

接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析

東邦大学 理学部

小林 芳 郎

Although the cellular and molecular mechanisms underlying the delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction have been intensively investigated, the functions of infiltrating leukocytes and skin resident cells in the elicitation phase of the DTH reaction are not completely understood. To gain more insight into the role of these cells in the DTH reaction, we performed differential display analysis aiming at identification of the genes showing elevated expression during the DNCB-induced guinea pig skin DTH reaction. About 250 cDNA fragments, each corresponding to the 3' end of a RNA species, were obtained through differential display analysis. Characterization of 50 of them led to the identification of 28 genes whose expression was elevated in the DNCB-induced DTH reactive tissue. Sequencing of the 28 cDNA fragments and homology search analysis demonstrated that 10 of them represented known genes, some of which, in particular elafin (an elastase inhibitor) and ferritin, are considered to play roles in the DTH reaction. The other 18 cDNA fragments are probably derived from unknown genes. Northern blot hybridization with the 18 cDNA fragments as probes revealed that the expression of these genes during the DTH reaction changed with different kinetics. Cloning of the cDNAs of two of these genes indicated that one is that for guinea pig tryptophanyl-tRNA synthetase, a protein recently found to be induced by IFN- γ and upregulated during the late stages of mononuclear phagocyte maturation in vitro. Strong induction of the gene for tryptophanyl-tRNA synthetase during the DTH reaction suggests its involvement in the in vivo immune response.

1 緒 言

遅延型過敏症 (DTH) はいわゆる細胞性免疫の一種で、白血球の浸潤、フィブリンの沈着、血管透過性の昂進などを特徴とする¹⁾。これには、ツベルクリン反応、ハプテンで惹起される接触過敏症などが含まれ、いずれもランゲルハンス細胞が抗原提示に重要な役割を演じている。すなわち1回目の抗原投与時(感作)、活性化されたランゲルハンス細胞は所属リンパ節に移動して特異的T細胞に抗原を提示してこれを活性化する。次いで2回目の抗原投与(惹起)を行うと、抗原特異的記憶T細胞と単球などが活性化されて浸潤し、サイトカインなどの様々な因子を放出して、炎症反応を増幅させる。このとき、これら浸潤細胞だけでなく常在性細胞や神経末端からも様々な物

質が放出され、炎症反応に関わっている。

このDTH反応には様々なサイトカイン、ケモカイン、接着分子などが関係している。たとえば抗体やノックアウトマウスを用いた研究から、ICAM-1、LFA-1、E-セレクチン、L-セレクチン、CD4、IL-1、IL-8、IL-12、IFN- γ が必須であること、IL-10、IL-1ra(IL-1レセプターアンタゴニスト)が反応を沈静化することなどが明らかになっている。これらのほかにもMIP-1 α 、MCP-1、TNF、IL-6など多様なサイトカイン、ケモカインが関わっているとの報告がある(たとえば文献²⁾や³⁾など)。さらに我々自身もモルモットDTH反応にTNFや低分子量マクロファージ走化性因子が関わっていることを報告した^{4、5)}。

DTH反応の大きな特徴は白血球の浸潤である。モルモットDTH反応部位では約40%が単球/マクロファージであった⁵⁾。ゼラチンスポンジモデルで調べた報告によると最初に好中球が浸潤し、ついでリンパ球、単球が浸潤した。

DTH反応について以上のように分子および細胞レベルで研究が進められているものの、従来は



Identification and Cloning of Genes Associated with the Guinea Pig Skin Delayed-type Hypersensitivity Reaction

Yoshiro Kobayashi

Faculty of Science, Toho University

他の研究から推定されたものについて検討するという方向が主であった。そこで今回我々は、惹起過程の解析が特に臨床上重要な意味を持っていることも考慮して、differential display 法を用いて DTH 反応の惹起時に発現が上昇している遺伝子を網羅的に取得することとし、動物としてモルモットを選んだ。これはその DTH 皮膚反応が嚙歯類のなかで最もヒトに類似しているからである。

