

厚生労働科学研究研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

皮膚・気道・鼻粘膜局所におけるresidential cellによる生体防御機構のアレル
ギー疾患における役割の解析に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 小川 秀興

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総合研究報告	
皮膚・気道・鼻粘膜局所におけるresidential cellによる生体御機構の アレルギー疾患における役割の解析に関する研究 小川秀興	-----1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----14

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防治療研究事業）

総合研究報告書

皮膚・気道・鼻粘膜局所におけるresidential cellによる
生体防御機構のアレルギー疾患における役割の解析に関する研究

主任研究者 小川秀興

順天堂大学・学長・医学部皮膚科学講座・教授

研究要旨：

アトピー性皮膚炎、喘息、花粉症などでは、皮膚・気道・鼻粘膜における臓器・組織特異的な病態の形成が観察される。このような病態の形成には、白血球等の免疫系細胞による全身的な生体防御機構のほかに、それぞれの組織に固有なresidential cellによる局所的な生体防御機構／生理機構の関与が重要であると推測されるが、その実態はあまり明らかにされていない。我々は本研究で、皮膚、気道、鼻粘膜局所のresidential cellによる生体防御機構（あるいはその生理的機能）がアレルギー疾患の病態において果たす役割について明らかにする。

本研究によってアレルギー疾患における臓器／組織特異的な病態に対する理解が深まりアレルギー疾患に対する新規治療法の開発につながることを期待される。

本研究班では

- 1) 皮膚バリア機能を簡便に測定するため、リボフラビンを用いた経皮浸透量を指標とする非常に簡便な皮膚バリア機能測定法を開発しその妥当性について動物モデル、ヒト検体を用いて検討しその有用性について確認した。さらにいくつかの改良を加えることで、これまで測定困難な部位や湿潤部位などへの応用が可能となった。さらにこの手法を用いてダニ抗原の有するプロテアーゼ活性が自己浸透性により皮膚バリア機能の障害を誘導することができることを確認した。
- 2) グラム陽性菌の主要菌体成分であるペプチドグリカン(PGN)が Toll-like receptor2 を介して肥満細胞における脱顆粒や Th2 タイプの炎症性サイトカイン産生を惹起させることを明らかにした。この知見はアトピー性皮膚炎患者にしばしばみられる黄色ブドウ球菌感染の合併がアトピー性皮膚炎の病態を悪化させることについての分子的な基礎をはじめて明らかにするものである。またリポポリサッカライド(LPS)や内因性リガンドであるファイブロネクチンのフラグメントも TLR4 を介して肥満細胞を活性化しアトピー性皮膚炎や関節炎などの病態形成に関与する可能性を示した。
- 3) ヒト皮膚角化細胞や気管支上皮細胞、好酸球における TGF- β の主要な細胞内シグナル伝達系である Smad 分子のアレルギー疾患に関連する生体反応にかかわる多彩な役割についてインビトロならびにインビボの実験系を用いて明らかにした。
- 4) 皮膚血管内皮細胞に対して神経伝達物質ノルアドレナリンなどがケモカインや炎症性サイトカインの発現を亢進することを見だし、アトピー性皮膚炎の神経性の調節機構の存在が示唆された。
- 5) 気道上皮細胞における酸化ストレス応答が気管支喘息の病態に関係していること、とりわけ nitrotyrosine (NT) 産生量の測定は気管支喘息の診断あるいは重症度を評価する上での指標となり得ることが示された。

これらの結果は、皮膚・気道・鼻粘膜局所における上記のような生体防御機構／生理的機構がアレルギー疾患の病態形成において重要な役割を果たしている可能性を示唆するものでありアレルギー疾患の診断、病態の理解や新規治療法の開発にとって新たな洞察を加えるものである。

分担研究者

奥田峰広 花王株式会社安全性評価
研究センター主任研究員

坪井良治 東京医大皮膚科学講座教授

中尾篤人 山梨大学医学部免疫学講座教授

花沢豊行 千葉大学大学院医学研究院
耳鼻科学頭頸部腫瘍学講座講師

牛尾博子 順天堂大学医学部アトピー疾患
研究センター講師

A. 研究目的

外界に接する最前線である皮膚、気道、鼻粘膜局所においては、白血球等の免疫系細胞による全身的な生体防御機構の他に、それぞれの組織に固有な residential cell による生体防御システムが備わっている。アトピー性皮膚炎、喘息、花粉症で認められる皮膚気道鼻粘膜における臓器組織特異的な病態の形成には全身的な免疫系のみならず、そのようなそれぞれの組織に固有な residential cell による局所的な生体防御系の機能不全が、密接に関与していると考えられる。

以上の考えにもとづいて、我々は、本研究で、皮膚、気道、鼻粘膜局所の residential cell による生体防御機構/生理的機能ならびにその機能不全とアレルギー疾患の病態との関係について研究を行った。

本研究の概要は、1) 皮膚角化細胞の担う表皮バリア機能を測定するための新規検査法の開発ならびにそれを用いたアトピー性皮膚炎の病態に果たす表皮バリア機能の

役割の解析 (小川、奥田) 2) 気道上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞、皮膚角化細胞などの上皮系細胞機能とその機能不全がアレルギー疾患の病態に果たす役割の解析 (小川、中尾、花沢) 3) 皮膚血管内皮細胞機能とその機能不全がアレルギー疾患の病態に果たす役割の解析 (坪井) 4) 皮膚/気道/鼻粘膜に存在する肥満細胞/好酸球がアレルギー疾患に果たす役割の解析 (小川、牛尾、中尾) に大別される。

とりわけ本研究班では、これまでアレルギー疾患における免疫学的生体防御に関する研究に比べ、比較的研究が進んでいない皮膚角化細胞の担う表皮バリア機能とアレルギー疾患 (アトピー性皮膚炎) との関係について本研究期間内に、より重点的に解析しようとして試みた。そのためにまず簡便で信頼性の高い皮膚バリア機能に関する新規検査法を確立することを最も重要な研究目的とし、今回の研究班にてその開発、正確性、普遍性を確認した。臨床あるいは基礎研究の現場で容易かつ簡便、さらに信頼性よくヒトやマウスの皮膚バリア機能を測定する方法はこれまで皆無であり、本研究によって得られた新手法は、今後、基礎研究者だけでなく、アレルギーの臨床家にとって、表皮バリア機能の改善を治療の指標とするような患者治療への新しい視点を導入する有益なものになることが期待される。

