

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No

課題番号

20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	……	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	……	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	……	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	……	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	……	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	……	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	……	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	……	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	……	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	……	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	……	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	……	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	……	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	……	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	……	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	……	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	……	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	……	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	……	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	……	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	……	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	……	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	……	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	……	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	……	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	……	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用

所属 国立小児病院小児医療研究センター・免疫アレルギー研究部
研究者 斎藤 博久

分担研究者

- | | |
|-------------------------|---------------|
| (1) エーザイ(株)筑波研究所・基礎研究本部 | 浅田 誠 |
| (2) 三菱東京製薬(株)・医薬総合研究所 | 坂井 薫 |
| (3) 国立相模原病院臨床研究部 | 海老 澤元宏 |
| (4) 日本医科大学耳鼻咽喉科教室 | Ruby Pawankar |

要旨

正常ヒト末梢血からマスト細胞を大量に誘導する方法を開発した。この方法により培養した成人造血幹細胞由来マスト細胞と臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞の性質を比較検討した。その結果、臍帯血由来マスト細胞では高親和性 IgE 受容体(FcεRI)の発現が特異的に低く抑制されていることが明らかになった。

1. 研究目的

気管支喘息は、従来、喘鳴、呼吸困難を示す可逆性の気道閉塞を生じる症候群として捉えられていたが、近年、気管支喘息患者の気道上皮内の炎症細胞浸潤や上皮剥離などの病理学的解析が進み、現在では気管支喘息は、気道の慢性炎症に伴う気道過敏性と気道の可逆性閉塞を特徴とする疾患と理解されている。また、最近では、抗原の侵入後数分で起こる即時型反応の終了後、数時間を経て認められる遅発型反応が、気管支喘息においては重要な反応であると考えられてきた。遅発炎症反応は、マスト細胞、上皮細胞、T 細胞などより分泌されるサイトカインを介した反応である。しかしながら、マスト細胞においては、増殖に必要なサイトカインや活性化を抑制する薬剤の感受性において、マウスなどの実験動物とヒトの間に大きな差が認められることが知られている。したがって、本研究では、マスト細胞などの炎症細胞の発生機構、機能的分化の制御方法ひいては治療法の開発を目的として検討を行う。

昨年度までに、われわれは、ともに IgE 抗体を介して I 型アレルギー反応をおこすことのできる細胞であるヒトのマスト細胞と好塩基球が、異なる起源を有することを証明し、さらにヒトのマスト細胞のサブセットとして報告されていた chymase と tryptase の両者の酵素をもつマスト細胞 MCTC と tryptase のみをもつマスト細胞 MCT の違いは、連続的なものであり、2つの異なるサブセットとはいえないことを明らかにした。本年度の研究においては、正常ヒト末梢血からマスト細胞を大量に誘導する方法を開発し、成人造血幹細胞由来マスト細胞と臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞の機能を網羅的に解析、臍帯血由来マスト細胞では FcεRI の α 鎖と β 鎖および chymase が特異的に低く抑制されていることをあきらかにした。

2. 研究方法

(1) 末梢血由来マスト細胞の培養法

血清高 IgE 値(IgE >5,000 U/ml)がみられるアトピー疾患患者 17 名、および血清 IgE 値が 400 U/ml の以下の正常対照者 12 名より末梢血を採取した。すべての検体採取に関して、倫理審査委員会にて承認された説明書を用いて、文章による同意を得た。シリカ処理を行い、比重遠沈法で、非食食性単核細胞を採取した。この細胞を CD4, CD8, CD11b, CD14, CD19 に対する抗体と反応させ、磁気細胞分離装置 magnetic separation column (MACS) にて、negative selection を行い造血幹細胞を含む細胞を取り出した(通常 20 ml 血液より、10⁶ の細胞を得られた)。この細胞を 100 ng/ml の stem cell factor (SCF)、50 ng/ml の IL-6、1 ng/ml の IL-3 を含む 0.9%メチルセルロース含無血清 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)に浮遊させた。14 日目ごとに、細胞を含まない 100 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-6 を含むメチルセルロースを重層し、合計 6 週間培養すると、マスト細胞のみよりなるコロニー形成が観察された。機能解析のためには細胞をさらに 6 週間 100 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-6 を含む液体培地に浮遊させ培養した。なお、培養 3 週目の段階では好酸球+好塩基球コロニーを

算定した。

(2) 臍帯血由来マスト細胞の培養方法

①臍帯血由来造血幹細胞の分離:臍帯静脈より採取した血液をただちに2倍の PBS 溶液(10 U/ml ヘパリンを含む)にて希釈、氷水中に保管した。単核細胞を Lymphocyte Separation Medium (LSM)をもちいて比重遠沈法にて分離したのち、MACS をもちいて CD34 陽性細胞を分離した。

②細胞培養:CD34 陽性細胞は IMDM に 1% Insulin-Transferrin-Selenium (GIBCO BRL), 5×10^{-5} M 2-ME (GIBCO BRL, 21985-023), 1% penicillin+streptomycin (GIBCO BRL) および 0.1% BSA を添加して、無血清培地を作成した。CD34 陽性細胞をこの無血清培地に 100 ng/ml SCF, IL-6、および最初の 2 週間のみ IL-3 を添加して 1×10^5 /ml に浮遊させ、75cm² フラスコにて培養開始した。培養 5-6 週目より血清を添加して、12 週以上培養したものを機能解析の対象とした。2週目以降、細胞濃度が 1×10^6 /ml を越えないように希釈、調整した。必要に応じて末梢血マスト細胞と同様に、CD34 陽性細胞を 100 ng/ml の stem cell factor (SCF)、50 ng/ml の IL-6、1 ng/ml の IL-3 を含む 0.9%メチルセルロース含無血清 IMDM に浮遊させた。14 日目ごとに、細胞を含まない 100 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-6 を含むメチルセルロースを重層し、合計 10 週間培養し、マスト細胞のみよりなるコロニーを形成させた。

(3) マスト細胞の機能評価

①染色:マスト細胞の増殖は Cytospin 2 (Shandon)を使って標本を作製し、May-Grünwald and Giemsa 染色、またはトリプターゼとキマーゼに対する抗体(Chemicon, Temecula, CA)と Dako APAAP Kit (Dako)をもちいた免疫染色をおこなった。また、フローサイトメーターを用いて細胞内染色は以下のおこなった。すなわち 10^5 細胞を 4% paraformaldehyde で固定、洗浄後 PBS-saponin (PBS-S) にて 1 時間処理し、細胞を permeabilize した。この細胞を 50 mg/mL ヒト IgG (ICN Biomedicals)の存在下で、3 mg/mL の mouse anti-human tryptase (Chemicon) あるいは mouse anti-human chymase (Chemicon)、またはコントロールとしてマウス IgG1 と反応させ、さらに2次抗体として FITC 標識 ヤギ anti-mouse IgG (Becton Dickinson) と 30 分間反応させた。分析は FACScan 装置と CellQuest software を用いて行った。

②ヒスタミン遊離反応:得られた培養マスト細胞および好塩基球を骨髓腫由来ヒト IgE 5 μ g/ml 添加もしくは非添加の状態で 48 時間反応させた。ヒスタミン遊離反応は以下のように行った。すなわち、Tyrode 反応液 (pH7.4; 124mM NaCl, 4mM KCl, 0.64mM NaH₂PO₄, 1mM CaCl₂, 0.6mM MgCl₂, 10mM HEPES 0.03%HSA)で細胞を洗浄、 1×10^6 細胞/ml に調製し 37°C 恒温槽内で 10 分間プレインキュベートした。次に、抗 Fc ϵ R1 抗体(コスモバイオ)で刺激を加え 30 分間反応させた後、上清中のヒスタミンを測定した。ヒスタミン測定には、高速液体クロマトグラフィーとオルトフタルアルデヒドによる蛍光測定法を組み合わせたヒスタミン測定器を使用した。

③サイトカイン産生の測定:培養マスト細胞を、100 ng/ml の SCF と 50 ng/ml の IL-6 を含む、10%FCS 加 Iscove DMEM に、 1×10^6 /ml の濃度で浮遊させた。細胞浮遊液を U 型 96 穴マイクロプレート(NUNC, Denmark) に、1穴に 200 μ l ずつ分注した。抗 Fc ϵ R1 抗体にて刺激後、6 時間培養し、上清中の GM-CSF, IL-8, IL-5, MIP-1 α , IL-13 を測定した。測定には ELISA kit (R&D system, USA) を用いた。

(4) RT-PCR 法による Fc ϵ R1 の α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の遺伝子発現解析

