

마우스복강비만세포에서 프로테아제 발현 표현형의 조직 의존적 변화

이영미*

원광대학교 약학대학 한약학과
(2001년 9월 20일 게재승인)

Tissue-dependent variation of protease expression phenotype in mouse peritoneal mast cells

Young-Mi Lee

Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, 570-749, South Korea
(Accepted September 20, 2001)

Abstract : To examine the fate of the injected peritoneal mast cells (PMCs), we injected PMCs (500 or 10^5) derived from WBB6F1-green fluorescent protein(GFP) mice into stomach wall of WBB6F1-*W/W'* mice. When 500 PMCs were injected, the proportion of alcian blue (AB)⁺ mast cells to GFP⁺ mast cells in the muscle was 25.0% on day 1, but decreased to 0.9% on day 7. Then, it increased to 98.2% on day 35. In contrast, GFP⁺ mast cells in the mucosa were not detectable on day 1, 3, and 7 after injection. On day 35, the proportion of AB⁺ mast cells to GFP⁺ mast cells in the mucosa was 97.0%. When 10^5 PMCs were injected, the proportion of AB⁺ mast cells to GFP⁺ mast cells in the muscle was more than 88.2%, and that in the mucosa was more than 86.3% from day 1 through 35 after injection. These results indicated that percentage of degranulation on day 1, 3, 7, 14 after injection of 500 PMCs was significantly higher than that after injection of 10^5 PMCs. Furthermore, when 500 PMCs were injected, protease expression phenotypes of PMCs changed from day 14 after injection. When 10^5 PMCs were injected, protease expression phenotype of PMCs did not change after injection. Such degranulated PMCs may acquire the new phenotype and adapt the new tissue.

Key Words : Mouse mast cell protease; green fluorescent protein, peritoneal mast cells; WBB6F1-*W/W'* mice

서 론

마우스 비만세포 프로테아제(MMCP)-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 와 마우스 비만세포 카르복시펩타다제 A (MC-CPA)와 같은 세린 프로테아제들이 비만세포의 분비과립에서 단백질 sequencing과 cDNA 클로닝으로 확인되어 왔다¹⁻⁷. 마우스 비만세포 프로테아제의 *In situ* hybridization은 비만세포 표현형을 설명하는데 사용되어 왔다⁸⁻¹⁰. 예를들면 MMCP-2 mRNA는 WBB6F1-*+/+* 마우스의 점막층에 있는 비만세포에서 발현하지만 근육층에 있는 비만세포에서는 발현하지 않으며, MC-CPA mRNA는 WBB6F1-*+/+* 마우스의 근육층에 있는 비만세포에서 발현하지만 점막층에 있는 비만세포에서

는 발현하지 않는다¹⁰. 우리는 정상마우스(WBB6F1-*+/+*)의 복강비만세포를 유전적으로 비만세포를 결손한 마우스(WBB6F1-*W/W'*)의 위벽에 이식한 후 프로테아제 발현 표현형의 변화를 보고한 바 있다. 10^5 개 복강비만세포를 이식하였을 때는 새로운 조직에 적응하지 못한 반면, 20개를 이식하였을 때는 그 부위에 적응하였다¹⁰. 20개 복강비만세포를 WBB6F1-*W/W'* 마우스의 위벽에 이식한 후 10일에 위조직을 alcian blue(AB)으로 염색하였을 때 비만세포를 발견할 수 없었다. 그러나 35일에는 상당수의 비만세포가 관찰되었다. AB은 비만세포 과립에 있는 글리코사미노글리칸-단백질 복합체를 염색하기 때문에 이식한 복강비만세포가 탈과립되어 AB으로 염색되지 않았을 가능성이 있다. 이전 연구에서

비만세포의 증식능은 탈과립에 의해서 감소되지 않았음을 보고한 바 있다¹⁰. 복강비만세포는 이식하면 탈과립한 후 증식하고 과립을 재생성하는 것으로 사료되었다.

최근 gellyfish *aequorea victoria* 유래의 형광단백질 (GFP)이 발견되었다. GFP는 유전자발현과 단백질 타겟팅의 marker로서 세포나 생물체들에서 잘 구축되어 왔다¹¹. Okabe 등¹²은 chicken beta-actin promoter와 cytomegalovirus enhancer의 조절하에 GFP cDNA를 갖는 유전자도입 형광마우스 (WBB6F1-GFP)를 생산하였다. 이 WBB6F1-GFP는 적혈구와 털을 제외하고 여기광에서 녹색을 나타낸다. 본 연구에서는 WBB6F1-GFP 유래 복강비만세포를 분리하여 WBB6F1-W/W' 마우스의 위벽에 500개와 10⁵개를 이식후 복강비만세포의 운명을 관찰하고, 비만세포 프로테아제 표현형의 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

마우스

WBB6F1-W/W' 마우스는 일본 SLC (Hamamatsu, Japan)로부터 구입하였다. 이 마우스는 흰털과 검은 눈을 가지고 있으며 유전적으로 비만세포가 결손되어 있다. 2개월-4개월령 WBB6F1-GFP는 Dr. Okabe (Osaka University, Japan)로부터 제공받았다.

복강비만세포의 분리

복강비만세포는 Yurt 등¹³의 방법에 따라 분리하였다. 간략히 설명하면 복강세포 (6-10 x 10⁷)를 1 ml Tyrode 완충액에 현탁시킨후 22.5% (w/v) metrizamide (비중 1.120 g/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 2 ml에 넣은 후 상온에서 400 x g로 15분간 원심분리 하였다. 완충액-metrizamide 경계면에 남아 있는 세포들은 제거한 후 침전된 세포는 Tyrode 완충액으로 세척후 1 ml Tyrode 완충액에 다시 현탁시켰다.

99%이상의 비만세포를 얻기 위해 이 과정을 한번 더 반복하였다. 분리된 GFP+ 복강비만세포는 형광현미경으로 확인하였다.

복강비만세포의 이식

WBB6F1-W/W' 마우스는 Nembutal로 마취후 복강을 열고 위를 꺼냈다. WBB6F1-GFP 마우스 유래 복강비만세포를 WBB6F1-W/W'의 위벽에 이식하였다¹⁴. 0.1 ml α -MEM에 현탁한 복강비만세포는 500개와 10⁵개를 투베르쿨린 주사기로 이식하였다. 각 마우스는 위의 양면에 이식한 후 인디아 잉크로 이식 부위를 표시한 후 1일, 3일, 7일, 14일 35일에 샘플링하였다.

비만세포의 관찰

복강비만세포를 이식한 후 정해진 날에 WBB6F1-W/W' 마우스의 위를 꺼내 절개한 다음 고무판 위에 펴고 0.1 mol/L 인산완충액(pH 7.4)으로 새로 만든 4% 파라포름알데히드로 4 °C에서 6시간 고정하였다. Tissue-Tek OTC compound (Miles Inc, Elkhart, IN)에 포매한절편 (10 μ m 두께)은 cryostat로 자른후 형광현미경(excitation 파장 450-490 nm, emission 파장 515-565 nm, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)으로 GFP+ 비만세포를 관찰하였다. 이 절편을 AB과 nuclear fast red로 염색한 후 GFP+ 비만세포수와 AB+ 비만세포수는 같은 샘플에서 계산되었다. 연속절편은 *in situ* hybridization에 사용하였다.

Probe 제작과 *In situ* hybridization

WBB6F1-+/+마우스의 골수유래 배양 비만세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 총 RNA로 부터 역전사효소 (Takara, Kyoto, Japan)와 MMCP-2, MC-CPA의 특이적 antisense primer를 사용하여 single strand cDNA를 생성하였다. 각 cDNA는

Table 1. Proportions of AB⁺/GFP⁺ Cells Appeared in the Stomach of WBB6F1-W/W' Mice at Various Times after the Injection of 500 PMCs of WBB6F1-GFP Mice.

