

審査の結果の要旨

氏名 加納 亮

ムチンは粘液の主要な構成成分として微生物やアレルゲン物質の付着や物理的な刺激から上皮組織を防御していると考えられている。また、ムチンは糖鎖構造及びそのコアのポリペプチドの種類が、上皮の種類に特異的であることが知られている。したがって、外界に対する防御応答に際して、ムチンの種類やその糖鎖がどのように変化するかは極めて重要な未解決の問題である。「上皮細胞の防御応答に伴うムチン及びO-結合型糖鎖の生合成調節」と題する本研究では、種類の異なるムチンコアのポリペプチド遺伝子及び糖鎖部分の生合成の第一段階である、UDP-GalNAc:polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase(ppGalNAc-T)遺伝子のアイソマーの発現レベルが上皮の防御応答時に変化すること、またそれに伴って産生されるムチンに構造的な変化が起こることを明確に示した研究成果が述べられている。具体的には、(1) ヒト大腸上皮組織においてムチン分泌を主に担う杯細胞の分化形質を持つヒト大腸癌細胞株であるLS174T細胞において、Th2系サイトカインによってムチンコアポリペプチド及びppGalNAc-Tの発現が変化するか、またその結果としてムチンコアペプチドへの糖鎖の付加状態が変化するか、を解明すること、(2) マウスのアレルギー性下痢モデルで、上皮細胞に同様な変化が見られるかどうかを検証すること、の2点を目的としている。またその前提として、高感度で特異的に異なる多種類のムチンコアポリペプチド及びppGalNAc-Tの遺伝子の発現レベルを比較するためにこれらの遺伝子の定量的な競合RT-PCR法を構築している。

第1章では、PCR法で競合DNA鎖を作製する手法を用い、ppGalNAc-Tおよびムチン遺伝子発現量の定量系を確立しこれを利用してmRNA量を測定した例について述べられている。既知のppGalNAc-Tアイソマーのうち8種(ppGalNAc-T1-4、6-9)とムチン遺伝子のうち7種(MUC1-4、5AC、5B、6)について定量的PCR系を確立した。また、ヒト遺伝子との相同性に基づき、新規のマウスppGalNAc-T2、T7の遺伝子配列をクローニングして用いている。マウスについては、これら新規のppGalNAc-Tを含めたアイソマー6種(mouse ppGalNAc-T1-4、6、7)とムチンコアポリペプチド遺伝子7種(mouse MUC1-4、5AC、5B、6)について定量的PCR系を確立した。この遺伝子発現定量系を用いて、ヒトおよびマウスの大腸癌細胞株についてppGalNAc-Tとムチンコアポリペプチド遺伝子の発現量が非常に低レベルであるにも関わらず正確に定量できることが述べられている。

第2章では、LS174T細胞をin vitroにおけるモデルとして用いて、IL-4がムチン遺伝子及びppGalNAc-T遺伝子12種類に異なる影響を与えるかどうかを明らかにすることを目的に解

析を行った結果が述べられている。ヒト IL-4 の存在下でそのレセプターを持つ LS174T 細胞を培養し、これらの遺伝子に相当する mRNA 量を定量した。24 時間後に MUC2 をはじめとする分泌型ムチン遺伝子の発現が上昇した。また、ppGalNAc-T の mRNA 発現を調べたところ、ppGalNAc-T1、T4、T7 の発現が有意に上昇し、遺伝子発現上昇のピークは IL-4 添加 6 時間後にあることがわかった。一方で ppGalNAc-T2、T3、T6、T9 の発現は有意な変化をしなかった。種類の異なる ppGalNAc-T の相対発現量の変化がムチンコアポリペプチドに付加する糖鎖の数にどのような影響を与えるかを調べるために、MUC2 コアポリペプチドのタンデムリピート 1 単位に相当する 24 アミノ酸より成る FITC 標識したペプチドを基質として、IL-4 非存在又は存在下で培養した LS174T 細胞マイクロソームを酵素源として GalNAc 転移酵素反応を行ない、生成物を逆相 HPLC で分画し、質量分析によって GalNAc 付加数を決定した。IL-4 を添加した場合に、MUC2 タンデムリピートペプチド配列への GalNAc 付加数の多い生成物が相対的に多く検出され、IL-4 によって細胞が生成するペプチド上の GalNAc 付加の様子が変化することが示された。細胞の分泌するムチンと複数のレクチンの相互作用を一部の ppGalNAc-T 発現が変化した結果、糖蛋白質への O-グリカンの導入のされ方に変化が生じたことを示唆する結果を得た。ppGalNAc-T4 と T7 は、既に GalNAc が付加したペプチドに対してさらに GalNAc を転移し、IL-4 によってこれらの酵素の発現が上昇した結果、ペプチドに付加した GalNAc の数が変化したと考えられた。

第 3 章では、in vivo における腸管アレルギーモデルとして卵白アルブミンを用いた食物アレルギー性下痢マウスモデルを用い、マウスムチンおよび ppGalNAc-T の遺伝子発現を発症前後で比較することを目的とし、研究を行っている。このモデルでは、卵白アルブミンをアジュバントと共に皮下投与した後、これを経口的に週 3 度投与すると 8 回目の投与から下痢が起きた。下痢発症マウスでは、コントロールに比べてマウス MUC2 の mRNA 発現量が上昇していた。また ppGalNAc-T に関しては、マウス ppGalNAc-T1 の発現量が下痢発症マウスで高かった。

以上のように本研究で学位申請者は、研究遂行時までに発見されていた全てのムチンコアポリペプチド及び ppGalNAc-T の遺伝子について遺伝子発現定量系を確立した。消化管粘膜上皮細胞が Th2 系サイトカインである IL-4 に応答して、分泌型ムチンの mRNA 量を上昇させるだけでなく、特定の ppGalNAc-T の発現を誘導することによってムチン上の糖鎖密度を変化させることを示した。さらに、ムチンの糖鎖密度が実際に変化することを無細胞系の実験によって証明した。これらの成果は粘膜における防御応答や、食物アレルギーや消化管への感染における免疫系及びムチンのかかわりを理解して、その知見に基づいて感染症やアレルギーの予防法や治療法の開発を行うために大きく寄与するものである。よって本研究を行なった加納亮は、博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。