PPAR と炎症反応：マスト細胞を中心に

前山 一隆, 恵美真以子, 千原 一泰

要約：PPAR はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内転写因子であり、脂肪や糖の代謝調節に重要な役割をもつことから、そのアゴニストはインスリン非依存性糖尿病の治療薬として開発されてきた。PPAR は炎症や免疫反応にも深く関わっており、特に単球/マクロファージにおける PPAR の発現と機能の解析が進んできた。PPAR はマクロファージにおいてサイトカイン産生を抑制的に調節していることが明らかとなり、マクロファージがその病態と深く関連していると考えられる関節リウマチや動脈硬化の治療に対し PPAR のアゴニストが新たな治療薬として考案されるに至った。マスト細胞は骨髄幹細胞由来の炎症細胞のひとつであり、即時型アレルギー反応を引き起こす主要な細胞であるが、PPAR に関する研究は極めて少ない。PPAR の内因性リガンドとして挙げられる 15-deoxy-^{12,14}prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) は PGD₂ の代謝物であり、マスト細胞が生体内における PGD₂ の主要な産生細胞であることから、マスト細胞に発現する PPAR は、増殖・分化ならびに炎症反応に深く関わっていることが予想される。本稿では PPAR のヘテロノックアウトマウスの培養骨髄細胞由来マスト細胞を用いて、マスト細胞における PPAR の機能を考察する。

1. はじめに

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内転写因子であり脂肪細胞において脂質代謝に関わるタンパク質の発現調節を行っている(1~3)。PPAR は骨髄由来細胞においても発現がみられ、特にマクロファージを

はじめとする炎症細胞に発現し細胞増殖やサイトカインの分泌調節を介して炎症反応の進展や免疫機構に関与していることがわかってきた。マスト細胞はマクロファージと同様、骨髄幹細胞を源とし、未成熟の状態では血流に入り、組織において成熟マスト細胞となり、即時型アレルギー反応において中心的な役割を果たすが、マクロファージと比べて PPAR に関する研究は極めて少ない。マスト細胞には PGD₂ 合成酵素が存在し、抗原刺激後に PGD₂ を産生、遊離しており、マスト細胞は生体内における PGD₂ の主要な産生細胞である。PPAR の内因性リガンドとして候補に挙げられる 15-deoxy-^{12,14}prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) は PGD₂ の代謝物であることからマスト細胞に発現する PPAR はマスト細胞自体の増殖、分化ならびに炎症反応に深く関わっていることが予想される。本稿では培養マウス骨髄由来マスト細胞 (mBMMCs) を用いて PPAR アゴニストによる増殖反応に及ぼす影響を検討し、PPAR ヘテロノックアウトマウスを用いて mBMMCs ならびに組織マスト細胞の機能を比較した。

2. PPAR の炎症におよぼす作用

PPAR は単球/マクロファージに発現し、サイトカインの産生を調節することが明らかとなり、炎症における PPAR の役割が提唱されてきた。チオグリコール酸処置により活性化されたマウス腹腔マクロファージには PPAR が発現しており、PPAR アゴニストが誘導型 NO 合成酵素、ゼラチナーゼ B やスカベンジャー受容体である SR-A の発現を抑制することが報告された(4)。またヒト単球を用いてホルボールエステル刺激による TNF- α 、IL-6、IL-1 などのサイトカイン産生が PPAR アゴニストにより用量依存性に抑制されることから PPAR の炎症抑制作用が示唆され、単球/マクロファージ系を用いた PPAR の役割に関する研究が進んできた(5)。これに比し、マスト細胞における PPAR の発現ならびにその機能を調べた報告は限られている。Sugiyama らがまず、mBMMC を用いて PPARs の発現とサイトカイン産生調節を明らか

キーワード：マスト細胞, PPAR, 15-deoxy-^{12,14}prostaglandin J₂, サイトカイン, ヒスタミン

愛媛大学医学部薬理学教室

(〒791-0295 愛媛県温泉郡重信町大字志津川)

e-mail: kazu@m.ehime-u.ac.jp

原稿受領日：2003 年 7 月 29 日, 編集委員会依頼総説

Development Pathways of Mouse Mast Cells

Fig. 1 Scheme of the differentiation pathway of mast cells. Mast cells derive from bone marrow stem cells and flow into blood stream in the immature condition. These immature mast cells start to differentiate to two kinds of mast cells, connective mast tissue mast cells and mucosal mast cells, after stimulation with stem cell factor (SCF) expressed on fibroblast cell membrane and IL-3 released from T lymphocytes.