Days after injection	Muscle				Mucosa			
	Proportion of appearance	No. of mast cells*		AB ⁺ /GFP ⁺ (%)	Proportion of appearance	No. of mast cells*		AB ⁺ /GFP ⁺ (%)
		GFP ⁺	AB ⁺			GFP ⁺	AB ⁺	
1	9/14	316 ± 27	79 ± 23	25.0	0/14	0	0	0
3	5/8	239 ± 45	21 ± 8	8.8	0/8	0	0	0
7	14/22	211 ± 36	2 ± 1	0.9	0/22	0	0	0
14	7/12	483 ± 74	155 ± 43	32.1	4/12	139 ± 24	44 ± 16	31.7
35	19/28	5641 ± 748	5538 ± 599	98.2	10/28	977 ± 138	948 ± 84	97.0

PMCs are 100% GFP⁺ and AB⁺ mast cells.

Each mouse received two injections.

*Total numbers of GFP⁺ and AB⁺ mast cells per each injection site.

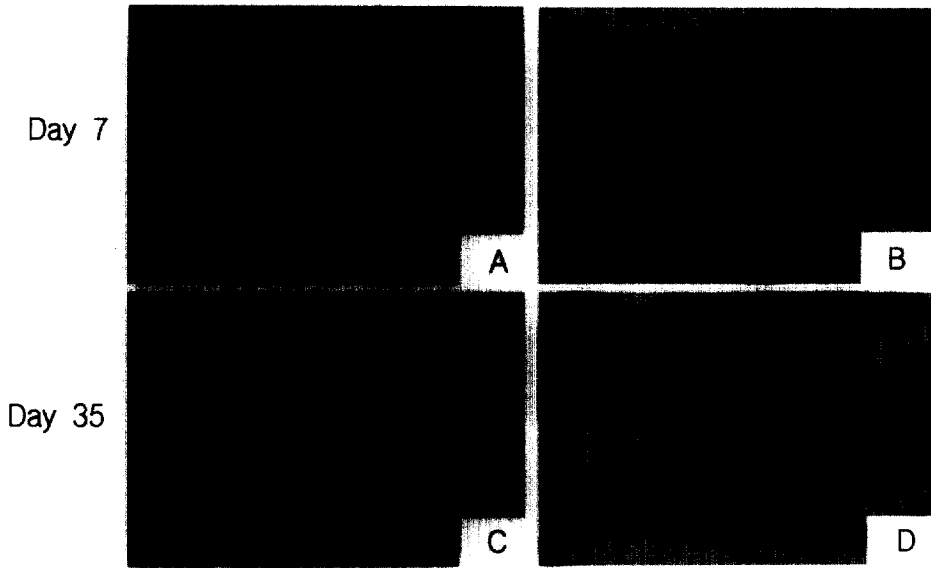


Figure 1. Granulated and degranulated mast cells after injection of 500 PMCs of WBB6F₁-GFP mice into the stomach of WBB6F₁-W/W⁺. A: GFP⁺ cells in the muscle on day after the injection. B: Same section of A stained with AB and nuclear fast red. GFP⁺ cells were not stained with AB. C: GFP⁺ cells in the muscle on day 35 after the injection. D: Same section of C stained with AB and nuclear fast red. GFP⁺ cells were also stained with AB. Original magnification, x 1000.

Tag DNA polymerase (Takara)를 이용하여 Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, CT) DNA thermal cycler로 증폭하였다¹⁵. PCR 산물은 riboprobe를 생성하기 위해 T3, T7 promotor를 포함하는 Bluescript KS(-) plasmid (Stratagene, La Jolla, CA)의 ECoRV 부위에 subcloning 하였다. 그 염기서열은 model 373A DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, CA)로 확인하였다.

In situ hybridization은 보고된 방법에 따라 수행하였다¹⁶. Dig RNA labeling kit (Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim, Germany)를 이용하여 Digoxigenin-labeled single-strand RNA probe를 제작하였다. GFP⁺ 비만세포의 수와 MMCP-2 mRNA⁺ 세포나 MC-CPA mRNA⁺ 세포는 GFP⁺ 세포에 대한 프로테아제 mRNA⁺ 세포의 비를 계산하기 위하여 같은 절편에서 counting 되었다.

결 과

WBB6F₁-W/W⁺ 마우스의 위샘플은 WBB6F₁-GFP 유래 복강비만세포 500개를 이식한 후 여러 날에 취했다. 이식 후 7일에 근육층에서 GFP⁺ 비만세포를 발견하였으나 (Figure 1A) 이 비만세포는 AB⁻이었다 (Figure 1B). 이것은 이식 부위에 탈과립한 비만세포가 존재함을 보여 주었다. 이식 35일 후 이식 부위에 있는 GFP⁺ 비만세포는 AB⁺ 비만세포였다 (Figure 1C and D). 이것은 탈과립한 비만세포가 과립을 다시 생성하였음을 보여 주었다.

500개 나 10⁵개의 복강비만세포를 이식한 후 여러 날에 탈과립율을 검토하기 위해 각 이식부위에서 GFP⁺ 비만세포와 AB⁺ 비만세포수를 센후 GFP⁺에 대한 AB⁺의 비를 계산하였다. 500개 복강비만세포를 이식하였을 때 GFP⁺ 비만세포는 1일에 14개중 9개, 7일에 22개중 14개, 35일에는 28개중 19개가 근육층에서 발견되었다. 각 날에 취한 샘플의 약 60%에서 상당수의 비만세포가 발견되었다. 근육층에서 GFP⁺에 대한 AB⁺ 비만세포의 비는 1일에 25.0%이었지만 7일에 0.9%로 감소하다가 14일에 32.1%, 35일에 98.2%로 각각 증가하였다. 반면에 점막층에 있는 GFP⁺ 비만세포는 이식 1일, 3일, 7일에 전혀 발견할 수 없었으나 14일, 35일에는 샘플의 약 30%에서 발견되었다. 점막층에 있는 GFP⁺ 비만세포에 대한 AB⁺ 비만세포의 비는 14일에 31.7%, 35일에 97.0%이었다.

10⁵개를 이식하였을 때 GFP⁺ 비만세포는 샘플의 근육층에서는 90.0%이상, 점막층에서는 약 75.0% 이상 관찰되었다. 근육층에 있는 GFP⁺ 비만세포에 대한 AB⁺ 비만세포의 비는 1일에서 35일까지 88.2% 이상이고 점막층의 것은 86.3% 이상이었다 (Table 2). 이러한 결과들은 1일, 3일, 7일, 14일에 탈과립율이 500개 복강비만세포를 이식하였을 때 10⁵개 이식하였을 때 보다 훨씬 컸음을 시사하였다.

프로테아제 발현 표현형의 변화를 검토하기 위하여 500개 및 10⁵개 복강비만세포를 이식후 여러 날에 GFP⁺ 비만세포와 비만세포 프로테아제 mRNA⁺ 비만세포를 센수 후

Table 2. Proportions of AB⁺/GFP⁺ Cells Appeared in the Stomach of WBB6F1-*W/W*['] Mice at Various Times after the Injection of 10⁵ PMCs of WBB6F1-GFP Mice.

Days after injection	Muscle				Mucosa			
	Proportion of appearance	No. of mast cells*		AB ⁺ /GFP ⁺ (%)	Proportion of appearance	No. of mast cells*		AB ⁺ /GFP ⁺ (%)
		GFP ⁺	AB ⁺			GFP ⁺	AB ⁺	
1	6/6	3108 ± 308	2798 ± 189	90.1	5/6	293 ± 41	263 ± 35	89.8
3	4/4	2870 ± 362	2531 ± 299	88.2	3/4	292 ± 37	252 ± 35	86.3
7	7/8	4169 ± 476	3711 ± 395	89.0	6/8	304 ± 45	270 ± 29	88.8
14	6/6	7081 ± 482	6943 ± 336	98.1	5/6	429 ± 67	417 ± 53	97.2
35	4/4	10356 ± 981	10211 ± 1254	98.6	3/4	582 ± 95	571 ± 84	98.1

PMCs are 100% GFP⁺ and AB⁺ mast cells.

Each mouse received two injections.

