

論文の内容の要旨

論文題目：高親和性 IgG 受容体を介した肥満細胞内情報伝達

指導教官：山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名：佐藤 義隆

背景と目的

肥満細胞は高親和性 IgE 受容体(FcεRI)を発現し、抗原特異的 IgE が結合することにより感作される。抗原は IgE-FcεRI を架橋させ細胞活性化の引き金を引き、細胞内情報伝達系によって増幅されたシグナルは細胞を活性化し、多くのプロテアーゼ、炎症メディエーター、サイトカイン、ケモカインの産生、放出を通して、アレルギー性炎症を増悪する。ところが最近になって、マウス、モルモット、イヌ、ヒト肥満細胞には FcεRI だけでなく高親和性 IgG 受容体(FcγRI)も存在し、IgE のみならず IgG を介しても肥満細胞が活性化されている可能性が相次いで報告された。ヒト末梢血幹細胞由来培養肥満細胞、肺由来肥満細胞には FcγRI が少量発現され、IFN-γによってその発現量が著増することが確認され、ヒト肥満細胞は IFN-γ豊富な環境下では、FcεRI だけでなく FcγRI を介して活性化され、アレルギー性炎症に関わっている可能性が示唆されている。歴史的に肥満細胞研究は、ヒト肥満細胞の有用な培養細胞株が得られなかった為、げっ歯類の肥満細胞株で代用されてきた。イヌはヒトと違い肥満細胞腫瘍の発生が極めて多い特性を持ち、肥満細胞株の作製に適していることがよく知られている。CM-MC 細胞(Canine Mastocytoma-derived Mast Cell)はモノマーIgG を介しての脱顆粒が示されたイヌ肥満細胞株で、高親和性 IgG 受容体(イヌ FcγRI)の存在が推測されている。そこで、イヌ FcγRI の発現を確認、その構造と機能を解析し、イヌ FcγRI を介した肥満細胞内の活性化情報伝達を詳細に検討する為、以下の実験を計画した。

方法

胎児ウシ血清 10%含有 RPMI 培地中で CM-MC 細胞(トリプターゼ陽性、キマーゼ陽性、生細胞率 99%以上、倍加時間 52 時間、ヒスタミン含量 0.2 pg/cell)は培養、継代された。CM-MC から抽出された mRNA に対して、ヒト、マウス FcγRIα鎖の cDNA 配列の中で相同性の高い部分から作成したプライマーを用いて RT-PCR を行い、イヌ FcγRI の存在確認を試みた。3'-RACE、5'-RACE により、イヌ FcγRIα鎖の全 cDNA 配列を求めた。イヌ IgG とイヌ FcγRI の結合を FITC 標識抗イヌ IgG による蛍光染色によ

り確認した。¹²⁵I 標識イヌ IgG のイヌ FcγRI への結合試験の結果を Scatchard 解析し、モノマーイヌ IgG とイヌ FcγRI との親和性と細胞あたりの受容体数を算定した。イヌ IgG を結合させたイヌ FcγRI を抗イヌ IgG で架橋することにより惹起される細胞内蛋白質チロシンリン酸化を評価する為、可溶化した細胞に SDS-PAGE を施行後、ニトロセルロース膜にウエスタンブロットを行い、抗リン酸化チロシン抗体を一次抗体としたラジオリミノグラフィーで解析した。このチロシンリン酸化に対して、キナーゼ阻害剤(スタウロスポリン)と Syk 特異的阻害剤(ER-27319)にて阻害を試みた。イヌ FcγRI を介した細胞内 Ca²⁺濃度上昇を観察するため、イヌ IgG と反応させ、Ca²⁺指示薬(Fura-2)を取り込ませた細胞上のイヌ FcγRI を抗イヌ IgG で架橋し、蛍光光度計にて経時的に Ca²⁺濃度を測定した。細胞内 Ca²⁺貯蔵器官からの放出による Ca²⁺濃度上昇を観察するため、1mM の EGTA を使って細胞外液の Ca²⁺をすべてキレートした後、イヌ FcγRI を架橋した。Store Operated Ca²⁺ Channel を介した細胞外から内への Ca²⁺流入現象を、細胞外 Ca²⁺非存在下でイヌ FcγRI を架橋後、Ba²⁺を外液に加える事で確認を試みた。イヌ FcγRI を介した脱顆粒に対する細胞外 Ca²⁺の影響をヒスタミン遊離で定量した。イヌ FcγRI はヒト IgG に対しても結合性を示した為、正常人血清由来ポリクローナル IgG、ミエローマ患者血清尿由来モノクローナル IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄と反応させたイヌ FcγRI に対し、抗ヒト IgG での架橋を試み、Ca²⁺応答と脱顆粒を定量した。

