

接触皮膚炎におけるマスト細胞活性化反応の解析

昭和大学 薬学部

工藤 一郎

Mast cells contribute to allergic inflammation by releasing chemical mediators in response to activation with cytokines and/or IgE/antigen. Here we report that when mouse bone marrow-derived mast cells were activated with IgE/antigen in the presence of interleukin (IL)-10 and IL-1 β , but not other cytokine combinations, there were two phase of prostaglandin (PG) D₂ generation, in which the first phase occurred within 1 hr and the second phase from 2 to 10 hr. The delayed phase PGD₂ generation paralleled the *de novo* induction of cyclooxygenase (COX)-2 protein irrespective of the constant expression of COX-1 and was abrogated by COX-2 specific inhibitor. Detailed examination of individual effect of IL-10, IL-1 β and IgE/antigen on COX-2 expression revealed that IgE/antigen or IL-10 each initiated and stabilized COX-2 mRNA expression, whereas IL-1 β stabilized COX-2 protein without affecting its mRNA level. Whereas expression of cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) was unchanged under any culture condition, expression of type II secretory PLA₂ (sPLA₂) transcript was induced by 5 hr in cells treated with IL-10 + IL-1 β independent of IgE/antigen, accompanied by increase in sPLA₂ activity. Substantial suppression of delayed phase PGD₂ generation by anti-sPLA₂ antibody suggests the functional linkage of the two induced prostanoid-biosynthetic enzymes, sPLA₂ and COX-2, to provide PGD₂ in the delayed phase.

1 緒言

肥満細胞は骨髄中の多能性血液幹細胞を起源とする組織性の細胞であり、組織微小環境で産生される種々のサイトカインに反応して増殖し、組織固有の形質を持つ肥満細胞サブタイプに分化成熟する。肥満細胞表面上に存在する高親和性IgE受容体がIgEを介して特異抗体で架橋されると、肥満細胞は急速に活性化し、顆粒内容物であるヒスタミン、セロトニン等を放出すると同時に、膜リン脂質から遊離されたアラキドン酸からPGD₂やLTC₄を産生する。これら肥満細胞由来の化学伝達物質は即時型アレルギー応答、アナフィラキシーショックの主要因となるものの、気管支喘息やアトピー性皮膚炎等のアレルギーの臨床的知見に頻繁に見られる慢性化した病変を説明し得るものではない。慢性のアレルギー炎症像の要因とし

て、最近、IgE/抗原刺激により活性化した肥満細胞による多種多様なサイトカインの発現誘導と放出が注目を集めている。

マウス骨髄細胞をインターロイキン3 (IL-3) 存在下数週間培養すると、均一な肥満細胞集団 (BMBC) が得られることが知られている。BMBCはその培養が容易で大量調製が可能なこと、機能的IgE受容体を発現していること、及び多種多様なサイトカインに反応すること等の理由から、肥満細胞研究のモデル系としてよく用いられている。我々は慢性アレルギーの原因を解明すべく、肥満細胞の活性化に伴う長期応答について着目し、BMBCを用いて、特に脂質代謝の視点から解析を行った。その結果、ある特定のサイトカイン存在下にBMBCをIgE/抗原刺激すると、即時応答で見られる迅速なPGD₂の産生に続いて、刺激後数時間の間に第二相のPGD₂産生が起こることを見出した。



Studies on activation of mast cells in contact dermatitis

Kudo Ichiro

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Showa university

2 実験

2.1 BMBCの調製

雄のBALB/cJマウスから採取した骨髄細胞を、50%RPMI 1640 (10%FCS) + 50% WEHI-3細胞

胞培養上清液中で3から6週間培養した。3週間後には98%以上がBMMCとなった。

2.2 BMMCのサイトカインおよび抗原抗体による処理

1度メディウムで洗ったBMMCを 1×10^7 cells/mlの濃度になるようメディウムに懸濁し、10mg/ml抗TNP (Trinitrophenyl) IgE抗体で30分間、37度で感作させる。メディウムで2回洗った後、様々なサイトカイン(IL-1 β 、IL-3、IL-10)が単独あるいは組み合わさって入っているメディウムに懸濁させ、抗原で刺激した。

2.3 PGD₂量の測定

アマシャム社のPGD₂アッセイキットを用いて測定した。

2.4 ノーザンブロッティング

RNAはTRIzol試薬(GIBCO BRL)を用い、guanidinium thiocyanate法により細胞より抽出した。RNAはアガロースゲルにより分離後、ナイロンメンブレンにトランスファーした。COX-1、COX-2、cPLA₂、sPLA₂あるいは β -Actinプローブをランダムプライマー法により³²Pラベルし、ブロッティングを行った。