B. 研究方法

1) (皮膚バリア機能とアトピー性皮膚炎/ダニ抗原)

主任研究者小川は分担研究者奥田らと共同で、

非免疫学的生体防御機構の一部である皮膚、気道、鼻粘膜局所における皮膚粘膜バリア機能が、アレルギー反応において果たす役割について解析した。そのためにまず皮膚粘膜バリア機能を簡便かつ正確に測定するための手法の開発に着手した。皮膚粘膜バリア機能を正確に測定するための手法としては、放射性標識化合物を用いた経皮吸収率測定や、非侵襲的手法としての経皮水分蒸散量測定等があるが、適応部位など臨床応用の面で困難な点もある。そこでまず、非侵襲的手法を用いた皮膚粘膜バリア機能の測定法を開発を行い、アレルギー反応の部位差解析を行うこととし、侵襲のより少ない手法として、ビタミンB₂であるリボフラビンの経皮吸収量を元に皮膚バリア機能を測定する手法を開発した。この手法は、リボフラビンを用いることで放射性標識化合物に匹敵する検出感度を利用し、かつ測定対象への影響が少ない測定法であると考えられた。研究初年度（平成14年度）、この手法を開発し、次年度、最終年度においてこの手法の妥当性、応用性について検討した。妥当性の検討として、誘発乾燥性皮膚炎および乾燥性皮膚炎、アトピー性皮膚炎患者の無疹部にリボフラビン水溶液を貼付し、テープstripping法を用いて回収した角層中のリボフラビン量を定量することで角層バリア破壊の程度を測定した。またこの手法を応用した基礎的な研究として、ブタおよびマウス等の皮膚にダニ抗原溶液を単回もしくは累積塗布し、塗布後のバリア機能の経時的変化を測定した。

2) (上皮系細胞/間葉系細胞とアレルギー

性疾患)

主任研究者小川は分担研究者中尾、花沢らと共同で、気道（肺）上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞、皮膚角化細胞などの上皮系細胞機能と皮膚線維芽細胞などの間葉系細胞機能ならびにそれら細胞の機能不全がアレルギー疾患の病態に果たす役割について解析した。初年度から最終年度にかけてアレルギー疾患局所に過剰に発現しているサイトカインの1つであるTGF- β の皮膚角化細胞や気道上皮細胞に及ぼす作用についてのインビトロでの解析、炎症性サイトカインならびに外因性の酸化ストレス（過酸化水素）が鼻粘膜上皮からのNO産生に及ぼす影響、さらに実際の喘息患者さんの肺生検サンプルを用いたTGF- β シグナルの活性化と喘息の気道リモデリングの関係についての解析、TGF- β シグナルが線維芽細胞機能、皮膚リモデリング（創傷治癒）に果たすおける役割について検討した。次年度にはTNFファミリーの分子の1つであるTWEAKが気道（肺）上皮細胞、皮膚角化細胞などに与える作用についてもインビトロで解析した。

3) (皮膚血管内皮細胞とアトピー性皮膚炎)
分担研究者坪井は、皮膚血管内皮細胞のアレルギー性炎症における役割について解析を行った。

研究初年度にアトピー性皮膚炎病変部におけるノルアドレナリン濃度を健常人に比較し、さらにノルアドレナリンの皮膚微小血管内皮細胞における炎症性サイトカイン産生への影響についてインビトロで解析した。次年度はin vivoの実験として、アトピー性皮膚炎患者に対し半導体低出力レーザーによる星状神

経節近傍照射を実施し、アセチルコリン、メサコリン、vasoactive intestinal polypeptide

(VIP)の皮膚反応に対する影響を検討した。

さらに最終年度は、ヒト皮膚血管内皮細胞だけを純粋培養し、炎症性サイトカイン刺激下でのケモカイン遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて解析し、大血管系のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)の遺伝子発現と比較した。

4) (皮膚粘膜に局在するマスト細胞の細菌成分による活性化とアトピー性皮膚炎)

主任研究者小川は分担研究者牛尾、中尾らと共同で、皮膚/気道/鼻粘膜に存在する肥満細胞がアレルギー疾患に果たす役割について解析した。本研究期間すべてにおいてマウスの骨髄由来培養マスト細胞/腹腔内マスト細胞/皮膚粘膜マスト細胞における Toll-like receptor (TLR) の発現とその機能、ならびにアレルギー性反応との関係についてインビトロ、インビボ (マウス) 実験系を用いて総合的に解析した。さらに最終年度は、炎症性細胞と皮膚、気道、鼻粘膜局所の residential cell との相互作用について解析するため、まず好酸球が気道上皮細胞や線維芽細胞が産生する TGF- β に対してどう応答するか検討するため好酸球における TGF- β 細胞内シグナル伝達経路についてもインビトロで解析した。

(倫理面への配慮)

アレルギー疾患モデル動物を用いる実験は、動物擁護に対するヘルシンキ宣言や各大学・研究機関における動物取り扱い規定に準じて行った。ヒトアレルギー患者検体を用いる場合は各大学・研究機関の倫理委員会による承

認・インフォームドコンセントによる患者同意のもとに検体を各種実験に供与した。

C. 研究結果

1) (皮膚バリア機能とアトピー性皮膚炎/ダニ抗原)

主任研究者小川は分担研究者奥田らと共同で、我々はリボフラビンの経皮吸収量を元に皮膚バリア機能を測定する有用で簡便な皮膚バリア機能の測定法を開発した。この方法はヒト皮膚を用いた検討によって従来の経皮水分蒸散量測定法と比してもほぼ同等の感度であることが明らかになった。ブタおよびマウス等の皮膚にダニ抗原溶液を単回もしくは累積塗布し、塗布後のバリア機能の経時的変化を測定する検討においても、ダニ抗原が皮膚バリア機能を障害することがこの方法によっても確かめられた。

2) (上皮系細胞/間葉系細胞とアレルギー性疾患)

上皮系細胞/間葉系細胞が TGF- β によって受ける作用について検討し、TGF- β が皮膚角化細胞によるケモカイン産生に対して強い抑制活性をもつこと、TGF- β シグナルの気道上皮細胞、線維芽細胞における活性化が喘息の気道リモデリングに関与していることを明らかにした。TGF- β の細胞内シグナル分子である Smad3 が皮膚のリモデリングに関与していることを明らかにした。酸化ストレスとアレルギー疾患の関係については、炎症性サイトカインあるいは外因性の oxidative stress が鼻粘膜上皮において nitrotyrosine(NT)を生じさせこのニトロ化によりサイトカイン産生能

