

審査の結果の要旨

氏名 佐藤義隆

本研究は、即時型アレルギー発症に決定的な役割を果たしている肥満細胞に於いて、最近、新たに発見された活性化経路である高親和性IgG受容体を介した細胞内情報伝達の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 実用化されたヒト肥満細胞株が得られていない現況下で、ヒトに近い遺伝子、体型、寿命を持ち、ヒト類似のアレルギー症状を呈し、多くのアレルギー疾患のモデル動物として既に採用されているイヌに着目し、イヌの肥満細胞株(CM-MC)におけるイヌ高親和性IgG受容体(イヌFcγRI)の構造と機能の解析及びイヌFcγRIを介した細胞内情報伝達の検討を行った。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をプライマーにしRT-PCRを行った結果、予想された340塩基対の長さのDNA断片の増幅が観察された。3'-RACE、5'-RACEにより決定されたイヌFcγRIα鎖の全cDNA配列は1119塩基対(遺伝子バンク登録番号AB101519)から成り、ヒト、マウスFcγRIα鎖cDNAに対し、84、78%の相同性を有していた。塩基配列から予想されたイヌFcγRIα鎖一次アミノ酸配列は372アミノ酸から構成され、ヒト、マウスFcγRIα鎖と72、63%のホモロジーを認めた。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鎖の細胞外部位に三つの免疫グロブリン類似構造を形作っていた。これはFcγRIα鎖に特徴的な構造である。¹²⁵I標識IgGのイヌFcγRIへの結合試験の結果をScatchard解析した所、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 = $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)が証明され、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($8 \times 10^4 / \text{cell}$)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との結合性が証明された。

2. 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、38、62、70、80 kDa の細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応の上昇が観察され、70、38 kDa が Syk 特異的阻害剤によって阻害された。抗 Syk 抗体との交叉反応性の認められた 70 kDa は Syk、38 kDa は Syk の下流に位置する MAPK と推測された。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、急速で持続的な細胞内カルシウム濃度上昇が惹起され、初期急速上昇相と後期漸増相が観察された。細胞外液中のカルシウムイオンを完全にキレートすることで、後期漸増相が消失し、Store Operated Ca²⁺ Channel (SOCC)を介した細胞外から内への Ca²⁺流入現象が示唆された。Ba²⁺の細胞内への取り込み実験により SOCC の関与が証明された。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引き起こされる脱顆粒現象は、細胞外 Ca²⁺のキレートで完全に消失し、SOCC を介した Ca²⁺流入現象は肥満細胞脱顆粒にとって必要条件であることが判明した。

3. ヒト IgG サブタイプ(IgG₁~IgG₄)と反応させたイヌ FcγRI に対して、洗浄後、抗ヒト IgG での架橋による CM-MC の活性化試験を行った結果、細胞内カルシウム応答、脱顆粒共に、ヒト IgG₁、IgG₄と反応させた場合、最も顕著に細胞が活性化され、両者は高親和性 IgG 受容体を発現する肥満細胞にとってレアギン抗体として作用する可能性が新たに示された。

以上、本論文はイヌ肥満細胞株(CM-MC)を用いて、高親和性 IgG 受容体を介した肥満細胞内情報伝達に於ける key molecule であるイヌ FcγRIα鎖の構造を決定し、機能を明らかにしたものである。又、イヌ FcγRI を介した細胞内情報伝達経路に存在する分子群と細胞内カルシウム応答を解明した。さらに、ヒト IgG₁、IgG₄ を介した肥満細胞の活性化を示し、IgG 依存的な肥満細胞の興奮現象に関する新事実を明らかにした。本研究は未知の部分が多く残されている高親和性 IgG 受容体を介した肥満細胞内情報伝達に新知見を提供し得たと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。