にした(6). mBMMCにおいてPPAR α は発現しておらず, PPAR ()は構成的に発現している. PPAR は非刺激時ではわずかに発現しているが, 抗原ならびにCaイオノフォア刺激によりmRNAレベル, タンパク質レベルで4時間後に発現がピークとなる. ラット腹腔マスト細胞においても抗原, Caイオノフォア刺激によりPPAR のmRNAの発現が増加することを報告している. PPARの作用として, mBMMCを抗原刺激したときに生じるTNF- α やGM-CSF, IL-4, IL-5などのサイトカインの産生がPPARのアゴニストである15d-PGJ₂, troglitazoneやPPAR ()のアゴニストであるcarbaprostacyclinにより用量依存性に抑制される. 次にSugiyamaらはヒト培養マスト細胞の系を用いてPPARのmRNAとタンパク質レベルの発現がIgE受容体の凝集刺激あるいはCaイオノフォアとホルボールエステルEの共刺激により増強することを報告した(7). さらに15d-PGJ₂やtroglitazoneによりIgE受容体凝集刺激後に生じるGM-CSF産生が用量依

存的に抑制されることを示し, TNF- α , IL-5やmacrophage inflammatory proteinなどもmRNAレベルで抑制されることを報告している. 他にDiazらはSCF, IL-10, IL-1存在下で培養したmBMMCの系でPPARが発現しており15d-PGJ₂が用量依存的にIL-6の産生を増加させたがPPARのアゴニストであるtroglitazoneでは認められず, 15d-PGJ₂の作用においてPPARを介さない系が存在することを示した(8).

マスト細胞におけるPPARの発現ならびに機能解析はSugiyamaらの論文が唯一といってもよく, PPARと炎症細胞との関わりはマクロファージの研究が中心であり, マクロファージで認められるサイトカイン産生の抑制性の調節がマスト細胞にも認められることをSugiyamaらが証明したが, 培養マスト細胞での実験が主であり, in vivoのマスト細胞におけるPPARの真の役割はまだ手がつけられていないといっても過言ではない.

3. PPAR 内因性リガンド

PPAR の内因性アゴニストとして PGD_2 の代謝物である 15d-PGJ_2 や長鎖不飽和脂肪酸が知られている。 PGD_2 の生成を司る PGD synthase はマスト細胞やマクロファージに存在することからこれらの炎症細胞は生体内で PGD_2 産生の主要な位置を占める。

マスト細胞で産生される PGD_2 が周辺の平滑筋細胞膜上の DP 受容体を介して細胞内シグナルを伝達し、気道収縮や血管拡張などの生理活性を示す。近年 PPAR の内因性リガンドとして PGD_2 の代謝物である 15d-PGJ_2 が注目をあびてきたが、生体内での 15d-PGJ_2 の生合成経路が完全に確定しておらず、 15d-PGJ_2 が本当に内因性のリガンドとして作用しているかどうか疑問とされてきた。これは、 15d-PGJ_2 の測定法が完全ではないことにも起因している。生体組織中の 15d-PGJ_2 含量の測定は、抗体を用いた免疫酵素法が開発されてきたが、抗体の特異性に問題があった。近年、Uchida らが 15d-PGJ_2 に対して特異的な抗体を作製し、それを用いた ELISA 法によりマクロファージが産生する 15d-PGJ_2 を測定し、ヒトの動脈硬化のアテローム斑に存在するマクロファージに 15d-PGJ_2 が含まれることを免疫組織学的に検出した(9)。Uchida らは細胞内で産生された PGD_2 が細胞内で 15d-PGJ_2 に変換して直接 PPAR を含む細胞内のタンパク質に作用する一方、細胞外に出てそこでアルブミン非依存性に 15d-PGJ_2 が生じ近接の細胞にパラクリンとして作用する経路を提唱している。 15d-PGJ_2 が生体内で唯一の PPAR の内因性リガンドであるかどうかは、現在のところ結論をみないが、少なくとも 15d-PGJ_2 の前駆物質である PGD_2 が産生される細胞においては PPAR に結合して作用をもたらす可能性が一番高いと考えられる。

