

審査の結果の要旨

氏名 小笠原英明

本研究は気管支喘息などアレルギー性疾患の発症において重要な役割を演じていると考えられるシステイニルロイコトリエンの受容体 (CysLT1, CysLT2) について機能解析を行うため、マウスCysLT1, CysLT2をクローニングし、その性質を明らかにしたものである。以下の結果を得ている。

- 以下の3つのクローンからmCysLT1の配列を決定した。mCysLT1は339アミノ酸残基からなり、ヒトオルソログとの同一性が87%だった。129とC57BL/6とBALB/cでアミノ酸配列が完全に一致していた。
 - ヒトCysLT1の翻訳領域 (open reading frame, ORF) 内581塩基対を鋳型に [α - 32 P]dCTPでラベルしたDNAをプローブとして用い129マウス由来のマウスゲノムライブラリーをスクリーニングして単一クローンを得た。
 - C57BL/6マウスゲノムからmCysLT1特異的プライマーを用いpolymerase chain reaction (PCR) により増幅した産物をTAクローニングした。
 - NCBIのデータベースを検索中ヒトCysLT1と88.4%の相同性があるマウスcDNAクローン (1661 bp) を発見し、これを入手した (BALB/c)。
- 129とC57BL/6の2系統のマウスから以下の2通りの方法でmCysLT2をクローニングし配列を決定した。mCysLT2は309アミノ酸残基からなり、ヒトオルソログとの同一性が73%だった。系統間の違いとしては203番目のアミノ酸が129でイソロイシン、C57BL/6でバリンだった。
 - ヒトCysLT2全長ORFを鋳型に合成したDNAプローブで129マウスのゲノムライブラリーをスクリーニングし単一クローンを得た。
 - C57BL/6ゲノムをmCysLT2特異的プライマーでPCRした産物をTAクローニングした。
- mCysLT1を安定発現させたHEK-293細胞にカルシウム感受性蛍光色素Fura-2を取り込ませ、リガンドを投与したときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。mCysLT1はLTD4に対して濃度依存性のカルシウム上昇を示した。LTC4に対してもLTD4に比べて小さいが濃度依存性の反応がみられた。LTB4, LTE4に対しては反応がみられなかった。LTD4に対する反応はCysLT1の特異的アンタゴニストであるプラニルカストおよびMK-571で阻害された。mCysLT2を安定発現させたCHO細胞のカルシウム応答を同様に測定した。mCysLT1とは逆に、LTC4のほうがLTD4より大きい濃度依存性の反応を惹起した。プラニルカストはヒトCysLT2を阻害しないCysLT1特異的アンタゴニストとして知られているが、意外なことにmCysLT2のLTC4に対する反応はプラニルカストにより濃度依存的に阻害された。一方、同じくCysLT1特異的アンタゴニストとして知られるMK-571はmCysLT2のLTC4に対する反応を阻害しなかった。以上のようにCysLT2に対する拮抗薬の作用がヒトとマウスの種間で異なることが明らかとなった。

最終試験の結果の要旨

氏名 小笠原英明

試験は平成15年1月20日に東京大学医学部教育研究棟2階セミナー室 (2) において行われた。審査委員は、論文提出者に対し、学位請求論文の内容および関連事項について質問と討議を行い、本人の学識と提出論文を審査した。その結果、全員一致で最終試験に合格と判定した。

4. 神経細胞成長因子の刺激により転写が促進される遺伝子 nerve growth factor - induced gene (NGFI-A) のプロモーター領域zif268を上流に配したルシフェラーゼ遺伝子をレポーターに用い、リガンドに対する受容体の反応をルシフェラーゼ活性として測定した。mCysLT1とzif268/ルシフェラーゼをトランスフェクションしたB103細胞はLTD4に対して濃度依存的にルシフェラーゼ活性の上昇を示し、この反応はプラシルカストとMK-571により阻害された。mCysLT2とzif268/ルシフェラーゼをトランスフェクションしたPC12細胞はLTC4に対して濃度依存的にルシフェラーゼ活性上昇を示した。細胞内カルシウム定量の結果同様、LTC4に対する反応がプラシルカストにより阻害されたが、MK-571には阻害されなかった。
5. C57BL/6と129の2系統のマウスを用いノザンブロットティングを行ったところ、mCysLT1, mCysLT2いずれも各臓器において129よりC57BL/6で強く発現しており、マウス系統間で違いがあることが分かった。mCysLT1は肺、小腸、皮膚に、CysLT2は肺、脾臓、腎、小腸、皮膚その他の臓器に広く発現がみられた。ヒト脾臓はCysLT1の発現が最も多い臓器のひとつであるが、マウス脾臓におけるCysLT1の発現は少量だった。また、ヒト心筋にはCysLT2が高発現だが、マウスではほとんどみられなかった。
6. 定量的RT-PCRを用いマウスマクロファージ、副腎でのCysLTの発現を調べた。マクロファージにはmCysLT1の高い発現を認めたが、副腎には少なくとも脾臓以下の発現しかみられなかった。mCysLT2はマクロファージ、副腎いずれでも発現が乏しかった。
7. 繊維芽細胞はシステイニルロイコトリエンに反応してコラーゲンの産生を亢進させることが知られているが、細胞に受容体が発現していることを示した報告はこれまでなかった。マウス皮膚の *in situ* hybridizationを行った結果、皮下組織の繊維芽細胞にCysLT1, CysLT2とも発現していることが明らかとなった。

以上、本論文はマウスのシステイニルロイコトリエン受容体mCysLT1, mCysLT2について、その配列、受容体としての性質、臓器発現を明らかにした。本研究はアレルギー性疾患の発症に大きな役割を果たしているシステイニルロイコトリエン受容体について、遺伝子欠損マウスを使った機能解析など将来の研究の基礎をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。