膚切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、*FcεRI* を発現している細胞を同定した (発表論文3)。

+/+ ラットの皮膚では、*FcεRI* の mRNA の存在を cDNA の Southern blot で検出でき、発現している細胞をマスト細胞と同定できたが、*Ws/Ws* ラットの皮膚では *FcεRI* の mRNA を発現している細胞は存在しなかった。*Ws/Ws* ラットの皮膚は好塩基性色素で染色される分化したマスト細胞だけでなく、*FcεRI* の mRNA を発現した段階のマスト細胞の前駆細胞も欠損していることがわかった (発表論文3)。

3.2 マスト細胞と好塩基球の分化統御機構の相違

マスト細胞と好塩基球は前述したように、即時

型アレルギー反応のエフェクター細胞であり、ともに多分化能血液幹細胞の子孫であるが、電子顕微鏡で見ると、容易に区別し得る細胞である。マウスは好塩基球の数が極端に少なく、また血液量も少ないために、好塩基球の研究には不向きであった。我々は *c-kit* 遺伝子座の小欠失のためにマスト細胞を欠損している *Ws/Ws* ラットを用いて、マスト細胞と好塩基球の分化制御機構の相違について研究した。

Ws/Ws ラットに消化管寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (NB) を感染させると、好塩基球数は50倍以上に上昇する。この上昇の程度は +/+ ラットとの有意差がないが、negative control として用いたヌードラットでは、好塩基球の増加反応はまったく起こらない。NB を感染させた *Ws/Ws* ラットでは皮膚のマスト細胞はまったく増加しない。消化管では NB 感染前には存在しなかったマスト細胞が出現するが、+/+ ラットの10%程度にとどまる。ヌードラットでは NB 感染による消化管マスト細胞の増加がみられないが、ヌードラットの皮膚には +/+ ラットの皮膚よりもむしろ多数のマスト細胞が存在する (発表論文5)。

皮膚のマスト細胞は結合組織型、消化管のマスト細胞は粘膜型に分類されているが、結合組織型マスト細胞、粘膜型マスト細胞、好塩基球の分化制御を主に行っている細胞は上記の実験結果から、結合組織型マスト細胞の分化制御は線維芽細胞、粘膜型マスト細胞の分化制御は線維芽細胞と T リンパ球の両方、好塩基球の分化制御は T リンパ球と考えられた (発表論文5と7)。

線維芽細胞の生産するマスト細胞と好塩基球の主な分化制御因子は stem cell factor (SCF)、T リンパ球の生産する主な分化制御因子はインターロイキン3 (IL-3) であることはわかっているため、結合組織型マスト細胞、粘膜型マスト細胞、好塩基球の主な分化制御因子は表1のようにまとめられた。

表1 マスト細胞と好塩基球の主な分化制御因子

細胞	主な分化制御因子
結合組織型マスト細胞	SCF
粘膜型マスト細胞	SCFとIL-3
好塩基球	IL-3

3.3 マウス *c-kit* 遺伝子異常とマスト細胞数

マウスでは *c-kit* 遺伝子座の突然変異が数多く知られており、その中には日本で発見されたものもある。我々は日本で発見された W^{Jic} と W^n と、ユニークな症状を示す W^f と W^{sh} について、突然変異遺伝子の分子レベルの異常と皮膚マスト細胞数の間の関係を調べた。

図1で示すように W^{Jic} 、 W^n 、 W^f はいずれも *c-kit* レセプター・タイロシンカイネースのタイロシンカイネース部位の点突然変異であるが、各々の突然変異遺伝子のホモ、あるいはヘテロ動物の皮膚マスト細胞数を説明しうような分子的異常を示した(発表論文6)。

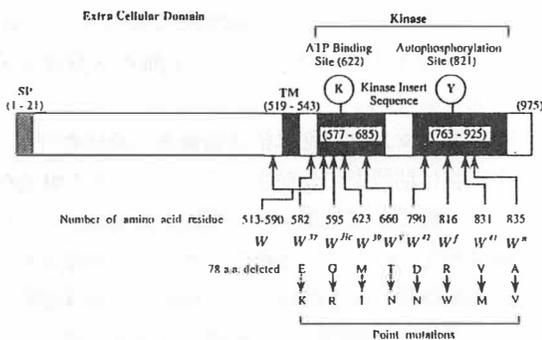


図1 種々の突然変異マウスにおける *c-kit* 蛋白質。アミノ酸は initiation codon からの番号で示してある。mis-sense 突然変異はアミノ酸を1字の記号で示す。略号: SP, シグナルペプチド; TM, 細胞膜貫通部位; aa, アミノ酸

ところが W^{sh} については、コーディング領域に異常を認めないにもかかわらず、 W^{sh}/W^{sh} 由来の培養マスト細胞は、*c-kit* の mRNA をまったく発現していない。小脳、睾丸、脾臓では *c-kit* の mRNA を認めたので、 W^{sh} 突然変異遺伝子は、*c-kit* の調節領域に異常が起こり、その

結果として、細胞種特異的に *c-kit* の転写が障害していると考えられた(発表論文1)。

4. 考察

SCFが *c-kit* レセプター・タイロシンカイネースに結合することによって始まるシグナルが、マスト細胞の分化・増殖・生存にきわめて重要な役割を演じていることが、*c-kit* 遺伝子に異常を持つマウスとラットを解析することにより明らかになった。

