

ヒト・マウス炎症細胞におけるオルトログ遺伝子発現 関連データベース作成に関する研究

所属 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部
研究者 齋藤博久

分担研究者

- (1) 理研横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 岡山 吉道
(2) 三井情報開発株式会社・バイオサイエンス本部・研究開発部 青島 健

研究要旨 ヒトとマウスのマスト細胞を高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) を介した刺激し、網羅的遺伝子発現解析を行い、さらにオルソログ遺伝子発現関連データベースにより包括的な遺伝子発現を比較解析した。その結果、Fc ϵ RI の介在による CC ケモカインの誘導がヒトとマウスとの間で高度に保存されていることが証明された。

比較データベースのみならず関連分子の反応経路の比較データベースを作成することを達成目標としている

A. 研究目的

遺伝性疾患の原因遺伝子の特定にマウスなどのモデル動物は非常に有用である。しかしながら、アレルギーなどの多因子疾患に関しては、マウスなどのモデル動物を用いた研究成果とヒト疾患治療応用成果が一致しないことがある。アレルギー性炎症の動物モデルは、以前から有益な存在である。マウス喘息モデルの使用が増加してきたが、その主な理由は、疾患病態特異的な遺伝子を選択的にノックアウトすることができるためである。しかし、これらマウス喘息モデルの妥当性には議論がある。マウス喘息モデルには MBP のような好酸球顆粒成分の沈着による上皮傷害が存在しないことに、注意すべきである。

我々は、以前に他の種類の細胞と比較して、ヒトマスト細胞のトランスクリプトーム中における細胞種特異的な遺伝子発現をスクリーニングしている。その結果、トリプターゼ等の予想されたマスト細胞特異的タンパク質の発現遺伝子に混ざって、従来好酸球に特異的であると考えられていた major basic protein (MBP) が、ヒトマスト細胞に大量に発現していることが明らかになった。様々な組織より得られたマスト細胞は、その顆粒中に高レベルの MBP を有していることも確認された。DNA チップ技術のような包括的解析法を用いなければ、このような予測されない結果は得られていなかったであろう。

ゲノム科学の発展によりヒトのみならず、マウスの全ゲノムの解読が終了し、マウスとヒトの構造類似 (オルトログ) 遺伝子の情報が整理されつつある。本研究においては、マイクロアレイ (GeneChip) 技術、データベース情報を持ち、アレルギーなどの炎症に関与するヒトとマウスの各種白血球の刺激前後、薬剤負荷前後における全遺伝子発現定量を行い、オルトログ遺伝子発現

B. 研究方法

(1) ヒト臍帯血由来マスト細胞の培養方法

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。CD34 陽性細胞は Iscove 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。

(2) マウス骨髄由来マスト細胞の培養法

Balb/c マウス8週齢より骨髄を採取し、IL-3 と SCF の存在下で6週間培養し、マスト細胞を得た。

(3) マスト細胞の機能評価

得られた培養マスト細胞および好塩基球を骨髄腫由来ヒト IgE 5 μ g/ml 添加もしくは非添加の状態に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) で細胞を洗滌、 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 RI 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。また、培養マスト細胞を、100 ng/ml

ProbeID		Alfymetids207844_int	Alfymetids420092_c1
Locus Information			
[Location]			
Chromosome	5	11	
Band	Chr:5q31	Chr:11 29.0 cM	
[Gene]			
Symbol	IL13	IL13	
Name	Interleukin 13	interleukin 13	
GenBank	NM_002128	NM_008255	
UniProt	Ils_845	Mm_1284	
RefSeq	137583		
Ensembl		ENSG00000187641	
[Category]			
Carnitine 3-dehydrogenase-> Citrate (pro-3S)-lyase histolasease.			
Probe Information			
[Probe]			
Organism	Homo sapiens	Mus musculus	
Accession			
Version			
Library			
[Sequence]			

図1 プローブアノテーション詳細画面

まず、実験検索画面で、検索したい実験に絞り込み、実験検索結果一覧で検索対象実験を選択する(図2)。さらに比較プローブ検索画面で、選択した実験に対し、プローブIDや遺伝子名で絞り込み、比較プローブ結果を一覧表示させる。比較プローブ検索結果画面では、検索条件に適合したプローブ、及び、そのオルトログ遺伝子、さらにそれぞれが用いられている実験データの発現値が一覧表示される(図3)。また、プローブ詳細画面では、アノテーション情報(Probe情報、Locus情報、Categoryリスト情報、Protein情報)を表示する(図4)。

さらに、比較プローブ検索結果はcsvファイルに出力可能であり、同時に遺伝子発現解析ツールGeneSpringで用いる遺伝子マスター情報(MasterGeneTableファイル)もダウンロード可能となっている。

