

審査の結果の要旨

氏名 細野 浩之

マスト細胞は、細胞表面の IgE 受容体に結合した IgE が抗原により架橋されると脱顆粒し、ヒスタミンやセロトニンなどの生理活性物質を放出して即時型アレルギーを引き起こす。しかしラット腹腔由来のマスト細胞では、抗原による IgE の架橋だけでは脱顆粒を起こさず、リゾホスファチジルセリン (lysoPS) の添加が必要である。この反応は他のリゾリン脂質では起こらず、lysoPS に特異性の高い反応であることから、マスト細胞上に“lysoPS の標的分子”の存在が想定されているが、その分子の実体は全くわかっていない。生体内でマスト細胞が脱顆粒反応を起こすためには lysoPS が何らかのメカニズムで供給される必要があるが、その産生経路も不明である。本論文においては、ラット腹腔マスト細胞をモデルとし、lysoPS の産生機構及び作用機構についての解析を行っている。

① lysoPS の産生機構についての解析

ラット腹腔より調製したマスト細胞は、単に IgE 受容体架橋を行っても脱顆粒反応を起こさず、さらに lysoPS を添加することではじめて脱顆粒が引き起こされる。しかし本論文において、カゼインで腹膜炎を惹起したラット腹腔から採取したマスト細胞は、IgE 受容体を架橋する ConA で刺激すると lysoPS 添加なしでも脱顆粒反応が引き起こされることを見出した。このことからカゼイン腹膜炎ラットの腹腔内では何らかのメカニズムによって lysoPS が産生されているということが示唆された。ところで、カゼイン投与により炎症を惹起した腹腔内には、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A₁ (PS-PLA₁) が誘導されてくることを当教室で見出していることから、この酵素が lysoPS を産生してマスト細胞を活性化できるかどうか検討した。その結果、ConA 刺激と同時にリコンビナント PS-PLA₁ を加えておくと、lysoPS 添加なしでマスト細胞が活性化することがわかった。PS-PLA₁ と同様、カゼイン腹膜炎腹腔内に誘導されることが知られている IIA 型 PLA₂ (sPLA₂-IIA) についても検討したが、PS-PLA₁ の方がはるかに効率よくマスト細胞を活性化した。この系において実際に lysoPS が産生されているかマススペクトロメトリーを用いた解析を行ったところ、PS-PLA₁ 処理により、ConA 刺激したラット腹腔細胞からのみ、16:1, 18:1 の脂肪酸を有する lysoPS を示すピークが検出された。ConA 刺激しない細胞からは、PS-PLA₁ を添加しても lysoPS は全く検出されなかった。さらに、アネキシン V を用いて細胞膜上の PS を検出したところ、ConA 刺激すると腹腔細胞表面に PS が露出してくることがわかった。以上の結果から、ConA 刺激により腹腔細胞の細胞表面に PS が露出してくること、PS-PLA₁ はこの露出した PS を分解し、lysoPS を産生することが明らかになった。

② lysoPS の作用機構についての解析

マスト細胞の脱顆粒のメカニズムについては、種々の細胞内タンパク質のチロシンリ

ン酸化と、未知のチャネルを介した Ca^{2+} の流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が重要なステップであるとわかっている。本論文では、lysoPS がこれらのシグナリング機構にどのように関与するのか検討を行った。まずラット腹腔マスト細胞の細胞内タンパク質のチロシンリン酸化を解析したところ、lysoPS は全く影響を与えないことがわかった。次に、蛍光 Ca^{2+} 指示薬をマスト細胞に取り込ませて細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。その結果、lysoPS と ConA を同時に添加したときにのみ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的な上昇が観察された。実際、この条件でのみ脱顆粒反応が見られることから、マスト細胞内の持続的な Ca^{2+} 濃度上昇が脱顆粒反応の引き金と考えられた。

次に、lysoPS をマスト細胞に添加後、時間を経過した後に ConA を添加したところ、両者を同時に添加したときとほぼ同等の細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的な上昇及び脱顆粒反応が見られた。このことから、ラット腹腔マスト細胞の活性化には、lysoPS は ConA と同時に与えられる必要はなく、ConA 刺激に先立って与えられていけばよいということ、想定される“lysoPS の標的分子”は、マスト細胞周囲に lysoPS が存在し続けても脱感作せず ConA 刺激とともに脱顆粒を起こすことから、これまでに発見されている他のリゾリン脂質受容体とは異なる性質を持つ分子であると推測された。

さらに、非天然型の D-serine を持つ lysoPS は天然型の L-serine 型 lysoPS に比べて脱顆粒促進能は著しく弱いことが確認され、このときの細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的上昇も低いことがわかった。従って、“lysoPS の標的分子”は lysoPS の高次構造を厳密に認識していると考えられた。

以上、本論文において、PS-PLA₁ は、ConA 刺激によりラット腹腔細胞の細胞膜上に露出した PS を加水分解して lysoPS を産生し、マスト細胞に供与することを示した。供与された lysoPS はその細胞表面に長時間結合し続け、その状態で IgE 受容体が架橋されることが脱顆粒反応が起こるために必須であると考えられた。炎症局所においては、PS-PLA₁ が存在すると同時に、アポトーシスやサイトカイン刺激により、PS が細胞表面に露出した細胞が多く見出される。このような場所で産生された lysoPS がマスト細胞に作用すると、マスト細胞は IgE 受容体架橋によって極めて脱顆粒しやすくなると考えられる。カゼイン腹膜炎ラットの腹腔マスト細胞は、おそらくこのようなメカニズムによって既に lysoPS を供給されていたため、IgE 受容体架橋のみで脱顆粒反応が引き起こされたのではないかと予想される。以上のような結果から、IgE だけでなく lysoPS もマスト細胞の感作状態を作りうる因子であるという可能性が想定できる。さらに、“lysoPS の標的分子”は IgE 受容体架橋から始まるシグナルと協調して形質膜上の Ca^{2+} チャネルを開口することがわかった。従って“lysoPS の標的分子”は Ca^{2+} チャネル自身か、またはその調節因子であるという可能性がある。

以上の知見は生理活性脂質としての lysoPS の生理機能解明に対して重要な情報を与え、さらにマスト細胞を含む生理現象の理解に有益な手がかりを提供するものであり、博士(薬学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。