

細菌抗原に対する免疫担当細胞の機能解析

Functional analyses of immune cells against bacteria antigens

池田輝雄

麻布大学獣医免疫学研究室

Teruo IKEDA

Laboratory of Veterinarian Immunology, Azabu University

(背景と目的)

近年、自然免疫および適応免疫におけるマスト細胞の機能が注目されている。我々はマスト細胞の免疫担当細胞としての機能に注目し感染局所においては、マスト細胞の増殖因子として知られるIL-9がマウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)に対してLPS刺激によりIL-9 mRNAの発現を強く誘導することを見出した。また、IL-9はBMMCの細胞増殖を単独では誘導しないが、IL-3およびSCFとの共培養で相加的に促進させることを示し、LPS存在下でのIL-9産生によるマスト細胞のオートクライン増殖の可能性を示唆し、グラム陰性菌感染局所でのマスト細胞の役割を考察した。そこで今年度は、LPS刺激によるBMMCからのIL-9の産生をELISAを用いてタンパクレベルで検討し、IL-9産生によるオートクラインの検証を試みた。

(材料と方法)

マスト細胞の培養

マスト細胞はBALB/cマウスから調整した骨髄由来培養マスト細胞 bone marrow driven mast cells (BMMCs) を用いた。

LPSでの刺激

α -mediumにIL-3 (2 ng/ml) とSCF (10 ng/ml) を添加した培地にBMMCs 1×10^6 個/mlを100 μ l プレートにまき、*Escherichia coli* B4:O111由来のLPS (Sigma) でそれぞれ実験により時間(12 h 24 h 48 h)、濃度(10 ng/ml 100 ng/ml 1000 ng/ml)を変化させ刺激した。

サイトカインの定量

刺激したサンプルの上清をサンドイッチELISA法を用いて測定した。本法は下記に示した。

リアルタイムPCR

マスト細胞からのTotal RNAの調整は、ISOGEN (ニッポンジーン) を使用した。cDNAの合成はSUPERSCRIPT^{II} RT (Invitrogen) を用いた。

サイトカインのmRNA発現レベルは、Applied Biosystems 7300 real-time PCR systemを用いて、TaqManアッセイおよびSYBR Greenアッセイで測定した。サイトカインのRNA発現はGAPDHに対するRNA発現値として示した。

サンドイッチELISAによるIL-9の定量

IL-9を測定するためにサンドイッチELISA法を用いた。方法はU字マイクロプレート (greiner社製)

に Capture 抗体 (PEPROTECH 社の 500-P59) を Coating Buffer pH9.5 (BD 社) で 1 mg/ml に調整し, 100 μ l/well ずつ入れ, 4 $^{\circ}$ C で overnight して固相化した。PBS-tween-20 で洗浄後, 1% BSA の PBS で 1 時間室温でブロッキングし, 洗浄後, スタンダードあるいはサンプルを 100 μ l/well 入れ, 3 時間室温で反応させる。洗浄後, Detection 抗体 (PEPROTECH 社の 500-P59Bt) 0.5 mg/ml を 100 μ l/well 入れ, 2 時間室温で反応させて, 洗浄後, streptavidin で 30 分感作し, 洗浄後, アビジン-ビオチン液を加え, 吸光度 405 nm で測定した。検量線からサンプルの濃度を検出した。

結果

1. LPS 刺激により誘導されるマスト細胞 IL-9 mRNA および IL-9 レセプター mRNA

マスト細胞での IL-9 mRNA 発現は LPS での刺激によって増加した。この発現は LPS 濃度依存的に増加し, 刺激後 4 時間でピークを示した。一方, IL-9 レセプターの mRNA の発現での LPS 濃度依存性は認められなかったが, 恒常的に強い発現を示していた。

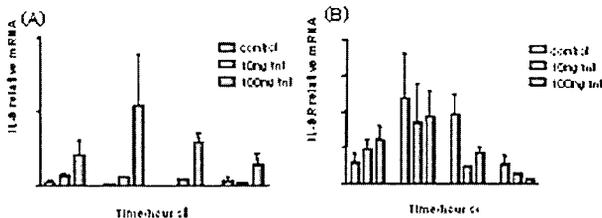


Fig.1 IL-9 and IL-9R expression in BMDCs stimulated with LPS. Mouse BMDCs were stimulated with LPS (100 ng/ml or 1 μ g/ml) for 2-12 h. Total RNA was prepared with Isogen and synthesized cDNA with reverse transcriptase. Quantitative IL-9 mRNA was analyzed by real-time PCR. (A) The expression levels of IL-9 were determined by real-time PCR in BMDCs 2-12 h after stimulation with varying amounts of LPS. (B) The expression levels of IL-9R were determined by real-time PCR in BMDCs 2-12 h after stimulation with varying amounts of LPS. Data were presented as mean \pm SEM from triplicate wells of a single experiment and represent 1 of 3 experiments demonstrating similar results.