(3) Daily アノテーション更新機能

公共データベースからダウンロードしたファイルによるデータ整備では、情報量も膨大であり、完全なリアルタイムの情報更新は望めない。本機能では、注目するプローブを事前に登録しておき、これらのプローブについてはその配列をNCBIのBlast検索にかけ、データベースのアノテーション情報との相違があった場合のみ、データベースの内容を最新のアノテーション情報に更新する。また、更新された情報はメールで通知する機能も有する。更新結果は一覧にて確認することも可能であり、更新履歴も管理している。

(倫理面への配慮)

ヒト試料を使用した研究の実施に当たっては、「臨床試験に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号)」を遵守して行った。検討は

臨床検査の一環として行われた結果を医療記録から参照したものであり、倫理的問題はなかった。

C. 研究結果

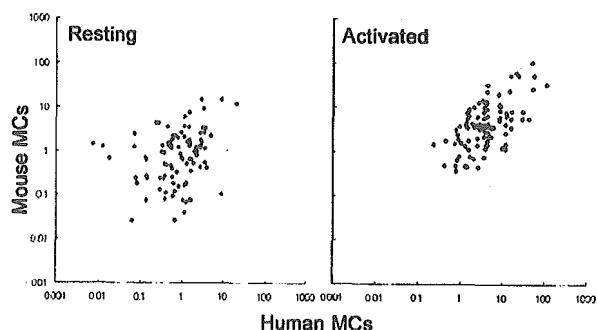
今回の解析に用いたオルソログ件数は以下の通りであった。

データ件数	各 GeneChip のプローブ件数
HG-U133A	22,283 件
MOE430A	22,690 件

オルトログ件数 (HG-U133A⇔MOE430A)

26,411 件

※今回用いた GeneChip (HG-U133A、MOE430A) についてのみの件数



ヒト(Human MCs)およびマウス(Mouse MCs)のマスト細胞をIgEで感作後、抗IgE抗体あるいは抗原で刺激し(activated)、遺伝子発現の変動を網羅的に検討した。その結果、IgE受容体を介した刺激により発現増加した遺伝子を調べたところ、いずれのマスト細胞においても23,000種類の遺伝子の中で、CCL1(I-309)、CCL2(MCP-1)およびCCL4(MIP-1β)のCCケモカインの遺伝子発現が上位10種類の中に存在していることを見いだした(上図)。CCL1はCCR8陽性の活性型Th2細胞の遊走因子である。また、CCL2、CCL4もヘルパーT細胞の遊走に関与するケモカインである。したがって、ヘルパーT細胞の選択的な遊走を刺激する作用はヒトおよびマウスのマスト細胞に選択的で重要な役割であることが確認された。また、これらのCCケモカインの様に種を超えてよく保存されている分子に関する研究は、マウスのマスト細胞のモデル細胞としての有用性は極めて高いことも確認できた。

一方、ヒトのマスト細胞で高発現しているPRG2(major basic protein)はマウスのマスト細胞では全く認められない等、いくつかの遺伝子発現がヒトとマウスマスト細胞で異なっていた。しかし、マスト細胞は培養条件や刺激条件によって、遺伝子発現プロフィールを大きく変化させる細胞であるので、その解釈は慎重にすべきであろう。

D. 考察

マウスのマスト細胞にのみ高度に発現してい

る分子の機能に関する研究は、ヒトにおける潜在的な機能に関して、慎重に解釈されなければならない。全ゲノムの発現に関する種間比較試験は、ヒトの病原の動物モデルから得られた実験データを解釈する際に有用である。

今年度のこれらの成果は当初予定していた本研究の達成目標を満たしているが、本研究の予算上の制限もあり、さらに本研究内容を発展させるため別の予算枠で実施することとし、今年度で終了することとした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima T, Iikura M, Okayama Y, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H: Identification of granulocyte subtype-selective receptors and ion channels by using a high-density oligonucleotide probe array. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:528-535.
2. Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y. FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(2):272-279.
3. Kashiwakura JI, Yokoi H, Saito H, Okayama Y. T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells. *J Immunol*. 2004; 173(8):5247-5257.
4. Kotani A, Okazaki I, Muramatsu M, Kinoshita K, Begum N, Nakajima T, Saito H, Honjo T.

A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(12):4506-4511.

2. 学会発表

1. Saito H, Nakajima T, Matsumoto K, Nagai H, Yamamoto T, Aoshima K. Comaparative database for the orthologous genes expressed by various human mouse inflammatory cell types. Symposium session 3 "Effector cells: mast cells". 25th Symposium of Collegium Internationale Allergologicum. Bornholm, Denmark, Aug. 24-30, 2004.
2. Saito H. Mast cell transcriptome. 14th Annual Symposium of Johns Hopkins Asthma & Allergy Center "Functional genomics of asthma". Baltimore, Maryland, USA. Nov. 12, 2004.
3. 斎藤博久. アレルギー・アトピー性疾患における遺伝子発現 第126回日本医学会シンポジウム「アレルギー・アトピー性疾患」 東京 6月24日, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし