The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Characterization of Cultured Mast Cells Deried from Ws/Ws Mast Cell-deficient Rats with a Small Deletion at Tyrosine Kinase Domain of c-kit
Author(s)	鄭, 英樹
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38903
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	鄭（てい）　英樹（ひでき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11263　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Characterization of Cultured Mast Cells Deried from *Ws*／*Ws* Mast Cell-deficient Rats with a Small Deletion at Tyrosine Kinase Domain of c-*kit* **（c-*kit* 遺伝子における12塩基の欠失によりマスト細胞を欠損する *Ws*／*Ws* ラットに由来する培養マスト細胞の特性）**
論文審査委員	（主査） 教　授　北村　幸彦 （副査） 教　授　青笹　克之　　教　授　西宗　義武

論文内容の要旨

【目的】

Ws／*Ws* ラットは我々の研究室でマスト細胞を欠損することを見つけた世界で最初の遺伝的マスト細胞欠損ラットである。*Ws* 遺伝子はレセプター・タイロシンカイネースの一種である c-*kit* レセプターをコードしており，*Ws*／*Ws* ラットでは c-*kit* 遺伝子に12塩基の欠失がある。本研究では *Ws* 突然遺伝子がマスト細胞の分化に及ぼす影響を詳しく解析するため *Ws*／*Ws* ラットと正常(+/+) ラットの骨髄から培養マスト細胞を得て，種々の培養条件下での増殖能及び表現形質を検討した。

【方法および結果】

1．+/+ラット，*Ws*／*Ws* ラットの骨髄細胞を Concanavaline A 刺激脾細胞培養上清（ConA-SCM）の存在下で培養するとアルシアンブルー（Ab）陽性の顆粒を持つ細胞が出現し，その数は+/+，*Ws*／*Ws* ラット とも培養10日目で全細胞の約30％に達した。これらの細胞をラットの結合織型マスト細胞（CTMC），粘膜型マスト細胞（MMC）にそれぞれ特異的な Rat Mast Cell Protease（RMCP)-Ⅰ，および RMCP-Ⅱに対する抗体を用いて染色すると抗 RMCP-Ⅰ抗体ではほとんど染色されないのに対し，約30％の細胞が抗 RMCP-Ⅱ抗体で染色され，ほぼ Ab 陽性細胞と同じ割合を示していた。このことから Ab 陽性細胞は好塩基球，CTMC ではなく，MMC に似た形質を示すマスト細胞と考えられた。

2．c-*kit* レセプターのリガンドである Stem Cell Factor(SCF)に対する培養マスト細胞(CMC)の増殖反応を MTT［3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide］法により調べたところ，+/+ラット由来の CMC（+/+－CMC）は SCF により濃度依存性の増殖を示すのに対し，*Ws*／*Ws*-CMC は高濃度のSCF存在下でのみ極めて軽度の増殖を示した。さらに ConA-SCMの存在下で得られたCMCをSCF存在下で培養し続けると，+/+－CMC は培養8日目で約10倍に増加したが，*Ws*／*Ws*-CMC は維持されず1／10にまで減少した。*Ws*／*Ws*-CMC の SCFに対する反応性の低下は c-*kit* レセプターのタイロシンカイネースの活性の障害を反映していると考えられたため，Immuncomplex kinase assay 法を用いて検討した。*Ws*／*Ws*-CMC は+/+－CMCに比べ極めて低い活性を示した。

3．マウスにおいてはマスト細胞と線維芽細胞が c-*kit* レセプターと SCF を介して接着することがわかっている。正常＋／＋マウス由来の線維芽細胞株（+/+－fibroblast）との接着性は *Ws*／*Ws*-CMC と+/+－CMC で差はなく，SCF を発現していない *Sl*／*Sl* マウス由来の線維芽細胞株（*Sl*／*Sl*-fibroblast）とは，*Ws*／*Ws*-CMC，+/+－CMC

ともにまったく接着しなかったため，*Ws*／*Ws*-CMC は c-*kit* レセプターの細胞外ドメインを正常に発現していると考えらえた。さらに ConA-SCM の非存在下で線維芽細胞との共生培養の期間を延長し，CMC の線維芽細胞依存性増殖機構を解析した。+／+ fibroblast と共生培養した場合，培養 48 時間後に +／+ －CMC の 10 %は S 期に入ったが，*Ws*／*Ws*-CMC はわずか約 1 %が S 期に入ったのみであった。*Sl*／*Sl*-fibroblast との共生培養では，+／+ －CMC，*Ws*／*Ws*-CMC ともまったく S 期に入らなかった。また＋／＋fibroblast と共生培養後 8 日目まで+／+ －CMC は維持されたが，*Ws*／*Ws*-CMC は 1／10 に減少した。*Sl*／*Sl*-fibroblast との共生培養では +／+ －CMC，*Ws*／*Ws*-CMC とも培養 8 日目には全く維持されず死滅した。上記の結果は線維芽細胞による c-*kit* レセプターを介した *Ws*／*Ws*-CMC の支持がわずかしか起こらないことを示しており，*Ws*／*Ws*-CMC において c-*kit* レセプタータイロシンカイネースの活性が低下していることが原因であると考えられた。