が増強することを見いだした。さらに実際にどの程度の NT がアレルギー性鼻炎および喘息患者において産生されているかを評価し、疾患の重症度との関連について検討したところ呼気蒸気中の NT 濃度はステロイドを使用していない軽症の喘息症例において有意に上昇していた。アレルギー性炎症の重症度の評価法として有用であることが示唆された。また TWEAK シグナルは皮膚角化細胞や気道上皮細胞に炎症性サイトカイン産生を誘導した。

3) (皮膚血管内皮細胞とアトピー性皮膚炎)

アトピー性皮膚炎病変部でノルアドレナリン濃度が健常人に比較して高値を示し、またノルアドレナリンは皮膚微小血管内皮細胞に作用して炎症性サイトカインの産生を増加させることを見出した。インビボにおける検討で半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射は、皮膚血管神経系を介してアトピー性皮膚炎患者に認められる遅延蒼白反応を抑制することが判明した。さらにヒト皮膚血管内皮細胞の炎症性サイトカイン刺激下でのケモカイン遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析したところ BEC では VEGF-C などが優位に発現し、リンパ管内皮細胞に発現する Prox-1 や podoplanin などは発現していなかった。BEC と HUVEC の両者において、CCL20, IL-8 は TNF- α 刺激下でのみ、MIG は IFN- γ 刺激下でのみ発現が亢進した。RANTES と MCP-2 は IFN- γ および TNF- α の同時刺激により発現が著明に亢進し、相乗作用を示した。GCP-2 は TNF- α 刺激下の HUVEC において発現がより亢進し、MCP-2 は IFN- γ 刺激下

の BEC において発現がより亢進した。

4) (皮膚粘膜に局在するマスト細胞の細菌成分による活性化とアトピー性皮膚炎)

マウスの骨髄由来培養マスト細胞/腹腔内マスト細胞には各種の Toll-like receptor (TLR) が発現しており、グラム陽性/陰性細菌由来の菌体成分が皮膚局所の肥満細胞を TLR を介して活性化し、脱顆粒、サイトカイン産生を誘導し、アレルギー反応を増強することが明らかになった。さらに TLR シグナルに関与する MD-2 分子も同様の作用をもつことが確認された。この研究をさらに進め、マスト細胞は病原微生物由来の物質に加えて、内因性リガンドであるファイブロネクチンのフラグメントにより TLR を介して活性化され、リウマチなどの病態に関与していることも明らかにした。これら一連の研究は、J Clin Invest, J Immunol などの雑誌に報告され、TLR を介したマスト細胞の感染防御における役割を明確に示したものとして高い評価を得ており、本研究班の誇るべき成果の 1 つである。

D. 考察

1) (皮膚バリア機能とアトピー性皮膚炎/ダニ抗原)

リボフラビンによるバリア機能測定法により、簡便にヒト/マウスにおける皮膚バリア機能が測定可能となった。皮膚や粘膜部位差についての検証が容易となり、また湿潤部位などへの応用が可能となった。

さらにダニ抗原の自己浸透性により健常皮膚においても、皮膚バリア機能の障害を誘導することができることが確認でき、アトピー性

皮膚炎発症および増悪の一因である可能性が示唆された。

2) (上皮系細胞/間葉系細胞とアレルギー性疾患)

上皮系細胞/間葉系細胞が TGF- β によって受ける作用は、喘息の気道リモデリングシグナルとして働いている可能性がある。また TGF- β の細胞内シグナル分子である Smad3 は、アトピー性皮膚炎の苔せん化病態の成立に寄与していることが示唆される。したがって TGF- β シグナル経路は喘息やアトピー性皮膚炎治療の重要な標的経路の1つである。また酸化ストレスは、アレルギー性炎症の成立に関与しており、呼気蒸気中の NT 濃度はアレルギー性炎症の重症度の評価法として有用であることが示唆された。さらに TWEAK は従来の Th2 サイトカインや炎症性サイトカインとは別に、アレルギー性炎症の成立に関与する重要なサイトカインである可能性が示唆され、新たなアレルギー性炎症理解への視点を与えるかもしれない。

3) (皮膚血管内皮細胞とアトピー性皮膚炎)

皮膚血管内皮細胞は神経伝達分子やサイトカインによって活性化され、様々な炎症性サイトカイン/ケモカインを産生する。アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患では、神経伝達分子や活性化された単核球より分泌された IFN- γ や TNF- α などによって皮膚血管内皮細胞のケモカインの発現が亢進し、これらのケモカインが白血球の皮膚への遊走に重要な役割を担っていることが示唆される。皮膚血管内皮細胞はアトピー性皮膚炎治療の重要な

ターゲット細胞の1つである。

4) (皮膚粘膜に局在するマスト細胞の細菌成分による活性化とアトピー性皮膚炎)

黄色ブドウ球菌がアトピー性皮膚炎の増悪因子であることの分子的基盤は、皮膚局所肥満細胞が黄色ブドウ球菌によって TLR シグナル分子を介して活性化され脱顆粒応答やサイトカイン産生をする結果である可能性が示唆された。

E. 結論

皮膚・気道・鼻粘膜それぞれの局所における上記のような新たに見いだされた生体防御機構/生理的機構が、アレルギー疾患諸相の病態形成において重要な役割を果たしている可能性や、ダニ抗原などの環境因子によるそれら生体防御機構の障害がアレルギー性疾患の発症につながる可能性があることが本研究によって示唆された。これらの結果はアレルギー疾患の理解に新たな視点を供与するものである。具体的研究項目における結論は以下に記す。

(皮膚バリア機能とアトピー性皮膚炎/ダニ抗原)

皮膚バリア機能を簡便に測定するための手法を開発できた。この手法は臨床ならびに基礎的研究に有効であり今後の発展が期待される。

(上皮系細胞/間葉系細胞とアレルギー性疾患)

皮膚気道粘膜局所のresidential cellにおけるTGF- β シグナル経路、酸化ストレス経路、TWEAKシグナル経路といった従来のアレルギー研究においてはあまり言及されていなかった

た経路がアレルギー性炎症やリモデリングの成立に関与することを示すことができた。

(皮膚血管内皮細胞とアトピー性皮膚炎)