我々はマスト細胞の培養腫瘍系であるラット好塩基球性白血病 (RBL-2H3) を用いて抗原刺激後にみられる PGD_2 とその代謝物を LC-MS を用いて測定した。抗原である DNP-BSA 10 ng/ml で刺激 10 分後に PGD_2 は細胞 10^6 当たり 95.1 nmole の産生量を示し、非刺激群に比べ 40.8 倍の増加を認めた。10 分後では PGJ_2 , $^{12}\text{-PGJ}_2$, 15d-PGJ_2 の産生は認められなかった。抗原刺激 24 時間後には PGD_2 が 8.65 nmole に減少したのに対し、 PGJ_2 , $^{12}\text{-PGJ}_2$, 15d-PGJ_2 はそれぞれ 3.57, 0.31, 0.42 nmole で非刺激群に対してそれぞれ 43, 19.5, 140 倍の増加を示した。LC-MS 法により培養マスト細胞における PGD_2 とその代謝物の産生が正確に測定できるようになり、 15d-PGJ_2 の動態とその機能を解析することが可能になると考える(投稿中)。

Fig. 2 Effect of troglitazone, a PPAR agonist on proliferation of bone marrow derived mast cells (BMMCs) obtained from heterozygous PPAR-deficient (+/-) and wild (+/+) mice. Bone marrow cells were obtained after 4 weeks of culture with IL-3 and further 4 weeks of culture with stem cell factor and IL-3. BMMCs were disseminated in a 96-well plate at a density of 1.25×10^4 cells/0.2 ml/well. Cell proliferation was measured using the cell proliferation reagent kit WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) in the presence of various concentrations of troglitazone. (Results are the mean $\pm$ S.E.M. of three experiments. * $P < 0.01$, significantly different from the non-treated group)

4. mBMMCs における PPAR アゴニストの作用

PPAR ヘテロノックアウト (+/-) マウスとその正常野生型 (+/+) マウスの骨髓細胞を採取し、IL-3 (Pokeweed でマウス脾臓細胞を刺激して調整した上清培地) 存在下で 4 週間培養し、さらに stem cell factor (SCF) 50 ng/ml 存在下にて 4 週間培養した。骨髓細胞は IL-3 刺激のみでは粘膜型マスト細胞が増え、SCF 添加により結合組織型マスト細胞に分化する (Fig. 1)。PPAR アゴニストである troglitazone による細胞増殖反応を WST-1 を用いて検討した (Fig. 2)。Troglitazone 1, 3 μM 添加 4 時間後、+/+ マウス BMMCs はそれぞれ 133, 138% の増加を示し、10 μM 以上では増加は認められなかった。一方、+/- マウス BMMC は Troglitazone 添加による増殖反応は認められなかった。Troglitazone より選択性の高

Fig. 3 TNF- α production in BMMCs from heterozygous PPAR -deficient and wild mice. BMMCs obtained from both strains were cocultured with NIH-3T3 cells for 5 days in a 24-well plate. BMMCs were sensitized with mouse monoclonal IgE against DNP-BSA overnight. BMMCs were stimulated with 20 ng/ml DNP-BSA as antigen or 1 μ M ionomycin for 6 h. TNF- α released in the supernatant was measured with an enzyme immunoassay kit (BioSource International, Inc., USA) (Results are the mean $\pm$ S.E.M. of three experiments. * P <0.01, significantly different from the wild type mice)

Fig. 4 Histamine release in BMMCs from heterozygous PPAR -deficient and wild type mice. BMMCs were cultured in the same way shown in Fig. 3. BMMCs sensitized with IgE were stimulated with 20 ng/ml DNP-BSA, 1 μ M ionomycin, and 100 μ g/ml compound 48/80 for 30 min. Histamine released in the supernatant was measured by HPLC-fluorometry. (Results are the mean $\pm$ S.E.M. of three experiments. * P <0.01, significantly different from the wild type mice)

Table 1 Tissue histamine contents of heterozygous PPAR -deficient and wild type mice

	Wild (+ / +)	Heterozygous (+ / -)
skin	112.9 $\pm$ 13.33	72.03 $\pm$ 4.97*
forestomach	72.17 $\pm$ 1.64	62.43 $\pm$ 3.69
fundic gland	55.63 $\pm$ 3.34	56.71 $\pm$ 2.71
spleen	4.97 $\pm$ 1.67	3.49 $\pm$ 0.72
heart	4.73 $\pm$ 0.85	2.31 $\pm$ 0.20*
lung	3.10 $\pm$ 0.55	3.47 $\pm$ 0.86
colon	0.59 $\pm$ 0.22	0.51 $\pm$ 0.12
jejunum	0.59 $\pm$ 0.22	0.77 $\pm$ 0.35
kidney	0.24 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.07
liver	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.04
ileum	0.10 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.04

(nmoles/g wet weight)(mean $\pm$ S.E.M., n=6) * P <0.01, significantly different from wild type