すでに述べたように、マウスとラットでは繊維芽細胞が生産する SCF に加えて、Tリンパ球が生産する IL-3 も、粘膜型マスト細胞の分化制御に関係しているが、ヒトでは IL-3 のレセプターを持ったマスト細胞は知られておらず、SCF が現在までにわかっている唯一のマスト細胞の分化制御因子である。一方 IL-3 はマウス・ラットばかりでなくヒトにおいても好塩基球の主要な分化制御因子である。

本研究の当初の目的はマスト細胞欠損動物を用いて、皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割を調べることであったが、研究の進展上、主としてマスト細胞欠損動物の性格付けを分子レベルで行うことになった。現在では分子レベルでの性格付けなしには、正しい研究材料とみなされにくくなっているからである。今後は改めてマスト細胞欠損動物による皮膚過敏症の研究を行いたいと考えている。

特に W_s/W_s ラットについては、我国で発見されたものであり、 W_s/W_s ラットの性格付けについての我々の論文が出版されるにつれて、外国からも分与の希望が多く寄せられている。遺伝的背景と微生物コントロールの両面で W_s/W_s ラットは実験動物として完成されつつあり、今後の利用が期待できる。

発表論文

- 1) Tono T, Tsujimura T, Koshimizu J, Kasugai

- T, Adachi S, Isozaki K, Nishikawa SI, Morimoto M, Nishimune Y, Nomura S and Kitamura Y : *c-kit* gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient $W^{s/h}/W^{s/h}$ mice that have normal number of erythrocytes and normal *c-kit* coding region. Blood 80 : 1448-1453, 1992.
- 2) Jippo-Kanemoto T, Adachi S, Ebi Y, Mutsuda H, Kasugai T, Nishikawa SI and Kitamura Y : BALB/3T3 fibroblast conditioned medium attracts cultured mast cells derived from *W/W* but not from *mi/mi* mutant mice, both of which are deficient in mast cells. Blood 80 : 1933-1936, 1992.
 - 3) Onoue H, Maeyama K, Nomura S, Kasugai T, Tei H, Kim HM, Watanabe T and Kitamura Y : Absence of immature mast cells in the skin of *Ws/Ws* rats with a small deletion at tyrosine kinase domain of the *c-kit* gene. Am J Pathol 142 : 1001-1007, 1993.
 - 4) Jippo-Kanemoto T, Kasugai T, Yamatodani A, Ushio H, Mochizuki T, Tohya K, Kimura M, Nishimura M and Kitamura Y : Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige (Chediak-Higashi syndrome) rat mast cells with giant granules. Arch Int Allergy Immunol 100 : 99-106, 1993.
 - 5) Kasugai T, Okada M, Morimoto M, Arizono N, Maeyama K, Yamada M, Tei H, Dohmae K, Onoue H, Newlands GFJ, Watanabe T, Nishimune Y, Miller HRP and Kitamura Y : Infection of *Nippostrongylus brasiliensis* induced normal increase of basophils in mast cell-deficient *Ws/Ws* rats with a small deletion at the kinase domain of *c-kit*. Blood 81 : 2521-2529, 1993.
 - 6) Tsujimura T, Koshimizu U, Katoh H, Isozaki K, Kanakura Y, Tono T, Adachi S, Kasugai T, Tei H, Nishimune Y, Nomura S and Kitamura Y : Mast cell number in the skin of heterozygotes reflects molecular nature of *c-kit* mutation. Blood 81 : 2530-2538, 1993.
 - 7) Arizono N, Kasugai T, Yamada M, Okada M, Morimoto M, Tei H, Newlands GFJ, Miller HRP and Kitamura Y : Infection of *Nippostrongylus brasiliensis* induces development of mucosal-type but not connective tissue-type mast cells in genetically mast cell-deficient *Ws/Ws* rats. Blood 81 : 2572-2578, 1993.
 - 8) Kitamura Y, Kasugai T, Morimoto M, Tei H, Tsujimura T, Niwa Y, Yamada M and Arizono N : Development of mast cells and basophils. Usefulness of mutant mice and rats. Progress in Allergy and Clinical Immunology (eds, Miyamoto T, Okuda M) , Hogrefe & Huber Publishers, Tronto, PP 477-484, 1992.
 - 9) Kitamura Y, Kasugai T, Nomura S and Matsuda H : Development of mast cells and basophils. In Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils (ed, Foreman JC) Academic Press, London, PP 5-27, 1993.
 - 10) Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N and Matsuda H : Development of mast cells and basophils : Processes and regulation mechanisms. Am J Med Sci, 306 : 185-191, 1993.
 - 11) Hirata T, Morii E, Morimoto M, Kasugai T, Tsujimura T, Hirota S, Kanakura Y, Nomura S and Kitamura Y : Stem cell factor induces outgrowth of *c-kit*-positive neurites and supports the survival of *c-kit*-positive neurons in dorsal root ganglia of mouse embryos. Development, 119 : 49-56, 1993.
 - 12) Kasugai T, Oguri K, Jippo-Kanemoto T, Morimoto M, Yamatodani A, Yoshida K, Ebi Y, Isozaki K, Tei H, Tsujimura T, Nomura S, Okayama M and Kitamura Y : Deficient dif

ferentiation of mast cells in the skin of *mi/mi* mice : Usefulness of in situ hybridization for evaluation of mast cell phenotype. *Am J Pathol.* 143 : 1337-1347, 1993.

- 13) Morimoto M, Kasugai T, Tei H, Jippo-Kanemoto T, Kanakura Y and Kitamura Y : Age-dependent amelioration of hypoplastic anemia in *Ws/Ws* rats with a small deletion at the kinase domain of *c-kit*. *Blood*, 82 : 3315-3320, 1993.