

## 肥満細胞における免疫反応と微量元素の動態の解析

### Investigation of trace elements kinetics in mast cell during immune reaction

中島加珠子, 国村伸祐, 坪内美樹, 横山葉子, 程雷, 白川太郎

京都大学医学研究科 社会健康医学系専攻 健康要因学講座 健康増進・行動学分野

Kyoto University School of Public Health, Health Promotion and Human Behavior

微量元素は細胞の中において各種酵素の活性中心として重要な働きをしている。活性酸素産生過程における二価から三価への電荷の変化は生体防御においても働いている。我々はアレルギーと微量金属を介した酸化ダメージの相関をSRマイクロビームによって分析することを考えた。金属元素の分布は活性酸素の産生によって変化する。本研究では培養細胞系の肥満細胞においてその科学状態を分析することを目的とする。肥満細胞は免疫反応において重要な細胞の一つである。肥満細胞において抗原刺激や薬物刺激によって誘導される脱顆粒と各種元素集積との相関が示唆された。アレルギーに見られるIgE介在の反応の理解には、このような切り口の知見からの洞察もまた役立つと考えられよう。

Trace elements are important in the cell as active center of enzymes. Electric charge change between divalent and trivalent in the induction pathway of reactive oxygen, work in bio defense. We investigate the relation of allergy and oxidative damage by metallic elements using SR micro beam. Distribution of metallic elements changed by induction of ROS. Chemical state of transition metals in mast cell was studied in this study, using cultured mast cell line. Mast cell is one of important cells in immune reaction. The excessive accumulation of iron and its chemical state in mast cells are related to the degranulation leading to antigen or calcium ionophore stimulation. SRXRF spectroscopy results showed that the amounts of Ca in the cells exchange intracellular region in the results of degranulation. This finding might have implications for understanding the mechanisms involved in IgE mediated cell responses as seen in allergy.

#### 背景と研究目的

免疫反応時の細胞内における微量元素の分布とその役割については未知の部分が多い。感染症関係遺伝子としてMφに同定されたNramp Familyは二価金属の輸送体である。Nramp2は肥満細胞にも発現している。肥満

細胞にはアレルギーの指標でもあるIgE抗体の高親和性受容体が発現している。近年、肥満細胞においてIgE抗体によって細胞のapoptosisが抑制されるという知見(Immunity 2003;14:791-800)も得られた。apoptosisに関連する元素ではCa<sup>2+</sup>が有名である。Ca<sup>2+</sup>の動態

と共に細胞表面上のチャンネルも相互作用を行っている可能性がある。

2004A0008-NL3-np-Na における予備実験で、炎症反応である脱顆粒を誘導した肥満細胞中、抗原刺激と化学物質刺激状態との間に Fe の価数動態の相違が見られた。さらに IgE 刺激により各種元素の減少が確認され、チャンネルを介した各種金属元素の動態と炎症反応の相関が示唆された。複数の元素を同時に分析する事は炎症反応時の細胞表面受容体の相互作用の解明にも役立つと考えられよう。Nramp family だけでなくアレルギーの原因遺伝子を絞る事にも役立つと考えられる。

## 実験

培養細胞系の肥満細胞である LAD2 を検体として採用。無刺激の control, IgE 抗体による刺激, その後抗原を加え, IgE を架橋して脱顆粒を誘導させた細胞を, さらに PMA(phorbol myristate acetate: tumor promoter) と LPS(Lipopolysaccharide: グラム陰性桿菌の細胞壁外膜の表層構成成分, リポ多糖体) 刺激を入れた検体も作成した。添加量は全て  $1 \mu\text{g/ml}$  である。浮遊状態の細胞にビームを当てる事は技術的に難しい。測定基盤上で培養すると低密度において照射位置の精度の問題が生じる。本研究ではサイトスピンを用いて一様に

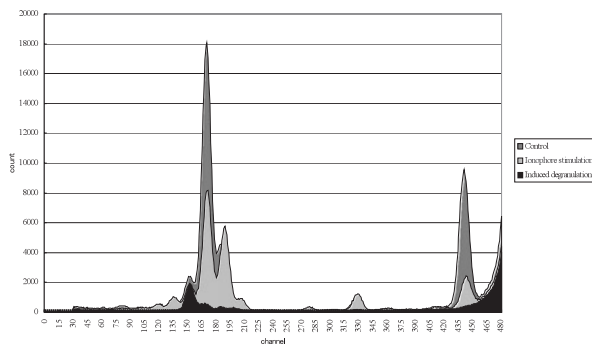


図 1. サンプル上の SRXRF のスペクトル

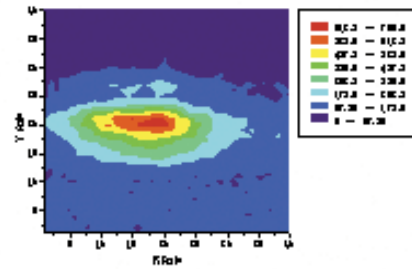


図 2-a. Distribution of Ca in control sample

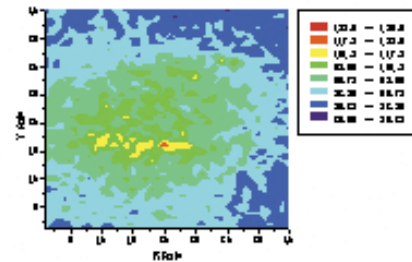


図 2-b. Distribution of Ca in degranulation(IgE+Antigen) sample

細胞を付着させた。SR 分析は各検体上を  $200 \mu\text{m}$  四方で粗 mapping を行い, その後 count の高い部位を中心に密 mapping を行った。

## 結果及び考察

LPS 刺激では分布には変化が見られなかったが, 含有量に減少がみられた。LPS は Ionomycin 同様脱顆粒を誘導すると考えられる為, 妥当な結果だと言えよう。IgE 刺激後は control と比較して Fe の集積, Ca 及び Zn の拡散が確認された。さらに IgE を架橋して脱顆粒を誘導すると Fe と Cu が増加した。Ionomycin を用いて強制的に膜に穴を開け, Ca の流動を促すと, Ca 以外の各種元素の流出も確認され, 予備実験の結果を再現することができた[図 1,2]。IgE 介在の脱顆粒と Ionophore による脱顆粒は細胞内での作用機序は大きく異なっていると考えられる。

## 今後の課題

前回問題となった count の低さはサイトス

ピンの利用によって克服した.細胞内機構の  
解明に迫るにはより高解像度でデータ取得が  
必須である.今回実施しなかった XAFS 分析  
の価数動態も追試が必要である.

### 参考文献

- [1] S.J.Galli, N. Engl. J. Med. **328** (1993) 257.
- [2] M.Plaut, et al, Nature **339** (1989) 64.
- [3] P.Bradding,et al,J.Immunol.**151**(1993) 3853.
- [4] S.Hayakawa, et al, J Synchrotron Radiat.  
2001;8(Pt 2):328.
- [5] K.Nakashima,et al,AIP Conf.Proc.**680**(2003)  
517.
- [6] P.Bradding,et al,J.Leukoc.Biol.**73**(2003) 614.

### 論文発表状況・特許情報

K. Nakashima, et al. 18th International  
Conference on the Application of Accelerators in  
Research and Industry CAARI 2004. University  
of North Texas, Department of Physics,Denton,  
Texas, USA, October 10-15, 2004. (口頭発表)

### キーワード

Allergy, IgE, immunity, trace element