結果

RT-PCR では予想された 340 塩基対の DNA 断片の増幅が観察された。イヌ FcγRIα 鎖の全 cDNA 配列は 1119 塩基対(遺伝子バンク登録番号 AB101519)でヒト、マウス FcγRIα 鎖の cDNA に対し 84、78%の相同性を持っていた。予想された一次アミノ酸配列はそれぞれ 72、63%の相同性を有していた。種間での高度な保存が確認された六つのシステイン残基はイヌ FcγRIα 鎖の細胞外部位に、FcγRIα 鎖に特徴的とされる三つの免疫グロブリン類似構造を形作っていた。イヌ FcγRI はモノマーイヌ IgG、モノマーヒト IgG 双方との高い親和性(結合反応平衡定数 = $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)を示し、細胞表面上の受容体数はヒトマクロファージ等と同程度に十分量の発現(8×10^4 /cell)が認められた。FACS 解析によってもモノマーイヌ IgG、モノマーヒト IgG 双方とイヌ FcγRI との結合性は明らかであった。イヌ FcγRI を介した細胞内蛋白質チロシンリン酸化では、イヌ FcγRI の架橋後 1~5 分で 38、62、70、80kDa の細胞内蛋白質チロシンリン酸化反応亢進が観察され、そのすべてがスタウロスポリンによって阻害された。Syk 特異的阻害剤によって 70、38kDa の蛋白のチロシンリン酸化が阻害された。70 kDa は抗 Syk 抗体との交叉反応性が認められた。イヌ FcγRI を介した細胞内 Ca²⁺濃度上昇は抗イヌ IgG による架橋直後より認められ、数十秒間の急速上昇(初期相)の後、緩徐な増加(後期相)に転じ、二相性の上昇パターンを示した。安静時 20~30 nM であった細胞内 Ca²⁺濃度は、架橋後 150 秒間で 200~300 nM まで上昇した。細胞外 Ca²⁺非存在下におい

てイヌ Fc γ RI を架橋した場合の細胞内 Ca²⁺濃度上昇は架橋後約 40 秒でピークを迎える一過性の応答であった。細胞外 Ca²⁺非存在下でイヌ Fc γ RI 架橋後に外液に Ba²⁺を加えると、Ba²⁺は急速かつ持続的に細胞内に取り込まれた。イヌ Fc γ RI を介した脱顆粒に最適な細胞外 Ca²⁺濃度は 1mM であり、細胞外 Ca²⁺非存在下では脱顆粒は認められなかった。ヒト IgG サブタイプを介した肥満細胞活性化試験において、Ca²⁺応答、脱顆粒反応共に、ヒト IgG₁、IgG₄ で感作し、抗ヒト IgG で架橋した場合、最も顕著に細胞が活性化された。

考察と結論

モノマーIgG を介して活性化されるイヌ肥満細胞株(CM-MC)にヒト、マウスの Fc γ RI に相当する高親和性 IgG 受容体(イヌ Fc γ RI)の発現が確認され、ヒト Fc γ RI α 鎖と 72%と高いホモロジーを認めた。種間での高度な保存が確認されている六つのシステイン残基はイヌ Fc γ RI α 鎖の細胞外部位に三つの免疫グロブリン類似構造を形作り、Fc γ RI α 鎖に特徴的な構造を示した。結合実験によりイヌ Fc γ RI はイヌ IgG のみならずヒト IgG をも高親和性に結合することが示された。イヌ Fc γ RI を架橋することにより、細胞内に活性化シグナルが伝達され、速やかに 4 種の細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応が惹起され、Syk 等の関与が推測された。イヌ Fc γ RI の架橋はさらに、小胞体などの細胞内の Ca²⁺貯蔵器官からの Ca²⁺動員とそれに引き続いた Store Operated Ca²⁺ Channel を介した細胞外からの Ca²⁺流入現象を引き起こした。イヌ Fc γ RI の架橋が引き金となり細胞内に活性化シグナルが伝達され最終的に細胞外 Ca²⁺依存的な脱顆粒を呈した。Fc ϵ RI と Fc γ RI はいずれも分子内に 2 つの γ サブユニットを持ち、それを通じて細胞内に情報伝達することが知られている。CM-MC 内のチロシンリン酸化反応と Ca²⁺応答、脱顆粒現象は、既に知られている肥満細胞内の Fc ϵ RI を介した情報伝達と相似するものであり、 γ サブユニット以降の細胞内経路は共有される部分が多いことが示唆された。4 種のヒト IgG サブタイプの中でヒト IgG₁ と IgG₄ はイヌ肥満細胞を強く活性化し、レアギン抗体として作用する可能性が示された。CM-MC 細胞は培養法が簡便で実験再現性に優れた肥満細胞株であり、モノマーIgG を高親和性に結合し得ることから、今後 IgG を介したアレルギーを研究する基礎的な培養細胞系を提供できるものと思われる。