*Total numbers of GFP⁺ and AB⁺ mast cells

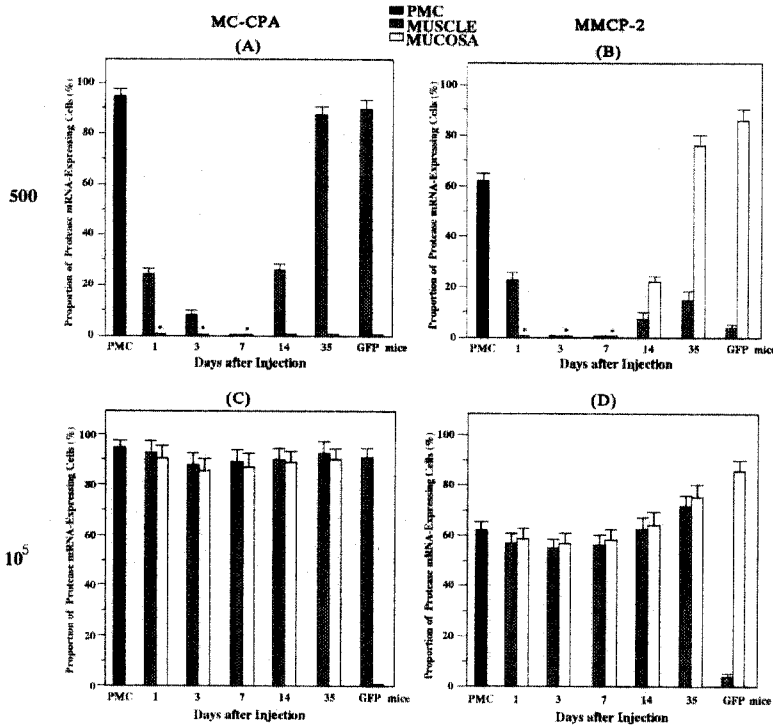


Figure 2. Changes of protease expression after injection of 500 or 10⁵ PMCs from WBB6F1-GFP mice into the stomach of WBB6F1-*W/W*['] mice. A: Proportion of MC-CPA mRNA⁺ cells to GFP⁺ cells after injection of 500 PMCs. B: Proportion of MMCP-2 mRNA⁺ cells to GFP⁺ cells after injection of 500 PMCs. C: Proportion of MC-CPA mRNA⁺ cells to GFP⁺ cells after injection of 10⁵ PMCs. D: Proportion of MMCP-2 mRNA⁺ cells to GFP⁺ cells after injection of 10⁵ PMCs. Asterisk indicate absence of GFP⁺ mast cells.

GFP⁺에 대한 프로테아제+의 비를 계산하였다. MC-CPA mRNA를 발현하는 복강비만세포 500개를 이식하였을 때 근육층에 MC-CPA mRNA⁺ 세포의 비는 1일에 23.0%이었으나 이것은 7일에 사라졌다가 14일에 26.0%, 35일에 89.0%로 증

가하였다 (Figure 2A). 짐작층에서는 1일에서 7일까지 GFP⁺ 비만세포를 전혀 발견할 수 없었으나 14일, 35일에 GFP⁺ 비만세포가 나타났다. 그러나 MC-CPA mRNA의 발현은 검출되지 않았다 (Figure 2A). WBB6F1-GFP의 근육에 있는 비만

세포는 MC-CPA mRNA를 발현하나 점막층에 있는 비만세포는 발현하지 않았다.

다음에는 MMCP-2 mRNA⁺ 비만세포의 비를 검토하였다. MMCP-2 mRNA를 발현하고 있는 복강비만세포의 이식후 근육층에 있는 MMCP-2 mRNA⁺ 세포의 비는 1일에 22.0% (Figure 2B)였으나 7일에 사라졌다가 14일에 8.0%, 35일에 15.0%로 약간 증가하였다. 반면에 점막층에서는 MMCP-2 mRNA⁺ 비만세포는 1일, 7일에는 거의 발현하지 않았으나 14일과 35일 사이에 현저히 증가하였다 (Figure 2B). WBB6F₁-GFP의 근육층에 있는 비만 세포는 MMCP-2 mRNA를 약간 발현하나 점막층에 있는 비만세포는 상당히 많이 MMCP-2 mRNA를 발현하였다. 이와같이 500개 복강비만세포를 이식한 후 14일부터 프로테아제 발현 표현형이 WBB6F₁-GFP에 있는 비만세포 표현형처럼 변했음을 시사한다.