い Rosiglitazone を用いた実験でも同様の結果を得ており、mBMMCs の増殖過程に PPAR が関与していることが考えられる。

5. mBMMCs の機能の検討

マスト細胞は膜表面に IgE 受容体を有し、モノクローナル IgE で感作後、抗原である DNP-BSA で刺激を行うと開口分泌によりヒスタミンの遊離が生じる。さらにはアラキドン酸カスケードの刺激によりプロスタグランジンやロイコトリエンの産生、遊離が生じる。またサイトカインの発現、産生により炎症反応をもたらすことが知られている。これらのマスト細胞の機能に PPAR がどのように関わっているかを調べることは、PPAR の炎症反応の進展への関与とともに、炎症反応に対する治療薬へのアプローチにつながる。本実験では mBMMCs を IL-3 を含む培地で 4 週間、さらに SCF 添加後 4 週間培養した後、マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) と 5 日間共培養した細胞を用いた。Fig. 3 にヘテロノックアウトマウス、+/+ マウス由来 BMMCs における TNF- α 産生を示した。抗原、ionomycin 刺激 4 時間後に培地中に遊離される TNF- α を ELISA 法 (BioSource International, Inc.) により測定した。+/+ mBMMCs において抗原、ionomycin 刺激によりそれぞれ 1330, 490 pg/10⁶ 細胞数の産生がみられ、+/- mBMMCs において抗原、ionomycin 刺激により +/+ マウスの 2.4 倍、2.7 倍に増加した。

Fig. 4 にはヘテロノックアウトマウスならびに +/+ マウス BMMCs におけるヒスタミン遊離反応を比較した。抗原刺激によるヒスタミン遊離は +/- マウス、+/+ マウス BMMCs ではそれぞれ 33.2%, 27.2% と有意差は認められなかった。一方、Ca イオノフォアである ionomycin 1 μ M 刺激では +/- マウス、+/+ マウス BMMCs は 51.4%, 31.3% であり、ヘテロノックアウトマウスにおいてヒスタミン遊離反応の増強が認められた。ポリカチオン化合物でマスト細胞におけるヒスタミン遊離促進作用が知られる compound 48/80 刺激では BMMCs の遊離反応が認められなかった。

以上の結果よりヘテロノックアウトマウス BMMCs におけるヒスタミン遊離反応と TNF- α 産生の増強がみられたことから、PPAR を介した炎症反応への関与が示唆された。ヒスタミン遊離に関しては、抗原刺激においては両マウス BMMCs に差は認められず、ionomycin 刺激による Ca 流入にもとづくヒスタミン遊離に差が認められたことは、開口分泌が細胞内 Ca 濃度の上昇とプロテインキナーゼ C の活性化の 2 つの系の協力作用が重要であることがいわれており、PPAR が Ca 流入機構に関与する可能性が考えられる (10)。一方、TNF- α 産生に関しては抗原

刺激、Ca 流入刺激ともにヘテロノックアウトマウス BMMCs で増強がみられ、TNF- α 発現に PPAR が抑制的に調節していることを示したと考えている。

6. PPAR ヘテロノックアウトマウスにおける組織ヒスタミン含量の検討

PPAR ヘテロノックアウトマウスと +/+ マウスのヒスタミン含量の比較を Table 1 に示した。+/- マウスの皮膚、心臓は +/+ 型マウスに比べてそれぞれ 63.8, 48.8% であり有意な減少が見られた。我々はマウス組織においてマスト細胞由来のヒスタミンをマスト細胞欠損マウス (W/W^o) とその野生型の比較から検討し、皮膚、前胃、心臓でそれぞれ 98.0, 99.2, 98.4% がマスト細胞に由来することを報告している (11)。これらの組織では結合組織型マスト細胞が主であり、ヘテロノックアウトマウスの前胃においても有意差はみられないが 13.5% のヒスタミン含量の減少が認められた。以上の結果からマスト細胞の増殖に PPAR が影響していることが示唆された。今後、in vivo におけるマスト細胞の発現、機能の面から PPAR の関与を明らかにして炎症との関わりを検討する上でヘテロノックアウトマウスは有効である。

