

論文内容の要旨

論文題目 A novel mechanism of adhesion of mast cells via the platelet specific, α IIb β 3 integrin

マスト細胞の新しい接着機構の解析

指導教官 北村俊雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 沖 俊彦

1) 序論

マスト細胞は主に IgE を介したアナフィラキシー等の I 型アレルギーや寄生虫感染症におけるエフェクター細胞であるとともに、近年自然免疫、自己免疫疾患、動脈硬化、血管新生、組織修復、移植片に対する反応など、多くの生体反応に関わっている。マスト細胞はインテグリンを中心とした様々な接着分子を発現しているが、これらの分子は細胞外マトリクス、線維芽細胞、血管内皮細胞との接着を担い、マスト細胞の遊走や局在に関与すると同時に、マスト細胞の機能調節にも大きく関わっている。インテグリン α IIb β 3 (CD41, GP-IIb-IIIa)は、 α IIb と β 3 のサブユニットからなり、フィブリノーゲン (FB)、von Willebrand Factor (vWF)、ビトロネクチン (VN) 等と結合し、止血・血液凝固に不可欠な分子として働く。興味深いことにその α サブユニットの α IIb は、発現がほぼ巨核球・血小板に限定されており、巨核球・血小板系の分化においても重要な分子とされてきた。しかしながら最近 α IIb が巨核球・血小板系の細胞だけでなく、血液系の前駆細胞のマーカーであること、さらにマスト細胞と巨核球の前駆細胞との関連が深いことが報告されている。このことに注目し、我々はまずマスト細胞でのインテグリン分子の発現を解析し、 α IIb β 3 が発現していることを見い出した。本研究では、その発現の特性や背景因子について解析するとともに、接着活性とマスト細胞の機能への影響を解析した。

2) 方法と結果

1. マスト細胞におけるインテグリン α IIb β 3 の発現

まずマウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) におけるインテグリン分子を FACS にて解析した。これまで報告のあった $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 αV 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ に加え、血小板特異的な αIIb が高レベルに発現していた。さらに αIIb の発現はマウス腹腔マスト細胞 (PMC) でも確認され、粘膜型及び結合組織型からなるマスト細胞の全てに発現していると考えられた。一方マウス T 細胞、B 細胞、顆粒球、マクロファージといった細胞では、 αIIb の発現は認められなかった。巨核球・血小板以外の細胞では、これまで血液系前駆細胞での αIIb の発現が報告されているが、骨髄細胞に αIIb の発現は認められるものの、一部の細胞に限られ、そのレベルもマスト細胞と比較して極めて微弱であった。また骨髄からマスト細胞をつくる過程で $Fc\epsilon RI^+/c-kit^+$ の細胞群とともに、 αIIb を高発現する群が増加した。以上の結果から巨核球・血小板以外での αIIb の高発現はマスト細胞に限られることが示された。

次に αIIb の発現について転写因子の面から解析を行った。 αIIb の発現は血小板の分化に関わる GATA-1、GATA-2、FOG-1、NF-E2、SCL、Fli-1、Gfi-1b、AML1/RUNX1 等の転写因子によって制御されることが報告されているが、我々は RT-PCR による解析によって、これらの転写因子全てが巨核球だけでなく BMMC においても発現していることを確認した。これはマスト細胞と巨核球の分化が非常に近い関係にあり、血小板特異的と考えられて来た蛋白がマスト細胞にも発現することを裏付けている。

2. マスト細胞におけるインテグリン $\alpha IIb\beta 3$ の接着性

次にマスト細胞におけるインテグリン $\alpha IIb\beta 3$ の接着性について、インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ のリガンドとして知られる FB、vWF、VN、そしてコントロールとしてマスト細胞では主にインテグリン $\alpha 5\beta 1$ のリガンドとして知られるフィブロネクチン (FN) をコーティングしたプレート上でマスト細胞の接着を解析した。IgE+特異抗原、monomeric IgE、SCF、トロンビン、 Mn^{2+} 等の刺激により、全てのリガンドへの接着が認められたが、各種阻害抗体を使用した解析により、FB ではほぼ 100% $\alpha IIb\beta 3$ が、VN ではほぼ 100% $\alpha V\beta 3$ が、そして vWF では双方のインテグリンが同程度に接着に関与することが証明された。一方 FN についてはこれまでの報告通り、 $\beta 1$ インテグリンの関与が認められた。

3. インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ を介した接着とマスト細胞の機能調節

インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ を介した接着がマスト細胞の機能に与える影響について検討するため、FB をコートしたプレートもしくはチャンバーを使ってマスト細胞の遊走、増殖、生存、サイトカイン産生を調べた。各種刺激存在下で無処理プレート上のマスト細胞のものと比較した結果、SCF によるマスト細胞の遊走や増殖が増強されること、SCF 及びトロンビン等の刺激によって産生される IL-6 量が増加することが観察された。同時にこの増強効果が抗インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ 抗体により、完全に阻害されることを確認した。

3) 考察

今回我々は、血小板特異的なインテグリンである $\alpha IIb\beta 3$ が、マスト細胞に高発現すること、また $\alpha IIb\beta 3$ の高発現は巨核球・血小板以外ではマスト細胞に限られることを初めて見出し、機能解析をおこなった。 αIIb の発現は諸説あるものの巨核球系の分化を司る転写因子によって

制御されることが知られている。これまで報告されている転写因子について RT-PCR で解析を行った結果、その全てが巨核球およびマスト細胞に発現しており、 α IIb β 3 のマスト細胞での発現が説明可能であると考えられた。

次に機能解析によって、マスト細胞上の α IIb β 3 は FB、vWF に対する接着分子として働くことを証明した。なお興味深いことにマスト細胞上での α V β 3 は VN、vWF への接着を担うことが観察され、共通のリガンドを持つとされる α IIb β 3 と α V β 3 がリガンドに応じて使い分けされていることを示された。マスト細胞が α IIb β 3、 α V β 3 の双方を発現する特異な細胞であること、同じリガンド特異性を持つとはいえ特定のリガンドに対する affinity の差が α IIb β 3 と α V β 3 との間で存在することが理由として挙げられる。

最後にインテグリンを介した接着は T 細胞、B 細胞、マクロファージ等の免疫担当細胞の機能調節の上で重要であり、マスト細胞においてもインテグリン α 5 β 1 と FN がサイトカイン分泌、生存を増強することや、遊走におけるインテグリン α 4 β 1、 α 5 β 1、 α 4 β 7 の関与が報告されてきた。興味深いことに α IIb β 3 と FB の接着は、SCF によって引き起こされるマスト細胞の遊走や増殖を増強すること、そして SCF 及びトロロンビン等の刺激によって引き起こされる IL-6 分泌を増強することが観察された。一般に SCF によるマスト細胞の遊走・増殖は、寄生虫感染などの炎症に加え、動脈硬化部位へのマスト細胞の集積に重要とされている。一方で FN やその分解産物であるフィブリンはこうした炎症巣や動脈硬化巣に豊富に存在しさらに FB は炎症細胞の炎症巣への浸潤に関与することが報告されている。こうした状況を加味すると、炎症等の病変部位へのマスト細胞の遊走、集積及びそこでのサイトカイン分泌等のマスト細胞機能にインテグリン α IIb β 3 と FB の接着が関与することが考えられる。

4. まとめと今後の展望

本研究は血小板特異的とされてきたインテグリン α IIb β 3 がマスト細胞に発現していることを証明した最初の報告であるとともに、その分子が接着分子として機能を持ち、マスト細胞の関与する反応を制御する分子であることを示した点で、生物学的にも臨床的にも意義深いと考えられた。マスト細胞のインテグリン α IIb β 3 と FB の interaction がもつ生理学的な意味合いは、本質的には *invivo* のシステムでの解析を待たねばならないが、我々の観察結果はその重要性を示唆しており、今後は遺伝子改変マウスやマスト細胞欠損マウスを利用した解析が望まれる。またこれらの結果はマスト細胞の関わる疾病におけるインテグリン α IIb β 3 の関与を示すものであり、近年血栓治療を目的としてインテグリン α IIb β 3 の機能を押さえる薬剤が開発されていることを考えると、マスト細胞が関与する疾患の治療・予防にこうした薬剤が有効である可能性も秘めている。