10⁵ 복강비만세포를 이식하였을 때는 1일에서 35일까지 근육 및 점막층에서 나타난 MC-CPA mRNA⁺ 비만세포의 비는 85.0% 이상 이었다. 이것은 WBB6F₁-GFP의 점막층에 있는 MC-CPA mRNA⁺ 세포보다 10⁵ 복강비만세포를 이식한 WBB6F₁-W/W⁺ 마우스의 점막층에 있는 MC-CPA mRNA⁺ 세포가 현저히 많음을 보여주었다 (Figure 2C). 그 다음 10⁵ 복강비만세포를 이식하였을 때 1일에서 35일까지 MMCP-2 mRNA⁺ 세포는 근육층 및 점막층에서 발견되었다. WBB6F₁-GFP의 근육층에 있는 비만세포는 MMCP-2 mRNA를 약간 발현하나 WBB6F₁-W/W⁺ 마우스의 위 근육층에 있는 비만세포는 MMCP-2 mRNA를 55% 이상 발현하였다 (Figure 2D). 위의 결과들은 복강비만세포의 프로테아제 발현 표현형이 500개를 이식하였을 때는 이식한 부위에서 적응하였으나 10⁵ 복강비만세포를 이식하였을 때는 이식한 부위에 적응하지 못하였음을 의미하였다.

결론

MC-CPA와 MMCP-2 mRNA를 발현하고 있는 WBB6F₁-GFP의 복강비만세포 500개와 10⁵개를 WBB6F₁-W/W⁺ 마우스의 위벽에 이식하였다. 10⁵개 복강비만세포를 이식하였을 때 복강비만세포의 프로테아제 발현 표현형은 근육층이나 점막층에서 변하지 않았다 (MC-CPA⁺/MMCP-2⁺). 한편 500 복강비만세포를 이식하였을 때는 근육층에서는 MC-CPA⁺/MMCP-2, 그리고 점막층에서는 MC-CPA⁺/MMCP-2⁺으로 변하였다. 장막, 결합조직, 점막형 비만세포에서 프로테아제 발현 표현형에서의 차이는 이전의 결과와 일치하였다^{10,17}. 또한 프로테아제 발현 표현형은 적은 수의 복강비만세포를 이식하였을 때만 변한다는 것도 이전의 결과와 일치하였다^{14, 17}.

10⁵개 복강비만세포를 이식하였을 때 근육과 점막층에 있

는 GFP⁺ 세포수는 이식 1일후에 최대였으며 그후 변하지 않았다. AB⁺, MC-CPA⁺, MMCP-2⁺ 세포수도 변하지 않았기 때문에 이식된 복강비만세포가 정착후에도 프로테아제 발현 표현형을 계속 유지하고 있음을 시사한다. 500개 GFP⁺ 복강비만세포가 이식되었을 때 1일에 근육층에서 20개 이하가 발견되었으나 35일에는 증식하여 이식한 복강비만세포의 수를 초과하였다. 그러므로 35일에 근육층에 발견된 GFP⁺의 대부분은 이식한 복강비만세포로부터 새로 증식한 것임을 나타내었다. GFP⁺와 MC-CPA mRNA⁺의 비는 7일 까지 감소하였으나 그 후에는 증가하였다. MC-CPA⁺/MMCP-2⁺를 갖는 복강비만세포는 7일동안 죽거나 원래의 표현형을 잃어 버렸을 가능성이 있다. 생존한 GFP⁺ 세포로부터 증식한 비만세포는 근육층에서 새로운 표현형 MC-CPA⁺/MMCP-2⁺을 나타내었다. 우리는 이미 이 가능성을 제안하였고 본 연구는 그것을 더 분명하게 증명하였다.

500개 복강비만세포를 이식후 1, 3, 7일에 GFP⁺ 세포는 WBB6F₁-W/W⁺ 마우스의 점막에서 검출되지 않았다. 점막층에 있는 MC-CPA⁺/MMCP-2⁺ 표현형의 비만세포는 근육층에서 유주해 온 적은 수의 MC-CPA⁺/MMCP-2⁺형 복강비만세포인 것 같다. 유주중 원래의 표현형인 MC-CPA⁺/MMCP-2⁺을 잃고 점막층에서 새로 증식한 비만세포는 MC-CPA⁺/MMCP-2⁺ 표현형을 얻은 것 같다. 이러한 결과는 우리가 이미 보고한 결과와 같다^{10,17}. 우리는 기존의 실험에서 이식한 복강비만세포 운명을 순차적으로 검토하지 않았고 AB로만 비만세포를 검토하였기 때문에^{14,17} 본 연구에서는 복강비만세포의 프로테아제 표현형의 변화 과정을 더 확실하게 보여 주었다.