2 実験

- **DTH 反応の誘導**：ジニトロクロロベンゼン (DNCB) 100 μ g をフロイント完全アジュバントと混合し、モルモット (Hartley albino ♀、6~7 週齢) 足裏に注射した。2 週間後、毛刈りした背部皮膚に DNCB エタノール溶液を塗布、様々な時間の後皮膚を切除して以後の実験に用いた。
- **皮膚浸潤細胞と常在細胞の単離**：既報⁴⁾に準じて単離した。
- **RNA の単離と精製**：細胞からの粗 RNA は QIAshredders を用いて単離した。これはさらに DNase I で処理した後 RNeasy Total RNA Kit で精製した。皮膚組織からの全 RNA はグアニジン中でポリトロンでホモジナイズ後、定法により抽出した。
- **Differential display 法**：既法^{6, 7)}に従い、EcoRI 部位を付加した 26 種類の 10mer のプライマーと HindIII 部位を付加した 3 種類の 1 塩基アンカーオリゴ dT とを用いて、RT-PCR を行い、6% アクリルアミド 8M 尿素ゲルで分離し、目的のバンドを回収した。これをプラスミドに回収して塩基配列を決定し、FASTA と BLAST を用いてホモロジー検索を行った。
- **ノザンプロットハイブリダイゼーション**：全 RNA を 1% アガロースホルムアルデヒドゲルで分離、ニトロセルロースに転写、定法に従い、様々な cDNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。対照としてはモルモット

β -アクチン cDNA プローブを用いた。結果は BAS1000 バイオイメージアナライザで分析した。

- **cDNA ライブラリーとクローニング**：ConA 刺激モルモット脾臓細胞由来 mRNA を用いて、ラムダ ZAPII にライブラリーを構築し、定法によりクローニングを行った。陽性のクローン由来の cDNA 断片はファージミドとして回収した。

3 結果

3.1 DTH 反応で発現が昂進する cDNA 断片の特徴

Differential display 法で約 250 種類の cDNA 断片が DTH 反応で発現が昂進する遺伝子の候補として得られた。そこでその中から 50 種類を無作為に選び、惹起後 24 時間後の皮膚組織と同じ動物で惹起していない皮膚組織とから RNA を単離し、ノザンプロットハイブリダイゼーションを行ったところ、28 種類については確かに DTH 反応で発現が昂進していた。これらを DEG (differentially expressed gene) と名付け、その塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った。その結果、18 種類がおそらくこれまでに報告されていないもので、残りの 10 種類は既知の遺伝子であろうと推定された (Table 1)。これらの中には、エラフィン、フェリチン重鎖、Hox-1.7、ミトコンドリアアチトクロム b、リボソーム RNA、リボソーム L34 蛋白質などが含まれていた。

3.2 18 種類の DEG の DTH 反応における発現の経時変化

これら 18 種類の DEG の DTH 反応における役割を知るためにまず、発現の経時変化を調べた。その結果およそ 3 つのグループに分類できることが明らかになった (Fig. 1)。

- (1) DEG 4、6、7、13 はその発現が 12 時間目にピークとなった。
- (2) EG10、12、14 はその発現が時間とともにゆっ

Table 1 The identified genes differentially expressed during the DTH reaction

Name	Size	Identity	Name	Size	Identity
DEG# 1	167 bp	unique	DEG 16	312 bp	unique, 90% homology with AC0015*
DEG 2	129 bp	unique	DEG 17	194 bp	unique
DEG 3	141 bp	elafin	DEG 18	127 bp	ribosomal L34 protein
DEG 4	124 bp	unique, 90% homology with D31886*	DEG 19	184 bp	unique, 60% homology with H11836*
DEG 5	149 bp	mitochondrion cytochrome b	DEG 20	246 bp	unique, 80% homology with N53996*
DEG 6	162 bp	unique	DEG 21	275 bp	unique
DEG 7	201 bp	unique	DEG 22	213 bp	unique, 80% homology with AA211693*
DEG 8	156 bp	ribosomal RNA	DEG 23	160 bp	unique
DEG 9	90 bp	MHC class II antigen	DEG 24	110 bp	unique
DEG 10	73 bp	unique	DEG 25	124 bp	unique
DEG 11	515 bp	ferritin heavy chain	DEG 26	287 bp	B cell activation gene
DEG 12	253 bp	unique, 70% homology with AA323500*	DEG 27	326 bp	α chain of MHC class II antigen
DEG 13	231 bp	unique	DEG 28	170 bp	T cell receptor
DEG 14	358 bp	unique, 65% homology with AA261572* & T67068*			
DEG 15	159 bp	Hox-1.7 protein			

#DEG: differentially expressed gene fragments.