4．マウスでは CMC の培養条件を変えると表現形質も変化することがわかっている。ラットのマスト細胞は RMCP-Ⅰあるいは RMCP-Ⅱの存在により CTMC と MMC は明瞭に区別できるため，種々の培養条件下で CMC の表現形質を検討した。ConA-SCM の存在下で出現した CMC は+／+，*Ws*／*Ws* とも粘膜型の表現形質（RMCP-Ⅰ$^{-}$／Ⅱ$^{+}$）を示した。SCF のみの存在下で CMC を培養すると培養 8 日目で+／+ －CMC は 10 倍に増加し，多くは結合組織型に近い表現型（RMCP-Ⅰ$^{+}$／Ⅱ$^{+}$）を示した。*Ws*／*Ws*-CMC は 1／10 に減少したため有意差の判定は困難であったが約半数は RMCP-Ⅰ$^{+}$／Ⅱ$^{+}$ を示した。ConA-SCM，SCF 両者の存在下で培養すると SCF の表現形質に対する効果がなくなり，培養 8 日目で＋／＋-CMC は約 15 倍に増加したがほとんどが RMCP-Ⅰ$^{-}$／Ⅱ$^{+}$ の表現型を示したままであった。*Ws*／*Ws*-CMC も約 3 倍に増加したが RMCP-Ⅰ$^{-}$／Ⅱ$^{+}$ を示したままであった。しかし＋／＋fibroblast との共生培養では ConA-SCM 存在下でも培養 8 日目で+／+ －CMC，*Ws*／*Ws*-CMC のほとんどが RMCP-Ⅰ$^{+}$／Ⅱ$^{+}$ の表現型を示した。さらに SCF をまったく産生していないため CMC を支持できない *Sl*／*Sl*-fibroblast との共生培養でも ConA-SCM 存在下で+／+ －CMC および *Ws*／*Ws*-CMC の約半数が RMCP-Ⅰ$^{+}$／Ⅱ$^{+}$ の表現型を示した。上記の結果は *Ws*／*Ws*-CMC の形質転換がわずかに残存する c-*kit* タイロシンカイネース活性によって起こった可能性を完全に否定するものではないが，線維芽細胞が産生する SCF 以外の物質が RMCP-Ⅰの発現を誘導したことを強く示唆している。現在まで線維芽細胞に由来し，マスト細胞の分化・増殖に関与する因子として SCF 以外に nerve growth factor（NGF）が知られているため，抗体 NGF 抗体の効果を検討した。しかし，抗 NGF 抗体の添加は表現形質にまったく影響を与えなかった。以上のことよりラットにおいて CMC が CTMC 様の形質を獲得するにあたっては線維芽細胞が産生する SCF，NGF 以外の因子が関与することが示唆された。

【総括】

1．*Ws*／*Ws*ラットの培養マスト細胞は T 細胞依存性増殖機構に異常はないが，c-*kit* レセプターを介した線維芽細胞依存性の増殖機構に異常が認められた。

2．*Ws*／*Ws*ラットの培養マスト細胞の c-*kit* レセプターのカイネース活性は強く障害されていたが，c-*kit* レセプターの細胞外ドメインは正常に発現していた。

3．培養マスト細胞と線維芽細胞との共生培養の実験系により，マスト細胞が結合織型マスト細胞様の表現形質を獲得する際，c-*kit* レセプターを介したシグナル伝達は必須でないことがわかった。

論文審査の結果の要旨

鄭英樹君は，マスト細胞の分化についての研究を *Ws*／*Ws*ラットの培養マスト細胞（CMC）を用いて行った。*Ws*／*Ws*ラットは，c-*kit* 遺伝子に 12 塩基の欠失がありマスト細胞を欠損している。その結果，1．*Ws*／*Ws*ラットの CMC は T 細胞依存性増殖機構に異常はないが，c-*kit* を介した線維芽細胞依存性の増殖機構に異常があること，2．*Ws*／*Ws*ラットの CMC の c-*kit* のカイネース活性は強く障害されているが，c-*kit* の細胞外ドメインは正常に発現していること，3．CMC と線維芽細胞との共生培養の実験系により，マスト細胞が結合織型マスト細胞の表現形質を獲得する際，c-*kit* を介したシグナル伝達は必須でないことを示した。本研究によりラットのマスト細胞の分化機構の一端が明らかとなったので，これは学位論文に値すると思われる。