2. LPS 濃度依存的に誘導されるマスト細胞 IL-9

LPS 刺激により BMDC は IL-9 mRNA を強く発現することから, 次にタンパクレベルでの IL-9 分泌量を検討した。すると, LPS 刺激に対し BMDC が IL-9 の産生が見られ, それは LPS 濃度 100 ng/ml 以上で濃度依存的に IL-9 産生量の増加が見られた。このことから BMDC は mRNA 発現を伴って IL-9 を産生することから, オートクラインによる増殖が可能であることが強く示唆された。

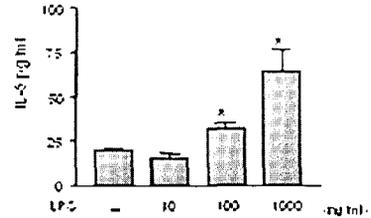


Fig.2 LPS dose-dependent IL-9 secretion in BMDCs stimulated with LPS. BMDCs (1×10^6 cells/ml) were stimulated with LPS at the indicated concentrations for 24 h. Culture supernatants were measured for cytokine IL-9 by ELISA. Data were presented as mean \pm SEM from triplicate wells of a single experiment and represent 1 of 3 experiments demonstrating similar results. (* $p < 0.05$)

3. LPS 刺激による経時的な IL-9 産生の変化

LPS 刺激により BMDC からの IL-9 産生が見られたことから, 次に LPS 刺激による IL-9 産生の経時的变化を調べた。その結果, 少なくとも 48 時間までは時間経過にしたがって IL-9 の産生量が増加していることが見られたことから, LPS による BMDC からの IL-9 産生は一過性のものでなく比較的長期にわたって, 継続することが示唆された。

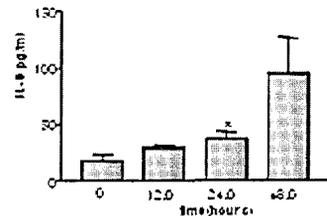


Fig.3 Time course of IL-9 secretion in BMDCs stimulated with LPS. BMDCs (1×10^6 cells/ml) were stimulated with LPS (1 μ g/ml). Culture supernatants were measured for cytokine IL-9 at the indicated time points by ELISA. Data were presented as mean \pm SEM from triplicate wells of a single experiment and represent 1 of 3 experiments demonstrating similar results. (* $p < 0.05$)

4. LPS およびサイトカイン共刺激による IL-9 産生能への影響

LPS 刺激により BMDC は濃度及び時間依存的に IL-9 産生を増加することがわかったので, 次にマスト細胞の増殖に必須である IL-3 及び SCF が IL-9 産生に及ぼす影響を検討した。IL-3 と LPS の共刺激により IL-9 の産生量は増加した。SCF と LPS の共刺激による IL-9 産生への影響は認められなかった。この結果から, LPS 刺激での BMDC から産生される IL-9 によるオートクライン誘導マスト細胞増殖には IL-3 の存在が必須であることが示唆された。

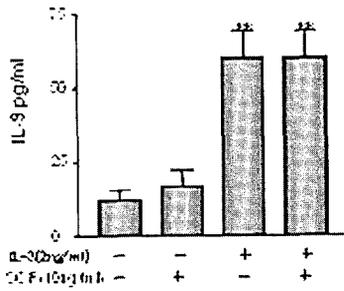


Fig.4 Effect on IL-9 secretion in BMMCs co-stimulated with LPS and IL-3 and/or SCF. BMMCs (1×10^6 cells/ml) were stimulated for 24 h with LPS (1 µg/ml) \pm IL-3 (2 ng/ml) \pm SCF (10 ng/ml). Culture supernatants were measured for cytokine IL-9 by ELISA. Data were presented as mean \pm SEM from triplicate wells of a single experiment and represent 1 of 3 experiments demonstrating similar results. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

まとめ

・ BMMC において LPS 刺激で、 mRNA レベルでの

IL-9 が発現していることがわかった。

・ BMMC において LPS 刺激で、 タンパクレベルでの IL-9 が発現していることがわかった。

・ BMMC において IL-9 は mRNA レベルでも タンパクレベルでも LPS 濃度依存的に発現していることがわかった。

・ BMMC において IL-9 の産生には IL-3 が必須であることがわかった。

(考察)

前回の成績から推察されたように BMMC はグラム陰性菌由来 LPS 刺激に対して、 IL-9 を mRNA レベルでも タンパクレベルでも産生することから、 IL-9 はマスト細胞のグラム陰性菌感染の免疫応答に強く関与していると考えられる。現在、より詳細な IL-9 産生機序と *in vivo* でこの免疫応答を証明するための W/W⁰ での実験を検討中である。