培養マスト細胞から ISOGEN® (Japan Gene, Tokyo)を使って RNA を抽出し、cDNA に逆転写した。PCR 増幅に用いた Fc ϵ R1 の α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の特異的 sense、antisense プライマー (0.4 μ M)は以下の通りである。

Primer/Probe	Sequence
β -actin	
forward primer	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCC-3'
reversed primer	5'-TAGAAGCATTGCGGTGGACGATG-3'
Fc ϵ R1 α chain	
forward primer	5'-GCCTTACTGTTCTTCGCTCCA-3'
reverse primer	5'-GTCCAGCTGCCACACTTTGC-3'
Fc ϵ R1 β chain	

forward primer 5'-ATGGACACAGAAAGTAATAGG-3'
reversed primer 5'-TTATAAATCAATGGGAGGAGACATTTCCCCT-3'

FcR γ chain
forward prime 5'-ATGATTCCAGCAGTGGTCTTG-3'
reversed primer 5'-CTACTGTGGTGGTTTCTC-3'

これらの PCR 産物は DNA Thermal Cycler (PE Biosystems, Foster City, CA)を 35-40 サイクル施行し、得られた。PCR 産物を ethidium bromide を含む 2% agarose gels (Takara, Tokyo, Japan)にて泳動後、UV 灯にて可視化、さらに NIH Image® 1.62 (National Institute of Health, Bethesda, MD)を用いて数値化し有意差計算を行った。

(5) GeneChip® を用いた網羅的遺伝子発現解析

3人の提供者より得られた臍帯血由来マスト細胞と4人の提供者より得られた末梢血由来マスト細胞を混合し、解析に用いた。マスト細胞は IL-4 の有無の条件で2つに分け、6 時間反応させた。10⁷ 個のマスト細胞より 6.2-9.6 μ g の RNA を抽出、フィコエリスリン PE 標識下にて逆転写、10 μ g の complimentary RNA を生成させた。GeneChip は Affymetrix 社の HuGeneFL Array consisting (7,129 high-density oligonucleotide probearrays)を用いた。このアレイでは約 5,600 種の全長配列が判明している遺伝子の発現を定量的に知ることが可能であった。

(6) SO₂ の肺炎症に及ぼす影響

Hatley 系モルモットに SO₂ ガスを吸入し、呼吸機能をダブルフロープレチスモグラフ法で測定した。

3. 研究成果

(1) 臍帯血由来造血幹細胞と末梢血由来造血幹細胞のマスト細胞への分化能力

臍帯血由来マスト細胞と末梢血由来マスト細胞のコロニー形成能と細胞増殖能を比較し、造血幹細胞 1 個あたりのマスト細胞生成能を算定した。1個の臍帯血造血幹細胞は平均 15,436 個のマスト細胞を形成したが、成人造血幹細胞は 1 個あたり、平均 807 個のマスト細胞を生成した。末梢血造血幹細胞のマスト細胞への分化能力は年齢と逆相関していることも判明し、新生児以降、造血幹細胞のマスト細胞への分化能力は急速に減弱し、加齢とともに徐々に減少することが判明した。

(2) 臍帯血由来造血幹細胞と末梢血由来造血幹細胞の機能面の比較

10⁶の末梢血由来マスト細胞は 10ng の IL-4 と 1 μ g のヒト IgE で処理した後、抗ヒト IgE 抗体にて刺激を加えると 3.6 μ g のヒスタミン、215 pg の IL-5 そして 14 ng の GM-CSF を遊離した。それに対し、臍帯血由来マスト細胞は同様な条件にて培養、前処理したのにも拘わらず、10⁶ 個あたり 0.9 μ g のヒスタミン、31 pg の IL-5 および 0.58 ng の GM-CSF しか遊離産生しなかった。しかしながら、非免疫学的な刺激である ionophore A23187 では両者のマスト細胞は同等のヒスタミンを遊離した (Table 1)。

(3) Fc ϵ RI の α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の遺伝子発現解析

図 1 に示したように、全く同一条件にて培養したのにも拘わらず、臍帯血由来マスト細胞においては Fc ϵ RI α 鎖の発現が特異的に低く抑制されていた。 β 鎖、 γ 鎖に関しては差を認めなかった (Fig. 1)。フローサイトメーターによるタンパク発現解析でも Fc ϵ RI α 鎖の発現は臍帯血由来マスト細胞において特異的に抑制されていて、培養週数を延長しても、その傾向は同一であった (Fig. 2)。

(4) GeneChip® を用いた網羅的遺伝子発現解析

約 5,600 種類の遺伝子を網羅的に解析した結果、臍帯血由来マスト細胞と末梢血由来マスト細胞は多くの遺伝子発現は一致していた。Fc ϵ RI α 鎖は、臍帯血由来マスト細胞に、5番目に特異的に低く抑制されていた (Fig. 3)。その他の4つの著しい差を認めた遺伝子はマスト細胞に特異的なものではなく、タンパク発現解析で結果が一致しない場合も見られた。

(5) SO₂ に暴露されたモルモットでは、正常対照に比べ、有意に呼吸機能および肺胞中の好中球数が増加していた。

4. 考 察

全く同一条件、同一環境で培養したのにも拘わらず、臍帯血(新生児)由来造血幹細胞と末梢血(成人)由来造血幹細胞のマスト細胞への分化能および生成したマスト細胞の IgE 抗体に依存した機能は大きく異なっていた。そして、臍帯血由来マスト細胞において抑制されていた IgE 抗体に依存したヒスタミン遊離やサイトカイン産生などの機能は、FcεRI α 鎖の発現が特異的に抑制されていることを明らかにした。この FcεRI α 鎖発現低下はサイトカインや培養環境に反応するものではなく、臍帯血造血幹細胞の段階で決定づけられていた。このような臍帯血造血幹細胞レベルでの機能低下は T 細胞の転写因子である NFAT などでも認められており、新生児期における免疫抑制機能の一つであると考えられた。臍帯血由来マスト細胞と末梢血由来マスト細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、FcεRI α 鎖の臍帯血由来マスト細胞における発現低下は非常に特異性の高いものであることが明らかになった。そのほかの特異的に発現低下している転写因子等のメカニズムを検討することにより、将来的に FcεRI α 鎖の発現を特異的に抑制するする薬剤の開発への道が開けるものと期待される。

5. まとめ

正常ヒト末梢血からマスト細胞を大量に誘導する方法を開発した。この方法により培養した成人造血幹細胞由来マスト細胞と臍帯血造血幹細胞由来マスト細胞の性質を比較検討した。その結果、臍帯血由来マスト細胞では高親和性 IgE 受容体(FcεRI)の発現が特異的に低く抑制されていることが明らかになった。

6. 研究発表

- (1) Fukagawa K, Nakajima T, Saito H, Tsubota K, Shimmura S, Natori M, Hirai K: IL-4 induces eotaxin production in corneal keratocytes but not in epithelial cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121 (2):144-150, 2000.
- (2) Matsuda K, Katsunuma T, Iikura Y, Saito H, Akasawa A: Adreno-cortical function in patients with severe atopic dermatitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85:35-39, 2000.
- (3) Tachimoto H, Ebisawa M, Hasegawa T, Kashiwabara T, Ra C, Bochner BS, Miura K, Saito H: Reciprocal regulation of cultured human mast cell cytokine production by IL-4 and IFN-γ. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106(1):141-149,2000.
- (4) Ahn K, Takai S, Pawankar R, Kuramasu A, Ohtsu H, Kempuraj D, Tomita H, Matsumoto K, Akasawa A, Miyazaki M, Saito H: Regulation of chymase production in human mast cell progenitors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106(2):321-328,2000.
- (5) Akaiwa M, Yu B, Umeshita R, Terada N, Suto H, Ohshima K, Koga T, Arima K, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Furue M, Hamasaki N, Izuhara K: Localization of human interleukin-13 receptor in non-hematopoietic cells. *Cytokine* 13(2):75-84, 2001.
- (6) Iida M, Matsumoto K, Tomita H, Nakajima T, Akasawa A, Ohtani NY, Yoshida NL, Matsui K, Nakada A, Sugita Y, Shimizu Y, Wakahara S, Nakao T, Fujii Y, Ra C, Saito H: Selective down-regulation of high affinity IgE receptor (FcεRI) α-chain messenger RNA among transcriptome in cord blood-derived versus adult peripheral blood-derived cultured human mast cells. *Blood* 97(4):1016-1021,2001.
- (7) Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T. Identification of the protein product of the Coch gene (hereditary deafness gene) as the major component of bovine inner ear protein. *Biochim Biophys Acta.* 1535(3):258-265,2001.
- (8) Pawankar R, Yamagishi S, Yagi T. Revisiting the roles of mast cells in allergic rhinitis and its relation to local IgE synthesis. *Am J Rhinol.* 14(5):309-317,2000.
- (9) Akimoto R, Pawankar R, Yagi T, Baba S. Acquired and congenital cholesteatoma: determination of tumor necrosis factor-α, intercellular adhesion molecule-1, interleukin-1-α and lymphocyte functional antigen-1 in the inflammatory process. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 62(5):257-265,2000.
- (10) Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, Fujisawa T, Pawankar R, Sano Y, Ohta K, Ishii A, Morita Y, Yamamoto K, Matsushima K, Yoshie O, Hirai K. Inducible expression of a

Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 165(4):2205-2213,2000.

(11) Ikezono T, Tomiyama S, Pawankar R, Jinnouchi K, Suzuki Y, Yagi T. Passive transfer of experimental autoimmune labyrinthitis. *Audiol Neurootol.* 5(5):292-299,2000.

(12) Saji F, Nonaka M, Pawankar R. Expression of RANTES by IL-1 β and TNF- α stimulated nasal polyp fibroblasts. *Auris Nasus Larynx.* 27(3):247-252,2000.

(13) Pawankar R. $\gamma\delta$ T cells in allergic airway diseases. *Clin Exp Allergy.* 30(3):318-323,2000.

Table 1. Mediators release from mast cells (MCs) by IgE-dependent / -independent stimuli.

	Treatment	CB-derived		PB-derived		<i>p</i> value
			<i>n</i>		<i>n</i>	
Histamine Release (%)	IgE	1.7±0.6	4	16.1±2.4	9	<0.01
	IgE+IL-4	9.5±3.3	4	38.9±5.2	9	<0.01
	A23187*	71.1±4.1	4	80.8±2.9	4	n.s.†
IL-5 (pg/10 ⁶ MCs)	IgE	1.5±0.4	14	14.3±7.8	6	n.s.‡
	IgE+IL-4	30.8±5.4	14	215.2±85.9	6	<0.005
GM-CSF (ng/10 ⁶ MCs)	IgE	0.06±0.01	15	1.94±0.93	6	<0.001
	IgE+IL-4	0.58±0.06	15	14.00±3.54	6	<0.001

Cord blood (CB)-derived MCs or peripheral blood (PB)-derived MCs were pretreated with 1 µg/mL IgE or IgE +10 ng/mL IL-4 for 48 h. After washing, the cells were challenged with 1.5 µg/mL rabbit anti-human IgE antibody for 30 min (histamine release) or 24 h (IL-5 and GM-CSF). Each value represents an average ± SEM of the net value (specific value-spontaneous value). Experiment number (n) was 4-15 as indicated.

*Some of the cells were challenged with ionophore A23817 for histamine release.

†Not significant.

‡It was judged as “not significant”, since even PB-derived MCs sometimes failed to produce IL-5 at the detectable levels.