皮膚血管内皮細胞のアトピー性皮膚炎における重要性をインビトロならいびにインビボの研究で示唆することができた。また皮膚血管内皮細胞だけを用いた DNA マイクロアレイ解析を世界に先駆けて行うことができた。

(皮膚粘膜に局在するマスト細胞の細菌成分による活性化とアトピー性皮膚炎)

黄色ブドウ球菌がアトピー性皮膚炎の増悪因子であることの分子的基盤について明らかにすることができた。この成果は、皮膚におけるアレルギー性炎症の特異的な性質について言及するものであり、本研究班の大きな目的の1つであるアレルギー性疾患の臓器特異性の機序の一端を示すものである。

以上のような本研究班のいくつかの研究成果は以下のような一流の国際的雑誌に公表され、それぞれの研究分野において先頭グループに位置しておりその独創性は高く評価されている。(皮膚粘膜に局在するマスト細胞の細菌成分による活性化とアトピー性皮膚炎)

J Clin Invest 109:1351, 2002, J Immunol 168:2603, 2002, BBRC 323:491, 2004 (上皮系細胞/間葉系細胞と喘息/アトピー性皮膚炎/花粉症) J Allergy Clin Immunol 110:249, 2002, J Allergy Clin Immunol 110, 873, 2002, J Dermatol Sci 30:173, 2002, Br J Dermatol 49:464, 2003, Br J Dermatol 148:829, 2003, BBRC 318:422, 2004, J Invest Dermatol 123:229, 2004, J Invest Dermatol 122:1175, 2004, BBRC 315:240, 2004) また

皮膚バリア機能とアトピー性皮膚炎研究における皮膚バリア機能を簡便に測定するための手法の開発は、臨床の現場でこれまで煩雑であった皮膚バリア機能の測定を容易に行うことを可能にした。この社会的/臨床医学的意義はきわめて大きいと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okuda M, Yoshiike T, Ogawa H. Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention, J. h Dermatological Science, 30:173-179, 2002
2. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. J Clin Invest 109:1351-1359., 2002.
3. Warnnissorn P, Nakao A, Suto H, Ushio H, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K, Ogawa H. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression in atopic dermatitis. Br J Dermatol 148:829-831., 2003.
4. Ushio H, Nakao A, Supajatura V, Miyake K, Okumura K, Ogawa H: MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN. Biochem Biophys Res Commun 323:491-498, 2004.
5. Ito K, Hanazawa T, Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM. Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. Biochem

- Biophys Res Commun 27:315(1):240-5, 2004.
6. Jin L, Nakao A, Nakayama M, Yamaguchi N, Kojima Y, Nakano N, Tsuboi R, Okumura K, Yagita H, Ogawa H. Induction of RANTES by TWEAK/Fn14 interaction in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122 :1175-1179, 2004.
7. Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 110:249-254, 2002
8. Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Fukuda T. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 110:873-878, 2002.
9. Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H, Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R, Ra C, Ogawa H: TGF- β 1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Clin Exp Allergy* 31:309-314, 2002
10. Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Tsuboi R, Okumura K, Ogawa H: TGF- β /Smad signaling inhibits IFN- γ and TNF- α -induced TARC (CCL17) production in HaCaT cells. *J Dermatol Sci* 31:53-8, 2003
11. Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Ogawa H: Exogenous Smad3 accelerates wound healing in a rabbit dermal ulcer model. *J Invest Dermatol* 123:229-236, 2004
12. Xu H, Okamoto A, Ichikawa J, Ando T, Tasaka K, Masuyama K, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakao A. TWEAK/Fn14 interaction stimulates human bronchial epithelial cells to produce IL-8 and GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* 318:422-427, 2004
13. 伊藤 友章, 加藤 雪彦, 茂田 江理, 辻 香, 齋藤 万寿吉, 坪井 良治, 古賀 道之: 低出力レーザー星状神経節近傍照射がアトピー性皮膚炎患者の神経伝達物質皮膚反応に及ぼす影響について. *日皮会誌* 114:35-41, 2004.
14. 花澤豊行, 佐内明子. 鼻アレルギーにおける気道過敏症の発現機序とリモデリングの関与. *アレルギー* 52(8~9):741, 2003.
2. 学会発表
- 1 光石幸市、高井敏朗、中村年伸、小川秀興；ダニ抗原タンパク：Derf1による表皮バリア機能の破壊作用について：第33回日本免疫学会
- 2 Supajatura, V., Ushio, H., Okumura, K., Ra, C., Akira, S., Ogawa, H.: TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND 4 OF MAST CELLS HAS DIFFERENT FUNCTIONAL RESPONSES IN ALLERGY AND INNATE IMMUNITY. A Symposium of Osaka University Medical School, Biology of Mast cells and Basophils, 2002年5月
- 3 牛尾博子、Supajatura, V.、中尾篤人、審良静男、奥村 康、 羅 智靖、小川秀興： *Staphylococcus aureus* 由来の peptidoglycan による Toll-like receptor (TLR)2 を介した マスト細胞の活性化、第 52 回アレルギー学

会、2002年11月

4 牛尾博子：Toll-like receptor とアレルギー、第53回日本アレルギー学会、教育講演、2003年10月

5 金龍，中尾篤人，中山雅文，坪井良治，小川秀興：

TWEAK/Fn14 は TGF- β 1 と共同して培養ヒトケラチノサイトの RANTES を誘導する 第29回日本皮膚科学会総会(2004.4.14-16)京都

6 牛尾博子、中尾篤人、三宅健介、奥村康、小川秀興：MD-2 is required for the full-responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN. 第33回日本免疫学会、2003年12月

G. 知的財産権の出願登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sampanthanarak P, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H.	The effect of antibacterial peptide human beta-defensin-2 on interleukin-18 secretion by keratinocytes.	J Dermatol Sci	37(3)	188-91	2005
Ito T, Nishiyama C, Nishiyama M, Matsuda H, Maeda K, Akizawa Y, Tsuboi R, Okumura K, and Ogawa H.	Mast cells acquire monocyte-specific gene expression and monocyte-like morphology by overproduction of PU.1.	J Immunol	174	376-383	2005
Hasegawa T, Nakao A, Sumiyoshi K, Tsuchihashi H, Ogawa H.	SB-431542 inhibits TGF- β -induced contraction of collagen gel by normal and keloid fibroblasts.	J Dermatol Sci	in press	in press	2005
Okamoto A, Kawamura T, Kanbe K, Kanamaru Y, Ogawa H, Okumura K, Nakao A.	Suppression of serum IgE response and systemic anaphylaxis in a food allergy model by orally administered high-dose TGF- β .	Int Immunol	in press	in press	2005
Kanamaru Y, Sumiyoshi K, Ushio H, Ogawa H, Okumura K, Nakao A.	Smad3 deficiency in mast cells provides efficient host protection against acute septic peritonitis.	J Immunol	in press	in press	2005
Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H, Nakao A.	Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction.	Kidney Int	66	597-604	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Jin L, Nakao A, Nakayama M, Yamaguchi N, Kojima Y, Nakano N, Tsuboi R, Okumura K, Yagita H, Ogawa H.	Induction of RANTES by TWEAK/Fn14 interaction in human keratinocytes.	J Invest Dermatol	12	1175-1179	2004
Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Ogawa H.	Exogenous Smad3 accelerates wound healing in a rabbit dermal ulcer model.	J Invest Dermatol	123	229-236	2004
Ito K, Hanazawa T, Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM .	Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. .	Biochem Biophys Res Commun.	27;315(1)	240-5	2004
Xu H, Okamoto A, Ichikawa J, Ando T, Tasaka K, Masuyama K, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakao A.	TWEAK/Fn14 interaction stimulates human bronchial epithelial cells to produce IL-8 and GM-CSF.	Biochem Biophys Res Commun	318	422-427	2004
Ushio H, Nakao A, Supajatura V, Miyake K, Okumura K, Ogawa H.	MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN.	Biochem Biophys Res Commun	323	491-498	2004
Komine-Kobayashi M, Chou N, Mochizuki H, Nakao A, Mizuno Y, Urabe T.	Dual role of Fcγ receptor in transient focal cerebral ischemia in mice.	Stroke	35	958-963	2004
Prapars M, Nakao A, Nakano H, Jin L, Ogawa H.	Expression of phosphorylated Smad2 in normal human epidermis.	J Dermatol Sci	34	54-55	2004
Sugita T, Tajima M, Amaya M, Tsuboi R, Nishikawa A.	Genotype analysis of Malassezia restricta as the major cutaneous flora in patients with Atopic dermatitis and healthy subjects.	Microbiol Immunol	48	755-759	2004
Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A.	A new yeast, Malassezia yamatoensis, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects.	Microbiol Immunol	48	579-583	2004
Furuse Y, Hashimoto N, Maekawa M, Toyama Y, Nakao A, Iwamoto I, Sakurai K, Suzuki Y, Yagui K, Yuasa S, Toshimori K, Saito Y	Activation of the Smad pathway in glomeruli from a spontaneously diabetic rat model, OLETF rats	Nephron Exp Nephrol	98	100-108	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawashima M, Hayashi N, Igarashi A, Kitahara H, Maeguchi M, Mizuno A, Murata Y, Nogita T, Toda K, Tsuboi R, Ueki R, Yamada M, Yamazaki M, Matsuda T, Natsumeda Y, Takahashi K, Harada S.	Finasteride in the treatment of Japanese men with male pattern hair loss.	Eur J Dermatol	14	247-254	2004
Warnnissorn P, Nakao A, Suto H, Ushio H, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K, Ogawa H.	Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression in atopic dermatitis.	Br J Dermatol	148	829-831	2003
Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Tsuboi R, Okumura K, Ogawa H.	TGF- β /Smad signaling inhibits IFN- γ and TNF- α -induced TARC (CCL17) production in HaCaT cells.	J Dermatol Sci	31	53-58	2003
Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H.	Up-regulation of interleukin-13 receptor alpha1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis.	J Dermatol Sci	33	31-40	2003
Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A	Description of a new yeast species, Malassezia japonica, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects.	J Clin Microbiol	41	4695-4699	2003
Sugita T, Saito M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Takeuchi S, Nishikawa A.	The basidiomycetous yeasts Cryptococcus diffluens and C.liquefaciens colonize the skin of patients with atopic dermatitis.	Microbiol Immunol	47	945-950	2003
Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H, Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R, Ra C, Ogawa H.	Transforming growth factor- β 1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.	Clin Exp Allergy	31	309-314	2002
Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H.	Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity.	J Clin Invest	109(10)	1351-9	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H.	Cutting Edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines.	J Immunol	168	2603-2607	2002
Okuda M, Yoshiike T, Ogawa H.	Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention.	J Dermatol Sci	31	173-179	2002
Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A.	Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma.	J Allergy Clin Immunol	110	249-254	2002
Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Fukuda T.	Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with asthma.	J Allergy Clin Immunol	110	873-878	2002
Nakao A, Okumura K, Ogawa H.	Smad7: a new key player in TGF- β -associated disease.	Trends in Molecular Medicine (Formerly; Mol. Med. Today)	8	361-363	2002



ELSEVIER

LETTER TO THE EDITOR

The effect of antibacterial peptide human β -defensin-2 on interleukin-18 secretion by keratinocytes

KEYWORDS

Keratinocyte;
Human antibacterial
peptide;
 β -Defensin;
Interleukin-18

A large number of antimicrobial peptides have been identified in humans, and among them human β -defensins (hBD), mainly produced by epithelium, have been well characterized. These peptides exhibit their killing activities against bacteria, fungi and certain viruses [1]. Among the hBD, hBD-2 that was originally isolated from psoriatic skin, is the most investigated human antibacterial peptide. In the skin, hBD-2 is produced by keratinocytes, the key cells involved in the cutaneous immunological network and the pathological changes of several skin diseases by producing abundant cytokines including interleukin (IL)-18. hBD-2 plays a crucial role in host defense under infectious and inflammatory conditions, and its expression increases in certain skin diseases such as psoriasis and atopic dermatitis (AD) [1]. Besides its bactericidal properties, we have recently reported that hBD-2 also activates mast cells and neutrophils [2,3].

IL-18, an interferon- γ inducer, is a pro-inflammatory cytokine generated by skin cells such as keratinocytes, macrophages, dendritic and Langerhans cells. IL-18 was originally considered as a Th1 cytokine acting through its ability to induce IFN- γ production, and its expression is highly enhanced in psoriasis [4]. However, recent studies have indicated a more complicated pleiotropic role for IL-18 than simply induction of IFN- γ production, and IL-18 was reported to induce the production

of IgE and Th2 cytokines [4]. IL-18 was also recently found to be associated with the pathogenesis and severity of atopic dermatitis [5].

Since hBD-2 and IL-18 are generated by keratinocytes, and because they are both involved in psoriasis and atopic dermatitis, we hypothesized that they could interact with keratinocytes. Thus, the goal of this study was to investigate the interaction between keratinocytes, hBD-2 and IL-18 by evaluating the effect of hBD-2 on IL-18 secretion by keratinocytes.

Immortalized human keratinocyte cell line, HaCaT were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS and antibiotics, and were passaged or stimulated at 60–70% subconfluence. Cells were stimulated with hBD-2 (Peptide Institute, Osaka, Japan), and the concentration of IL-18 in the culture supernatants was measured by ELISA (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) according to the manufacturer's instructions. In some experiments, to investigate the role of caspase-1 in IL-18 secretion, cells were incubated with the caspase-1 inhibitor (Ac-YVKD-CHO, Peptide Institute) before stimulation with hBD-2. The caspase-1 enzymatic activity was determined by using a caspase-1 colorimetric assay kit (Research and Development Systems, Minneapolis, MN). The IL-18 mRNA expression was analyzed by RT-PCR and the expression of pro-IL-18 protein was determined by Western blot analysis. The statistical analysis was performed using Student's *t*-test, and $p < 0.05$ was considered to be significant. The results are shown as mean \pm standard deviation (S.D.).

As can be seen on Fig. 1A, the incubation of HaCaT with 10 μ g/ml of hBD-2 for 1–48 h resulted in significant IL-18 secretion at 1, 3 and 6 h ($p < 0.05$), before decreasing gradually. Furthermore, the secretion of IL-18 induced by hBD-2 was found to be dose-dependent as shown on Fig. 1B. The contact sensitizer dinitrochlorobenzene (DNCB) was used as a positive control [6]. In contrast, 1–20 μ g/ml hBD-1, hBD-3 and human cathelicidin LL-37, an antimicrobial peptide also expressed in keratinocytes during inflammation, could not induce IL-18 secretion

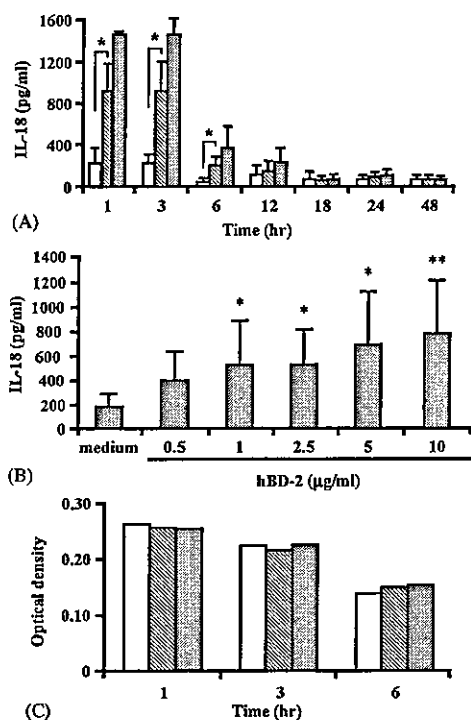


Fig. 1 Effects of hBD-2 on IL-18 secretion and caspase-1 enzymatic activity. (A) HaCaT cells were stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ hBD-2 (hatched bars) or 0.001% DNCB (closed bars) for 1 to 48 h, and the concentration of IL-18 in the supernatants was determined by ELISA. Values are compared between stimulated and non-stimulated cells (open bars). * $p < 0.05$. Each bar represents the mean \pm S.D. of five separate experiments. (B) Furthermore, the dose-dependent experiment was performed by incubating cells with increasing doses of hBD-2 (0.5–10 $\mu\text{g/ml}$), and the amounts of IL-18 secretion in the supernatants were determined by ELISA. Values are compared between stimulated and non-stimulated cells (medium). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Each bar represents the mean \pm S.D. of five separate experiments. (C) The caspase-1 enzymatic activity assay was performed using caspase-1 colorimetric assay kit according to the manufacturer's instructions. Non-stimulated cells (open bars) or cells stimulated with hBD-2 (hatched bars) or 0.001% DNCB (closed bars) at indicated period were trypsinised, and 2×10^6 cells were lysed in 50 μl of cold lysis buffer. The cell lysate was incubated on ice for 10 min, centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 min, and then the supernatant was collected. A volume of 50 μl cell lysate was added to 2.5 mM DTT and 50 μl of caspase reaction buffer. Each sample was added with 40 μM caspase-1 substrate WEHD-pNA followed by a 2 h-incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$. The enzymatic activity of caspase-1 was monitored on a microplate reader using 405 nm wavelength. The data normalized to the negative control are shown as optical density.

by HaCaT at 1–48 h-incubation period (unpublished data).

As caspase-1 is required for cleavage of pro-IL-18 leading to the generation of mature IL-18, we next investigated the molecular mechanism underlying hBD-2-induced IL-18 secretion by performing the caspase-1 colorimetric assay, using specific substrate WEHD-pNA. The results revealed that hBD-2 could not increase the caspase-1 activity (Fig. 1C). To determine the role of caspase-1 in hBD-2-induced IL-18 secretion, cells were further treated with Ac-YVKD-CHO for 1 h before stimulation with hBD-2, and secreted IL-18 was analyzed by ELISA. As expected, Ac-YVKD-CHO could not suppress hBD-2-induced IL-18 secretion (data not shown). In addition, since caspase-1 is also responsible for the cleavage of pro-IL-1 β to generate a functional mature IL-1 β , we investigated whether hBD-2 could stimulate keratinocytes to generate IL-1 β . However, hBD-2 could not induce IL-1 β production (data not shown). Thus, one can suggest that hBD-2-induced IL-18 secretion by keratinocytes is unlikely mediated by caspase-1. Nakano et al. [7] have also reported that caspase-1 inhibitor could not inhibit IL-18 secretion from SpA-stimulated mouse keratinocytes. The same author has also shown that caspase-1 was not involved in IL-18 secretion by keratinocytes since caspase-1-deficient keratinocytes could secrete similar amounts of IL-18 as wild type keratinocytes. Up to date, the role of caspase-1 in keratinocytes is not well understood. Although caspase-1 has been demonstrated in human keratinocytes, it appears to exist in the unprocessed, biologically inactive form [8].