2.5 イムノブロッティング

刺激後の細胞ライセートをSDS-Polyacrylamide gel電気泳動にて分離し、ニトロセルロース膜にトランスファーした。COX-1、COX-2、cPLA₂またはsPLA₂に対する抗体でブロッティングし、ECLシステムにて蛍光発色させた。

3 結果

3.1 IgE/抗原刺激による二相性PGD₂産生

IgEで感作したBMMCを、様々なサイトカイン(IL-1、IL-3、IL-10)存在下に抗原により刺激した。刺激1時間後に上清に放出されたPGD₂を定量したところ、どのサイトカイン共存下に抗

原刺激した場合でも同程度のPGD₂産生が見られた(約1 ng/10⁶ cells)。抗原刺激を行わず、サイトカイン単独では、PGD₂産生はほとんど見られなかった。一方、刺激5時間後に上清のPGD₂を測定したところ、ほとんどの場合1時間後とはほぼ同じ値を示したのに対し、IL-1+IL-10共存下に抗原刺激したBMMCの場合のみ、PGD₂量は5.6 ng/10⁶ cellsに増加していた(表1)。

そこでIL-1+IL-10共存下にIgE/抗原刺激した時のPGD₂産生の経時変化を細かく解析したところ、刺激後1時間以内にピークに達する第一相(即時相)と刺激後2時間から上がり始め5時間から10時間後にピークに達する第二相(遅発相)から成ることがわかった(図1)。抗原刺激なしにIL-1+IL-10で培養した場合、即時相でのPGD₂産生は見られず、遅発相のPGD₂産生がわずかに観察された。

3.2 シクロオキシゲナーゼ(COX)の発現

IL-1+IL-10+IgE/抗原刺激によるBMMCの遅発型PGD₂産生がどのように調節されているかについて、まずアラキドン酸をプロスタノイドに変換する酵素であるCOXに注目して調べた。COXには、広い組織に恒常的に発現しているCOX-1と、炎症刺激や増殖因子刺激により誘導される

表1 Effect of various cytokines and IgE/Ag on PGD₂ generation by BMMC

Cytokines	PGD ₂ generation (ng/10 ⁶ cells)	
	Without IgE/antigen	With IgE/antigen
No cytokine	<0.1	1.03 \pm 0.15 †
IL-3	<0.1	1.14 \pm 0.11 †
IL-10	<0.1	1.27 \pm 0.21 †
IL-1 β	<0.1	1.02 \pm 0.13 †
IL-1 β +IL-10	0.37 \pm 0.15*	5.60 \pm 1.18* †
IL-3+IL-10	0.14 \pm 0.08	1.40 \pm 0.48* †
IL-1 β +IL-3	<0.1	1.05 \pm 0.18 †

BMMC was cultured for 5 h with the indicated stimuli, and the PGD₂ released into the supernatants was assessed as described in the experimental section. Means \pm S.E.M. for three independent experiments are shown. * $P < 0.05$ compared with no cytokine; † $P < 0.05$ compared with each group without IgE/antigen.

COX-2が存在することが知られている。

IL-1+IL-10+IgE/抗原刺激したBMMCのライゼートを経時的に採取し、抗COX-1、抗COX-2抗体でそれぞれイムノブロットして両酵素の発現を調べたところ、COX-1蛋白の発現は刺激後48時間まで一定であったのに対し、COX-2蛋白は未刺激のBMMCには存在せず、IL-1+IL-10+IgE/抗原刺激後2時間後から発現が認められ、5時間から10時間後に最大に達し、その後減少した(図2)。抗原非存在下にIL-1+IL-10で培養した場合、弱いCOX-2蛋白の発現が認められた。他のサイトカイン存在下では、COX-2蛋白の発現は殆ど認められなかった。以上の結果から、遅発相におけるPGD₂産生は、経時変化及びサイトカイン特異性においてCOX-2蛋白の発現と相関していた。

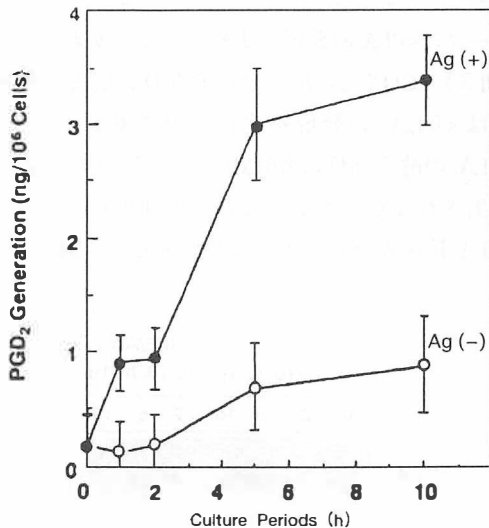


図1 Time course of PGD₂ generation in BMMC after stimulation with IL-10, IL-1 β and IgE/antigen

IgE-sensitized BMMC were cultured for the indicated periods after stimulation with 100 i.u./ml IL-10 and 5 ng/ml IL-1 β in the presence or absence of antigen (Ag). The PGD₂ released into the supernatants were assessed as described in the Experimental section. Values are expressed as means \pm S.E.M. for four independent experiments.