7. まとめ

マスト細胞に PGD₂ 合成酵素が存在し、生体内では主要な PGD₂ の産生細胞である。PGD₂ の代謝物である 15-PGJ₂ が内因性の PPAR のアゴニストであると報告されていることから、マスト細胞において PPAR を介する転写制御が注目されることは当然と考えられる。しかし、これまでのマスト細胞における PPAR の発現と機能についての報告は限られていた。mBMMC を用いた実験系から PPAR がマスト細胞に存在し、炎症性メディエーターの産生遊離に対し抑制性の調節が存在することが示唆されてきた。PPAR のヘテロノックアウトマウスを用いて BMMCs の増殖が抑えられ、機能面ではヒスタミン遊離ならびに TNF- α 産生が増強されるという結果は PPAR を介する抑制性の調節系を反映したものと考えている。PPAR の完全ノックアウトではない点を考慮する必要があるが、PPAR の機能の低下によってもたらされる現象から、PPAR の作用を明らかにすることができると考えている。SCF と IL-3 を添加することにより、mBMMCs の培養系が確立してきたが、それぞれの組織中に存在するマスト細胞は、形態学的かつ薬物の反応性においても微妙に異なり、それが組織に適応したマスト細胞の実態と考えている。mBMMCs はあくまでマスト細胞のモデルであり、生体の各組織の環境に応じて分化したマスト細胞がじんましん、気管支喘息などの病態を引き起こす上で重要な役割

を果しており, in vivo のマスト細胞における PPAR の調節機構が今後明らかにされるものと期待される。

謝辞: PPAR ヘテロノックアウトマウスは門脇孝博士 (東京大・医・糖尿病代謝内科) に御供与いただいた。LC-MS 測定に関して裏出良博博士, 丸山敏彦氏 (大阪バイオサイエンス研) との共同研究で御協力いただいた。本研究の遂行にあたり上崎善規教授, 和田孝一郎博士, 立花雅史氏 (大阪大・院歯・薬理) と共同で行い御討論をいただいた。

文 献

- 1) Corton JC, Anderson SP, Stauber A. Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:491-518.
- 2) Murphy GJ, Holder JC. PPAR- agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:469-474.
- 3) Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR : A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem.* 2001;276:37731-37734.
- 4) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator activated receptor- is a negative regulation of macrophage activation. *Nature.* 1998;391:79-82.
- 5) Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391:82-86.
- 6) Sugiyama H, Nonaka T, Kishimoto T, Komoriya K, Tsuji K, Nakahata T. Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in mouse bone marrow-derived mast cells. *FEBS Lett.* 2000;467:259-262.
- 7) Sugiyama H, Nonaka T, Kishimoto T, Komoriya K, Tsuji K, Nakahata T. Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in human cultured mast cells: a possible role of these receptors in negative regulation of mast cell activation. *Eur J Immunol.* 2000;30:3363-3370.
- 8) Diaz BL, Fujishima H, Kanaoka Y, Urade Y, Arm JP. Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and IL-6 expression in mouse bone marrow-derived mast cells by exogenous but not endogenous prostanoids. *J Immunol.* 2002;168:1397-1404.
- 9) Shibata T, Kondo M, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K. 15-Deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂: a prostaglandin D₂ metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem.* 2002;277:10459-10466.
- 10) Beaven MA, Guthrie DF, Moor JP, Smith GA, Hesketh TR, Metcalfe JC. Synergistic signals in the mechanism of antigen-induced exocytosis in 2H 3 cells: evidence for an unidentified signal required for histamine release. *J Cell Biol.* 1987;105:1129-1136.
- 11) Yamatodani A, Maeyama K, Watanabe T, Wada H, Kitamura Y. Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells: clear evidence for the presence of non-mast cell histamine. *Biochem Pharmacol.* 1982;31:305-309.

Abstract - Role of PPAR in inflammatory response related to mast cells. Kazutaka MAEYAMA, Maiko EMI and Kazuyasu CHIHARA (Department of Pharmacology, Ehime University School of Medicine, Onsen-gun, Ehime 791-0295, Japan)

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **122**, 325 ~ 330 (2003)

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor superfamily and ligand-activated transcription factors. The activation of PPAR regulates lipid and glucose homeostasis and its agonists have been developed as novel antidiabetic drugs. Recently, it has been reported that PPAR plays roles in inflammatory and immunological responses. Especially in monocyte/macrophage system, the expression of PPAR and the negative regulation of cytokine production has been reported. Mast cells are derived from stem cells in bone marrow, and their proliferation and differentiation are regulated by stimulation of stem cell factor from fibroblasts and/or IL-3 from T lymphocytes. Recently, it was reported that PPAR is expressed in mast cells, but its roles remain uncertain. After antigen stimulation, mast cells produce and release prostaglandin D₂ which is metabolized to 15-deoxy^{12,14}-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂). Because 15d-PGJ₂ acts potently as an endogenous PPAR agonist, mast cells might play roles in inflammation and immunological responses via the PPAR pathway. In this paper we will discuss PPAR function in mast cells using cultured bone marrow derived mast cells obtained from heterozygous PPAR-deficient mice.

Keywords: mast cells; PPAR ; 15-deoxy-^{12,14}prostaglandin J₂; cytokine; histamine