We next examined the effects of hBD-2 on the expression of IL-18 mRNA. As shown in Fig. 2A, IL-18 mRNA was constitutively expressed in keratinocytes, but its expression could not be increased upon the stimulation with hBD-2 at any incubation time period. This observation was consistent with a previous study showing that SpA, DNCB and pro-inflammatory mediators PMA and LPS induce IL-18 secretion by keratinocytes, but are unable to increase IL-18 mRNA expression [6,7]. It has been proposed that the inability to induce IL-18 mRNA in human keratinocytes may be partially due to the fact that the IL-18 gene possesses at least two promoters, one of which is constitutive in nature [9]. It seems that the inducible IL-18 promoter is inactive in human keratinocytes.

Furthermore, to elucidate whether hBD-2 may increase the expression of pro-IL-18 protein, cells were stimulated with hBD-2 and lysates were subjected to Western blot analysis. We detected a signal corresponding to the unprocessed form of IL-18 (24 kDa), and its expression level was not significantly changed following the stimulation with

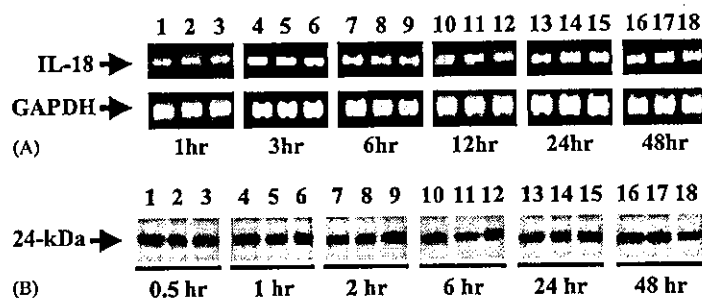


Fig. 2 mRNA expression of IL-18 and protein expression of pro-IL-18. (A) Total RNA (3 µg) isolated from non-stimulated or stimulated cells for indicated time period was analyzed for expression of IL-18 mRNA by RT-PCR. The primers used were: IL-18 (836 bp), sense primer AGGAATAAAGATGGCTGCTGAAC, antisense primer, GCTCACCACAACCTCTACTCC; GAPDH (447 bp), sense primer ACCACAGTCCATGCCATCAC, antisense primer TCCACCACCCTGTGCTGTA. The PCR amplification was used for 20 cycles (1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C, and 45 s at 72 °C). Aliquots of PCR product were run on 1.5% agarose gels and then visualized by ethidium bromide staining. Lanes 1, 4, 7, 10, 13 and 16 are controls (medium alone); lanes 2, 5, 8, 11, 14 and 17 are 10 µg/ml hBD-2-stimulated samples, and lanes 3, 6, 9, 12, 15 and 18 are 0.001% DNCB-stimulated cells. Shown is one representative of five independent experiments. (B) Cells were stimulated with 10 µg/ml hBD-2 or 0.001% DNCB for 0.5–48 h, and the lysates were obtained by lysing cells in 40 µl lysis buffer (50 mM Tris–HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% NP 40). The amounts of total protein were determined by BCA Protein Assay (Pierce Chemical, Rockford, IL) and equal amounts of total protein from stimulated or non-stimulated cells were analyzed by Western blot. The cell lysates were separated by SDS-PAGE on 15% polyacrylamide gel onto Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA). The membrane was stained with anti-human pro-IL-18 antibody (Research and Development Systems) at 1:1000-dilution, visualized with ECL Plus Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Lanes 1, 4, 7, 10, 13 and 16 are controls (medium alone); lanes 2, 5, 8, 11, 14 and 17 are 10 µg/ml hBD-2-stimulated samples, and lanes 3, 6, 9, 12, 15 and 18 are 0.001% DNCB-stimulated cells. The size of pro-IL-18 is 24 kDa. Shown is one representative of five independent experiments.

hBD-2 for 0.5–48 h (Fig. 2B). Similar observation has been reported after exposure of human keratinocytes to several inflammatory cytokines [6].

Up to now, the mechanism of IL-18 production by keratinocytes remains unclear. Although it is generally known that pro-IL-18 is cleaved by caspase-1 to generate a biologically active IL-18, a recent study on human keratinocytes has suggested that these cells constitutively produce pro-IL-18, but are unable to process it [8], assuming another pathway for IL-18 production. Indeed, a caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages has been reported [10]. However, it is still unknown whether this pathway is involved in keratinocytes. Further study will be necessary to clarify the specific pathway involved in hBD-2-induced IL-18 secretion by keratinocytes.

In conclusion, the ability of hBD-2 to induce the secretion of IL-18 by keratinocytes suggests a new mechanism of the implication of human antibacterial peptides in innate and adaptive immunity, and their roles in the pathogenesis of certain skin diseases such as psoriasis and AD.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and

Technology, Japan, and Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University, Tokyo, Japan. Dr. Sampathanarak Pichai is supported by grants from Japan International Cooperation Agency (JICA).

References

- [1] Weinberg A, Krisanaprakomkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:399–414.
- [2] Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human β -defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* 2001;31:1066–75.
- [3] Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 2004;111:273–81.
- [4] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001;19:423–74.
- [5] El-Mezzein RE, Matsumoto T, Nomiyama H, Miike T. Increased secretion of IL-18 in vitro by peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2001;126:193–8.
- [6] Naik SM, Cannon G, Burbach GJ, Singh SR, Swertick RA, Wilcox JN, et al. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* 1999;113:766–72.

- [7] Nakano H, Tsutsui H, Terada M, Yasuda K, Matsui K, Yumikura-Futatsugi S, et al. Persistent secretion of IL-18 in the skin contributes to IgE response in mice. *Int Immunol* 2003;15:611–21.
- [8] Mee JB, Alam Y, Groves RW. Human keratinocytes constitutively produce but do not process interleukin-18. *Br J Dermatol* 2000;143:330–6.
- [9] Tone M, Thompson SA, Tone Y, Fairchild PJ, Waldmann HJ. Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol* 1997;159:6156–63.
- [10] Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, et al. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* 1999;11:359–67.