본 연구는 이식한 비만세포의 운명을 연구하는데 GFP 유전자 도입마우스의 유용성을 분명하게 보여 주었다. GFP⁺ 복강비만세포를 이용함으로써 이식한 복강비만세포의 소실과 그의 탈과립을 구별할 수 있었고 두 과정이 이식후 일어나지만 최소한 적은 수의 탈과립한 복강비만세포가 이식 부위에 남아 새로운 표현형을 얻어 새로운 환경에 적응하는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

WBB6F₁-GFP마우스를 제공해 주신 Okabe (Osaka University, Japan) 박사님께 감사드립니다. 이 논문은 2001년도 원광대학교 교내연구비의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Reynolds DS, Stevens RL, Gurley DS, *et al.* Isolation and

- molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A: a novel member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem*, 264:20094-20099, 1989.
2. Serafin WE, Reynolds DS, Rogelj S, et al. Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. *J Biol Chem*, 265:423-429, 1990.
 3. Serafin WE, Sullivan TP, Conder GA, et al. Cloning of the cDNA and gene for mouse mast cell protease 4: Demonstration of its late transcription in mast cell subclasses and analysis of its homology to subclass-specific neutral proteases of the mouse and rat. *J Biol Chem*, 266:1934-1941, 1991.
 4. Reynolds DS, Gurley DS, Austen KF, et al. Cloning of the cDNA and gene of mouse mast cell protease-6: Transcription by progenitor mast cells and mast cells of the connective tissue subclass. *J Biol Chem*, 266:3847-3853, 1991.
 5. McNeil HP, Austen KF, Somerville LL, et al. Molecular cloning of the mouse mast cell protease-5 gene: A novel secretory granule protease expressed early in the differentiation of serosal mast cells. *J Biol Chem*, 266:20316-20322, 1991.
 6. Huang R, Blom T, Hellman L. Cloning and structural analysis of MMCP-1, MMCP-4 and MMCP-5, three mouse mast cell-specific serine proteases. *Eur J Immunol*, 21:1611-1621, 1991.
 7. McNeil HP, Reynolds DS, Schiller V, et al. Isolation, characterization, and transcription of the gene encoding mouse mast cell protease 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:11174-11178, 1992.
 8. Kasugai T, Oguri K, Jippo-Kanemoto T, et al. Deficient differentiation of mast cells in the skin of *mi/mi* mice: Usefulness of *in situ* hybridization for evaluation of mast cell phenotype. *Am J Pathol*, 143:1337-1347, 1993.
 9. Isozaki K, Tsujimura T, Nomura S, et al. Cell type-specific deficiency of *c-kit* gene expression in mutant mice of *mi/mi* genotype. *Am J Pathol*, 145:827-836, 1994.
 10. Jippo T, Tsujino K, Lee YM, et al. Expression of mast-cell-specific proteases in tissues of mice studies by *in situ* hybridization. *Am J Pathol*, 150:1373-1382, 1997.
 11. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802-805, 1994.
 12. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, et al. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*, 407:313-319, 1997.
 13. Yurt RW, Leid RW, Austen KF, et al. Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J Biol Chem*, 252:518-521, 1977.
 14. Sonoda S, Sonoda T, Nakano T, et al. Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cells in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient *W/W^v* mice. *J Immunol*, 137:1319-1322, 1986.
 15. Jippo T, Ushio H, Hirota S, et al. Poor response of cultured mast cells derived from *mi/mi* mutant mice to nerve growth factor. *Blood*, 84:2977-2983, 1994.
 16. Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, et al. Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by *in situ* hybridization. *J Cell Biol*, 106:441-450, 1988.
 17. Lee YM, Jippo T, Kim DK, et al. Alteration of protease expression phenotype of mouse peritoneal mast cells by changing the microenvironment as demonstrated by *in situ* hybridization histochemistry. *Am J Pathol*, 153:931-936, 1998.