3.3 COX阻害剤のPGD₂産生に対する効果

即時相及び遅発相における2種のCOXアイソザイムの役割を更に明らかにするため、COX阻害剤のPGD₂産生に対する効果を検討した。アスピリンは、COXを不可逆的に阻害することが知られている。BMMCをアスピリンで5時間前処理した後、細胞を洗浄し、アスピリン非存在下にIgE/抗原で刺激すると、いずれのサイトカイン存在下においても即時相のPGD₂産生は完全に消失した(表2)。これは、即時型PGD₂産生が常在性のCOX-1により調節されていることを意味している。これに対し、遅発型PGD₂産生はアスピリン前処理の影響を全く受けなかった事から、新規に誘導されたCOXによって制御されているものと考えられた。実際、遅発型PGD₂産生はCOX-2特異的阻害薬であるNS-398により完全に抑制された(表2)。

この結果から、IL-1+IL-10+IgE/抗原刺激によって惹起される遅発相のPGD₂産生は、COX-2によって制御されているものと結論された。

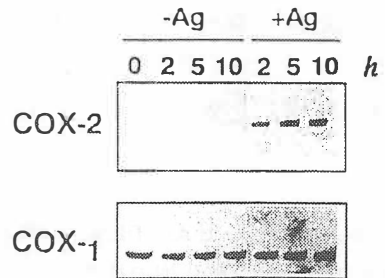


図2 Time course of COX-2 expression in BMMC after stimulation with IL-10, IL-1 β and IgE/antigen

IgE-sensitized BMMC were cultured for the indicated periods after stimulation with 100 i.u./ml IL-10 and 5 ng/ml IL-1 β in the presence or absence of antigen (Ag). The expression of proteins for COX-1 and COX-2 were assessed as described in the Experimental section. A representative result of three independent experiments.

表2 Inhibition of the delayed phase of PGD₂ generation by NS-398

Aspirin pretreatment	NS-398 treatment	Incubation time (h)	PGD ₂ generation (ng/10 ⁶ cells)	
			1	5
—	—		1.1 ± 0.2	3.5 ± 0.8*
—	+		1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.3
+	—		<0.1 †	2.7 ± 1.1*
+	+		<0.1 †	<0.1 ‡

BMMC, pretreated for 5 h with or without 1 mg/ml aspirin, were sensitized with IgE and activation with antigen in the presence of IL-10 and IL-1 β , either with or without 10 ng/ml NS-398. Immediate and delayed PGD₂ generation was assessed at 1 and 5 h respectively. Values are expressed as the means \pm S.D. for three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with PGD₂ generation at 1 h after the same treatment; † $P < 0.01$ compared with PGD₂ generation at 1 h without aspirin pretreatment; ‡ $P < 0.05$ compared with PGD₂ generation after pretreatment with aspirin, and in the absence of NS-398.

3.4 COX-2発現誘導におけるサイトカインの役割

COX-2発現誘導におけるIL-1、IL-10、IgE/抗原各々の役割について、RNAブロット及びイムノブロットにより詳細に検討した。IL-10はCOX-2 mRNAの発現誘導に不可欠の因子であり、IL-10非存在下(IL-1+IgE/抗原)ではCOX-2 mRNAの発現は弱いものであった。IgE/抗原はIL-1+IL-10によって誘導されるCOX-2 mRNAの半減期を延ばす効果が顕著であった。IL-1はCOX-2 mRNAの発現には全く影響を与えず、COX-2蛋白の安定性を増すことにより蛋白レベルでCOX-2の発現を増強することが明らかとなった。

3.5 ホスホリパーゼA₂ (PLA₂)の解析

PLA₂はアラキドン酸代謝の初発反応、すなわち膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を司る酵素であり、肥満細胞には85kDaの細胞質PLA₂(cPLA₂)と分泌性のII型PLA₂(sPLA₂)が存在することがわかっている。また、IgE/抗原刺激に伴う即時相でのアラキドン酸遊離にcPLA₂の活性化が起こることが既に示されている。