* accession number of EST, STS, GSS, or HTGS sequence data.

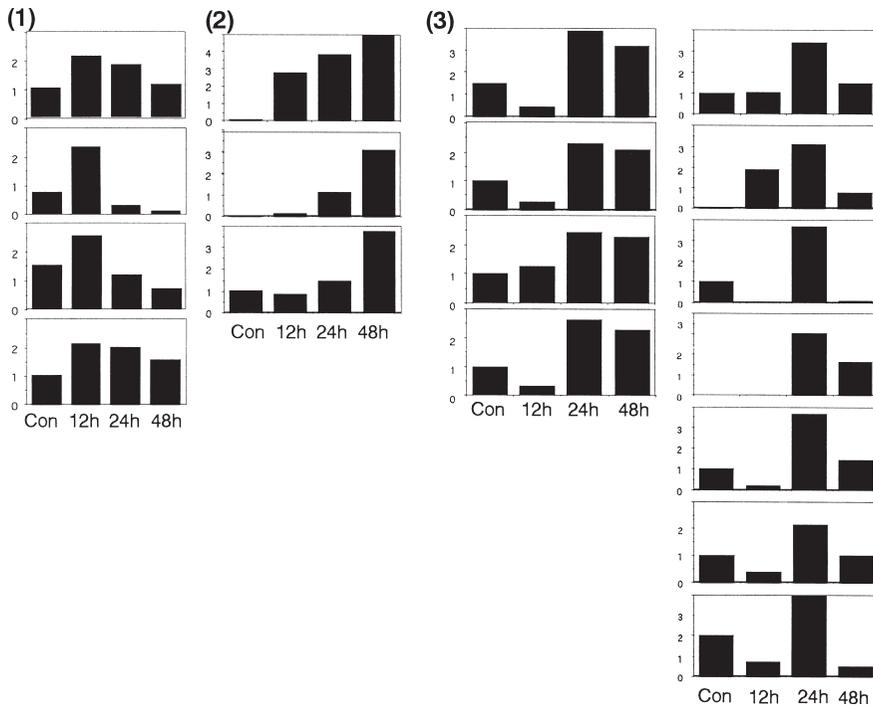


Fig. 1

くり増大した。

(3)残りの DEG はその発現が 24 時間目で最高となった。そのうち、DEG16、17、20、22 は 48 時間でも発現がまだ高いのに対し、残りの 7 種類は 48 時間目にはほとんど対照レベルまで低下した。

3.3 DEG21 cDNA のクローニング

DEG21 cDNA をクローニングしたところ、1896 塩基の挿入配列をもつクローンが得られた。これは 305 残基のアミノ酸からなる蛋白質をコードでき、この部分はマウストリプトファン tRNA 合成酵素 (WRS) のカルボキシル末端側と 94% の相同性がみられた。従って、DEG21 はモルモット WRS であると結論された。

4 考察

これまで DTH の研究は、サイトカイン、ケモカイン、接着分子など、他の研究から DTH での役割が想定されたものについて調べるという方向でなされてきた。今回我々は differential display 法により DTH 反応局所で昂進している遺伝子を直接単離するという従来とは別の方法を試みた。多くの生体内の反応がそうであるように DTH 反応も高度に複雑な反応であるから、我々のアプローチからまったく新しい知見が得られる可能性が高いと考えられたためである。その結果、250 種類の cDNA 断片が候補として得られ、無作為に 50 種類について調べたところ 28 種類が DTH 反応で発現が昂進していた。この結果は DTH 反応が多く遺伝子の関係した高度に複雑な反応であるということと一致する。

28 種類の DEG 断片の中で 10 種類はすでに報告されている遺伝子であった (Table 1)。これらのうち、MHC や TCR の発現の増大は免疫応答におけるこれらの役割を反映しているであろう。またリボソーム RNA や蛋白質、ミトコンドリアチトクロム b の発現の増大は、DTH 反応局所に浸潤した細胞の活発な代謝や蛋白合成を

