

自己炎症性症候群マウスモデルにおける マスト細胞活性化機構の解明

布村 聡¹⁾, 岡山吉道²⁾, 羅 智靖³⁾, 照井 正¹⁾

Elucidation of the mechanism for mast cell activation in a mouse model of auto-inflammatory disease

Satoshi NUNOMURA¹⁾, Yoshimichi OKAYAMA²⁾, Chisei RA³⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

近年同定された家族性寒冷蕁麻疹の原因遺伝子の一つである *plcg2* は、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マスト細胞で発現するシグナル伝達分子のホスホリパーゼ (PL) $C\gamma_2$ をコードしており、家族性寒冷蕁麻疹では $PLC\gamma_2$ の恒常的活性化型の変異が認められている。本研究では、*plcg2* 遺伝子に機能亢進型の変異 (Tyr495→Cys) が挿入された結果、末梢四肢の紅班や浮腫を自然発症する Ali14 マウスにおけるマスト細胞に着目し、Ali14 変異マスト細胞の機能を *in vitro* および *in vivo* で明らかにすることを旨とした。

1. はじめに

Ali (Ali for Abnormal limb) 14 は、ドイツにおける大規模ミュータジェネシスプロジェクトにおいて、末梢四肢の紅班や浮腫を指標に単離された半優性突然変異マウス系統であり¹⁾, Everrtt²⁾ によって、Ali14 変異は *plcg2* の機能更新型変異であることが明らかにされている。Ali14 マウスの炎症反応がリンパ球の非存在下でも発症することから、皮膚組織に多数局在するマスト細胞が、Ali14 マウスで認められる自己炎症性皮膚疾患の病態形成における実効細胞である可能性が考えられた。そこで本研究では、Ali14 マウスの骨髄から調製したマスト細胞の機能解析を行なった。

2. 材料および方法

培養マウスマスト細胞は、Ali14 変異型 (Ali14/+), 野生型 (+/+) マウスの骨髄細胞 (東海大学医学部阿部幸一郎博士より供与頂いた) を IL-3 (5 ng/ml) 存在下で 6-8 週間培養することにより調製した。ラットマスト細胞株 RBL-2H3 への *plcg2*^{Ali14} および

plcg2^{WT} 遺伝子の導入はレトロウイルスを用いて行なった。ウイルス感染後、Puromycin 耐性クローンを選択し安定発現株を得た。調製した培養マスト細胞や RBL-2H3 Ali14 トランスフェクタントの活性化は、脱顆粒反応を指標にして評価した。マスト細胞の刺激は、寒冷蕁麻疹との関連から、寒冷刺激 (Icilin), 他の刺激として抗原 (anti-TNP IgE + TNP-BSA) 刺激を使用した。カルシウムイオノフォア A23187 (1 μ M) に対する脱顆粒および細胞内カルシウム応答を内部コントロールとし、抗原および寒冷刺激による脱顆粒応答とカルシウム応答は A23187 によって誘導された応答を 100% として表示した。

3. 結果

抗原刺激によるマスト細胞の活性化を脱顆粒を指標にして評価を行なった結果、Ali14 変異型マスト細胞で脱顆粒応答の亢進が認められた (図 1)。

しかしながら、寒冷刺激 (Icilin) による脱顆粒応答は野生型、Ali14 変異型マスト細胞ともにほとん

1) 皮膚科学分野
2) 医学教育企画・推進室
3) 微生物学分野
布村 聡: nunomura.satoshi@nihon-u.ac.jp

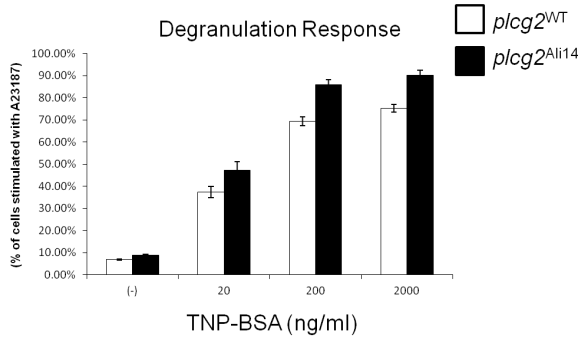


図 1 抗原刺激による脱顆粒

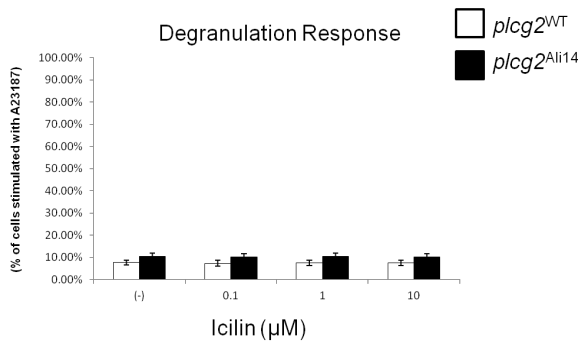


図 2 Icilin 刺激による脱顆粒反応

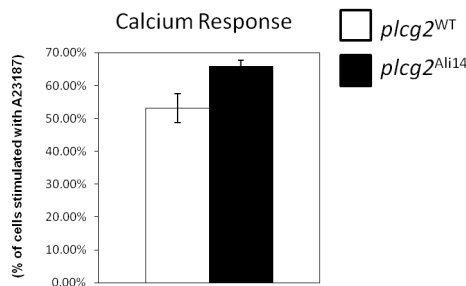


図 3 抗原刺激による細胞内カルシウム応答

ど誘導されず、また両群間で有意差も認められなかった (図2)。

抗原刺激による脱顆粒応答が増強されていたことから、細胞内カルシウムの動態をRBL-2H3トランスフェクタントを用いて解析を行なった。その結果、Ali14変異遺伝子を導入したRBL-2H3トランスフェクタントにおいて、抗原刺激 (TNP-BSA 2000ng/ml) による細胞内カルシウム応答が亢進していることが明らかとなった。

4. 考 察

今回の研究により、Ali14におけるplcg2の機能更新型変異は抗原刺激に対しては、マスト細胞の活性化を増大させるものであることが明らかになった。しかしながら、Icilinを用いた寒冷刺激に対してはほとんど影響を示さなかったことから、Ombrelloら³⁾によって報告された家族性のPLCγ2の恒常的活性化型変異が寒冷刺激によるマスト細胞の脱顆粒応答を亢進させるとする研究結果とは異なるものであり、Ali14マウスにおける末梢四肢の紅班や浮腫には温度環境によって発症が誘導されている可能性は低いことが示唆された。マスト細胞そのものの関与についても、現在マスト細胞欠損マウスとAli14マウスとの掛け合わせを進めている段階であり、*in vivo*での解析を行なっていく予定である。

謝 辞

本研究の成果は、平成25年度 日本大学医学部助成金 (50周年 (共同)) の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Hrabé de Angelis M H, Flaswinkel H, Fuchs H, et al. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet.* 2000; 25: 444-447.
- 2) Everett K L, Bunney T D, Yoon Y, et al. Characterization of phospholipase C gamma enzymes with gain-of-function mutations. *J Biol Chem.* 2009; 284: 23083-23093.
- 3) Ombrello M J, Remmers E F, Sun G, et al. Cold urticaria, immunodeficiency, and autoimmunity related to PLCG2 deletions. *N Engl J Med.* 2012; 366: 330-338.