BMMCにおけるcPLA₂蛋白の発現をイムノブロットにより調べたところ、IL-1+IL-10+IgE/抗原刺激後4-8時間まで有意な変化は認められな

かった。sPLA₂の発現量はcPLA₂に比べて少なく、イムノブロットや通常のRNAブロットでは検出できなかった為、RT-PCRによりそのmRNAの発現レベルを検討した。その結果、IL-1+IL-10刺激後、2時間から10時間にかけて、5時間をピークにsPLA₂の発現が上昇することがわかった(図3)。COX-2の場合とは異なり、IgE/抗原刺激はsPLA₂の発現を更に上昇させなかった。sPLA₂の酵素活性はBMMCライゼートでは殆ど検出されなかったが、これを酸抽出した後、抗sPLA₂抗体カラムによって精製すると、sPLA₂の

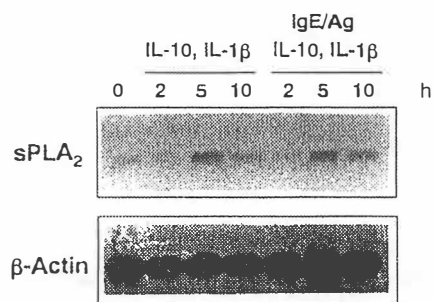


図3 Time course of sPLA₂ mRNA expression, assessed by RT-PCR/Southern blotting, in BMMC after activation

IgE-sensitized BMMC were cultured for the indicated periods after stimulation with 100 i.u./ml IL-10 and 5 ng/ml IL-1 β in the presence or absence of antigen (Ag). The expression of sPLA₂ mRNA were assessed as described in the Experimental section.

酵素活性が著しく上昇することを見いだした。このことから、BMMC 中には sPLA₂ の活性をマスクする何等かの因子が存在し、抗体カラム操作中にこの因子が除かれたものと考えられた。この方法によって検出された sPLA₂ 活性を各サイトカイン処理間で比較したところ、IL-1+IL-10 により sPLA₂ 蛋白が未刺激の細胞と比べて有意に増加することが確かめられた。

さらに、抗 sPLA₂ 抗体を培養系に添加したところ、遅発相の PGD₂ 産生は有意に抑制された (図 4)。また、分泌された sPLA₂ が基質となる細胞膜に結合するのを妨げるヘパリンによっても遅発型 PGD₂ 産生は強く抑制された。この結果から、sPLA₂ が BMMC における遅発型 PGD₂ 産生に関与しているものと結論した。

4 考 察

肥満細胞は、ある特定の刺激に反応して、二相性の PGD₂ 産生を起こすことが明らかとなった。数分以内に起こる即時型反応は、常在型酵素である cPLA₂ と COX-1 により、数時間後に起こる遅発反応は誘導型酵素である sPLA₂ と COX-2 により調節されていた。この様に、炎症刺激によって時間依存的に産生される同一の最終産物 (PGD₂) が、異なる生合成経路により産生されるという事実は、アレルギー反応の急性期と慢性期とで異なる標的分子を考慮する必要性を意味しており、興味深い。また、肥満細胞の遅発反応はサイトカインの発現誘導を伴うことが明らかにされつつある。肥満細胞の機能は周囲の微小環境に存在するサイトカインの影響を強く受けることから、各サイトカインの産生を制御することが、慢性アレルギー疾患の病態に影響を与え、治療や予防につな

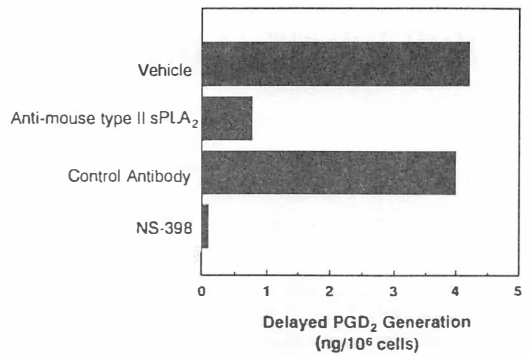


図 4 Inhibition of delayed PGD₂ generation by the Anti-sPLA₂ antibody

Aspirin-pretreated BMMC were activated with IgE/Ag + IL-10 + IL-1 β for 10 h in the presence or absence of the antibody against mouse type II PLA₂ (10 mg/ml) or the COX-2 inhibitor NS-398 (10 ng/ml), and PGD₂ released into the supernatant was quantified.

がるものと期待される。

文 献

- 1) Ashraf MMD, Murakami M, Kudo I, : Cross-linking of the high-affinity IgE receptor induces the expression of cyclo-oxygenase 2 and attendant prostaglandin generation requiring interleukin 10 and interleukin 1 β in mouse cultured mast cells, *Biochem J.*, **320**, 965-973, 1996.
- 2) Ashraf MMD, Murakami M, Shimbara S, et al., : Type II phospholipase A₂ is linked to cyclooxygenase-2-mediated delayed prostaglandin D₂ generation by cultured mouse mast cells following Fc ϵ RI- and cytokine-dependent activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 726-732, 1996.