Pichai Sampantharak^{a,b}
François Niyonsaba^{b,*}
Hiroko Ushio^b
Isao Nagaoka^c
Sigaku Ikeda^a
Ko Okumura^d
Hideoki Ogawa^{a,b}

^a Department of Dermatology
Juntendo University School of Medicine, 2-1-1
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

^b Atopy (Allergy) Research Center
Juntendo University School of Medicine
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

^c Department of Host Defence and Biochemical
Research, Juntendo University School of Medicine
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

^d Department of Immunology, Juntendo University
School of Medicine, 2-1-1 Hongo
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

*Corresponding author. Tel.: +81 3 5802 1591
fax: +81 3 3813 5512

21 October 2004

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Mast Cells Acquire Monocyte-Specific Gene Expression and Monocyte-Like Morphology by Overproduction of PU.1¹

Tomonobu Ito,^{*§} Chiharu Nishiyama,^{2*} Makoto Nishiyama,[¶] Hironori Matsuda,[†] Keiko Maeda,^{*} Yushiro Akizawa,^{*||} Ryoji Tsuboi,[§] Ko Okumura,^{*†} and Hideoki Ogawa^{*‡}

PU.1 is a myeloid- and lymphoid-specific transcription factor that belongs to the Ets family. Recently, we found that overproduction of PU.1 in mouse bone marrow-derived hemopoietic progenitor cells induced monocyte-specific gene expression and caused their monocyte-like morphological change. In the present study, PU.1 was overproduced by using retrovirus expression system in differentiated bone marrow-derived mast cells. By overexpression of PU.1, cell surface expression of MHC class II, CD11b, CD11c, and F4/80 was induced, accompanied by reduced expression of *c-kit*, a mast cell-specific marker. Morphology of PU.1-transfected cells was altered toward monocyte-like one. PU.1-overproducing cells acquired T cell stimulatory ability and showed an increase in response to LPS stimulation, while response through FcεRI was markedly reduced by overproduction of PU.1. These results suggest that the differentiated mast cells still have potential to display monocytic features. When PU.1 was overproduced in a different type of mast cell, peritoneal mast cells, similar monocyte-like morphological change, and the expression of CD11b and F4/80 were induced. However, surface level of CD11c and MHC class II was not affected. These results indicate that the potential capacity to exhibit monocytic features is different between both the mast cells. *The Journal of Immunology*, 2005, 174: 376–383.

PU.1 is an Ets family transcription factor and involved in lymphoid and myeloid cell development and specific gene regulation. PU.1 is expressed in lymphoid cells, macrophages, dendritic cells (DC),³ neutrophils, and mast cells in a cell type-specific manner (1). The necessity of PU.1 for generation of these lineages was shown by PU.1 knockout mouse that abolishes macrophage and B cell production and delays neutrophil and T cell production (2–4). The requirement of PU.1 for the development of DC and mast cells was also recently revealed by the analyses using PU.1 knockout mouse (5–7). It was also reported that expression level of PU.1 determines cell fate between B cells/macrophages (8) and neutrophils/macrophages (9). In addition, recent analyses demonstrated that overexpression of PU.1 in CD34⁺ human myeloid progenitors triggers development of Langerhans cells (LC) (10, 11).

Recently, we found that overproduction of PU.1 in mouse bone marrow-derived hemopoietic progenitor cells developing toward mast cells induced the expression of several monocyte-specific genes and caused morphological change (12). In this study, we conducted overexpression of PU.1 by retrovirus transfection system in differentiated mast cells, mouse bone marrow-derived mast cells (BMMC), and peritoneal mast cells (PMC), and examined its effect on

the expression of monocyte- and mast cell-specific markers and the cell morphology. BMMC and PMC showed several monocytic characteristics by overproduction of PU.1, suggesting that PU.1 functions to promote monocyte-specific gene expression even in developed mast cells, and that developed mast cells still possess the potential capacity to exhibit several monocytic features.

Materials and Methods

Cells

A retrovirus packaging cell, Plat-E (13), was maintained in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 1 μg/ml puromycin (Sigma-Aldrich), and 10 μg/ml blasticidin (Funakoshi). To generate BMMC, bone marrow cells prepared from BALB/c (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) were grown in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 μM 2-ME, 10 μM MEM nonessential amino acids solution (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 10% pokeweed mitogen-stimulated spleen-condition medium (14). After 4-wk culture, >95% of cells were identifiable as mast cells by toluidine blue staining and as *c-kit*⁺/FcεRI⁺ by flow cytometric analysis. Mouse PMC was prepared from whole peritoneal cells by density-gradient centrifugation techniques using metrizamide (Sigma-Aldrich) with >98% purity (15), and was maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 10% pokeweed mitogen-stimulated spleen-condition medium, 20 ng/ml mouse recombinant stem cell factor (PeproTech), and antibiotics (penicillin and streptomycin). Bone marrow-derived DC (BMDC) was prepared according to previously reported method (16, 17), with some modifications. In brief, bone marrow cells prepared from BALB/c were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 100 μM 2-ME, 10 μM MEM nonessential amino acids solution, antibiotics, 10 ng/ml mouse rGM-CSF (PeproTech), and 10 ng/ml mouse rIL-4 (PeproTech). Peritoneal macrophages were obtained from BALB/c, as described previously (18). Briefly, peritoneal exudate cells were harvested from mice, which received i.p. 2 ml of 4% thioglycolate (Sigma-Aldrich) 4 days before, by peritoneal lavage with ice-cold PBS. After 1-h culture on a plastic dish, nonadherent cells were collected and used as peritoneal macrophages.

Plasmid construction

Plasmids, pMX-puro-PU.1 (12), and pMX-puro (19) were used to generate retrovirus vector to overproduce PU.1 tagged with 2× Flag at N terminus as per our previous reports (12, 20). The 2× Flag-tagged PU.1 cDNA sequence was isolated from pCR-2F-PU.1 (21) and subcloned into

*Atopy (Allergy) Research Center, †Department of Immunology, and ‡Department of Dermatology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan; §Department of Dermatology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan; ¶Biotechnology Research Center, University of Tokyo, Tokyo, Japan; and ||Advanced Research Laboratory, Hanno Research Center, Taiho Pharmaceutical, Saitama, Japan

Received for publication May 4, 2004. Accepted for publication November 1, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (to C.N.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Chiharu Nishiyama, Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8421, Japan. E-mail address: chinishi@med.juntendo.ac.jp

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; BMDC, bone marrow-derived DC; BMMC, bone marrow-derived mast cell; LC, Langerhans cell; PGN, peptidoglycan; PMC, peritoneal mast cell.