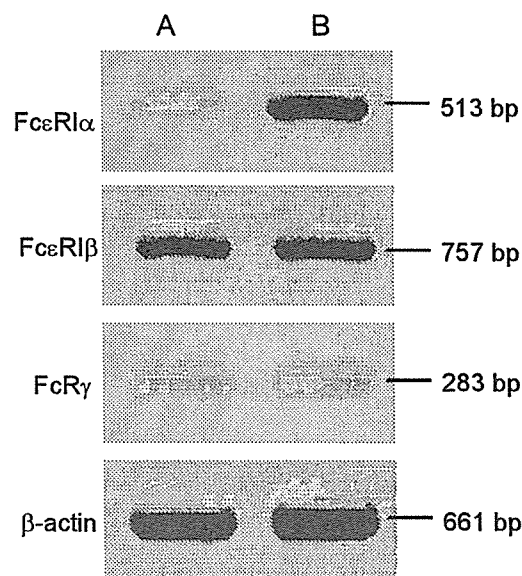


Figure 1. Expression for α , β and γ chains of Fc ϵ RI mRNA by RT-PCR. Representative results of RT-PCR analysis for α , β and γ chains of Fc ϵ RI and β -actin mRNA were shown. PB-derived MCs (B) expressed more α chain but not β and γ chains than CB-derived MCs (A). The density and area of these blots were quantitatively determined by using NIH Image software version 1.62. The expression ratio of Fc ϵ RI α -to- β -actin in CB-derived MCs was 0.22 ± 0.03 (n=6), whereas that in PB-derived MCs was 1.76 ± 0.31 (n=3, $p < 0.05$), when the cells were pretreated for 48 h with IgE but not with IL-4. The ratios of Fc ϵ RI β -to- β -actin and FcR γ -to- β -actin in CB-derived MCs were respectively 0.16 ± 0.05 and 0.21 ± 0.03 (n=6). Those in PB-derived MCs were 0.21 ± 0.03 and 0.29 ± 0.04 (n=3, not significant). Similar results were obtained in IL-4 primed MCs, although Fc ϵ RI α -to- β -actin ratio was enhanced by the cytokine in CB-derived MCs (0.55 ± 0.15 , n=6 $p < 0.05$).

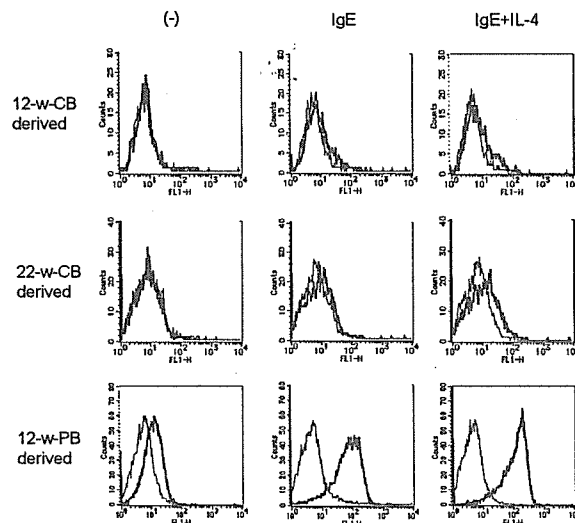


Figure 2. Cell surface expression of FcεRI α chain. The histograms represent 12-week-old PB-derived MCs (A, B, C), 12-week-old CB-derived MCs (D, E, F) and 22-week-old CB-derived MCs of the same batch with the 12-week-old MCs (G, H, I). These MCs were treated with SCF+IL-6-supplemented medium alone (A, D, G), treated with IgE (B, E, H) and treated with IgE + IL-4 (C, F, I) for 48 h. CB-derived MCs at >20 weeks of culture showed significantly less amount of FcεRI α chain when compared with PB-derived MCs. (MFI ratio at 1.00 ± 0.00 , 1.22 ± 0.05 and 1.97 ± 0.09 when they were untreated, treated with IgE and treated with IgE + IL-4, respectively. $n=3$, cf. Table 3).

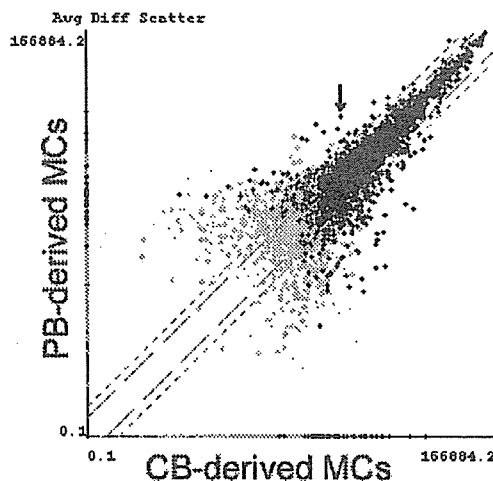


Figure 3. Comparative analysis of gene expression in PB-derived MCs and CB-derived MCs. CB-derived MCs and PB-derived MCs were primed with IL-4 for 6 h and examined for gene expression screening using GeneChip[®]. Average fluorescent differences of approximately 5,600 genes (7,129 probearrays) were scattered on the logarithmic graph according to the values obtained from PB-derived MCs (vertical) and CB-derived MCs (horizontal). Black crosses indicate transcripts judged to be present in at least either MC types and gray crosses indicate transcripts judged to be absence or marginal in both MC types. The FcεRIα mRNA (indicated with an arrow) was determined with Comparison Analysis software (Affymetrix) to be the 5th most increased transcripts in PB-derived MCs. Similar results were obtained in another experiment using IL-4-unprimed MCs.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社