反映しているのであろう。一方フェリチンは鉄イオンの無毒化、貯蔵に重要であり、特にマクロファージ内のフェリチンは細菌感染防御における鉄イオン代謝で重要な役割を果たしている⁸⁾。したがって DTH において、活性化されたマクロファージの鉄代謝が感染防御以外の未知の役割を演じている可能性がある。またエラフィン⁹⁾はエラスターゼ特異的阻害剤で、上皮細胞で主に産生されるが好中球でも少量産生され、血管新生を制御しているといわれているから⁹⁾、DTH 反応で血管新生が関係している可能性がある。最後に Hox-1.7 はホメオボックス遺伝子の一つで、本来は発生過程でパターン形成に関わる遺伝子とされてきたが、最近 T 細胞や NK 細胞の増殖と関連しているとの報告もある¹⁰⁾。しかし現在のところこの遺伝子が生体内の免疫反応に関わっているかどうかは不明である。

残りの 18 種類の DEG 断片はこれまでに報告されていない遺伝子ではないかと想定された。これらの遺伝子の発現の DTH 反応に伴う経時変化はおよそ 3 種類に分類された。この発現のパターンが特定の細胞集団の数の増減を反映している可能性もあるが、浸潤細胞で発現が実際に昂進している DTH 反応を制御している可能性もある。

DEG21 は新規遺伝子と想定された DEG 断片の一つであったがクローニングの結果モルモット WRS 遺伝子であることが明らかとなった。WRS 遺伝子はハウスキーピング遺伝子であるがマクロファージで IFN- γ によって強く誘導されること^{11, 12)}や、マクロファージの成熟化に伴い増加すること¹³⁾が報告されている。IFN- γ によって誘導される免疫関連分子にトリプトファンを取り込むのに必要なのではないかの説¹⁴⁾もあるが、誘導される意義は現在のところ不明である。今回 DTH 反応でこの遺伝子の発現が昂進したことは WRS の重要な働きを示唆しているのではないかと考えている。

今後残りの遺伝子のクローニングを初め、それらのコードする蛋白質の DTH 反応における役割

を解明していかなければいけないと考える。

引用文献

- 1) Turk, J. L. : Delayed type hypersensitivity, 2nd edn. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980.
- 2) Larsen, C. G., Thomsen, M. K., Gesser, B., et al. : The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8: Inhibition of a tuberculin skin reaction by anti-IL-8 antibody. *J. Immunol.* 155, 2151-2157, 1995.
- 3) Saulnier, M., Huang, S., Aguet, M., et al. : Role of interferon-gamma in contact hypersensitivity assessed in interferon-gamma receptor-deficient mice. *Toxicology* 102, 301-312, 1995.
- 4) Higashi, N., Yoshizuka, N., Ohuchi, A., et al. : Involvement of inflammatory cytokines in a delayed-type hypersensitivity reaction. *Cell. Immunol.* 161, 288-294, 1995.
- 5) Higashi, N., Yoshizuka, N. & Kobayashi, Y. : Phenotypic properties and cytokine production of skin-infiltrating cells obtained from guinea pig delayed-type hypersensitivity reaction sites. *Cell. Immunol.* 164, 28-35, 1995.
- 6) Bauer, D., Muller, H., Reich, J., et al. : Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21, 4272-4280, 1993.
- 7) Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., et al. : Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* 22, 5763-5764, 1994.
- 8) Harrison, P. M. & Arosio, P. : The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 479-514, 1996.
- 9) Webster, J., Jones, P.L., Sallenave, J.M., et al. : Elastase-specific inhibitor elafin and endogenous vascular elastase (EVE) in vascular development. *FASEB J.* 11, A224, 1997.
- 10) Caré A., Testa, U., Bassani, A., et al. : Coordinate expression and proliferative role of HOX B genes in activated adult T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4872-4877, 1994.
- 11) Fleckner, J., Rasmussen, H. H. & Justesen, J. : Human interferon gamma potently induces the synthesis of a 55-kDa protein (gamma 2) highly homologous to rabbit peptide chain release factor and bovine tryptophanyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 11520-11524, 1991.
- 12) Fleckner, J., Martensen, P. M., Tolstrup, A. B., et al. : Differential regulation of the human interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. *Cytokine* 7, 70-77, 1995.
- 13) Krause, S. W., Rehli, M., Kreutz, M., et al. : Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J. Leukoc. Biol.* 60, 540-545, 1996.
- 14) Xue, H. & Wong, T. F. : Interferon induction of human tryptophanyl-tRNA synthetase safeguards the synthesis of tryptophan-rich immune-system proteins: a hypothesis. *Gene* 165, 335-339, 1995.