

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 14 年度博士課程 入学

獣医薬理学教室 岡 竜也

指導教官 尾崎 博

論文題目 マスト細胞脱顆粒機構における細胞骨格系の関与

【緒言】

マスト細胞はアレルギー疾患において重要な役割を担う細胞であり、様々な組織に渡って小血管や細静脈の近傍に位置していることが知られている。マスト細胞の脱顆粒反応は、細胞表面に発現している高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に抗原特異的 IgE が結合し、これらの複合体 (IgE/FcεRI) が抗原により架橋されることで活性化される。この IgE の濃度は、アレルギー疾患の患者の血清では 1 μg/ml に達することも珍しくない。血清 IgE 値が高い個体において様々なアレルギー性疾患が併発することから、IgE そのものが「アトピー素因」であるという概念が提唱されている。最近の研究では、抗原の非存在下において IgE 単独でマスト細胞の生存延長、サイトカイン産生、遊走能増加などが起こることが報告され注目されている。

一方、抗原で活性化されたマスト細胞内では IP₃ が産生され、細胞内 Ca²⁺濃度が増加し、脱顆粒反応が誘起される。細胞内 Ca²⁺濃度の増加機構は、大きく二つに分けることができる。それらは、IP₃による小胞体からの Ca²⁺放出と、細胞外からの Ca²⁺流入である。細胞外からの Ca²⁺流入は、小胞体の Ca²⁺枯渇が引き金となって起こるため、容量依存性 Ca²⁺流入と呼ばれている。細胞外液に Ca²⁺が存在しないと脱顆粒は全く起こらないことから、外液からの持続的な Ca²⁺流入、つまり容量依存性 Ca²⁺流入がマスト細胞の脱顆粒反応に非常に重要であることが知られている。しかし、その活性化機構は未だ明らかになっていない。

ところで、細胞骨格の研究は、「骨格としての形態維持機構」にはじまり、「運動などの細胞機能」といった、より高次レベルでの研究に向かった。しかし、近年まったく新たな

視点から、細胞内 Ca^{2+} 濃度調節機構に細胞骨格が関与している可能性が示唆されている。例えば細胞膜直下に存在する線維状アクチンが、小胞体と細胞膜間の情報伝達の担い手となり容量依存性 Ca^{2+} 流入チャネルの活性化機構に関与している可能性などが示唆されている。さらに $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ が存在する細胞膜上の *lipid raft* に線維状アクチンの末端が接触し、受容体の活性化に関与している可能性なども考えられているが、詳細は明らかになっていない。

【目的】

本研究では、まず IgE 単独の脱顆粒反応への影響を確認することを第一の目的として実験を行った。さらに、線維状アクチンと微小管の二つの細胞骨格に着目し、細胞骨格のマスト細胞 Ca^{2+} 情報伝達系への関与を明らかにすることを第二の目的とした。

【結果と考察】

1) 抗原非存在下における単量体 IgE の脱顆粒誘起

近年、抗原の非存在下においても IgE 単独でマスト細胞の生存延長、サイトカイン産生、遊走能増加などが報告されており注目されている。しかし、IgE 単独の脱顆粒反応への関与は報告されていない。そこで、IgE の脱顆粒誘起能について調べた。

IgE (anti-DNP IgE) をラット白血病好塩基球由来株化マスト細胞 (RBL-2H3 細胞) およびマウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) に処置すると、500 - 5000 ng/ml の濃度で細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加、および脱顆粒が起こった。非特異的に重合してしまっている IgE は $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を架橋してしまうことが知られているため、マスト細胞に IgE を処置する前に HPLC で単量体 IgE を精製した。すると、精製した単量体 IgE を用いても、RBL-2H3 細胞、BMMC 共に細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し、脱顆粒が起こった。以上の結果より、高濃度の IgE は抗原が存在しなくても脱顆粒を起こすことがわかった。

2) IgE により増加する線維状アクチンのマスト細胞活性化抑制作用

IgE によるマスト細胞の活性化機構における細胞骨格の関与を調べるため、IgE で刺激した RBL-2H3 細胞の、線維状アクチン量を測定した。すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加や脱顆粒を誘起したよりも低い濃度の IgE (5 - 5000 ng/ml) で、線維状アクチン量の増加がみられた。この 50 ng/ml IgE による線維状アクチン量の増加を、アクチン重合阻害薬である cytochalasin D (300 nM) は抑制した。さらに、cytochalasin D を処置した細胞では、単独では脱顆粒を起こさなかった 50 ng/ml の IgE でも細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し、脱顆粒が起こった。

以上の結果から、単独では脱顆粒反応を起こさない低濃度の IgE で刺激した細胞でも、線維状アクチン量の増加が起こっており、この線維状アクチンがマスト細胞の活性化を抑制する負のフィードバック機構を担っている可能性が示唆された。 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ は *lipid raft* に存

在する受容体であるが、細胞膜直下に多く存在する線維状アクチンの一端が、lipid raft に接触していることが知られている。これらの知見から、線維状アクチンはその末端が lipid raft に結合することで、lipid raft に存在する FcεRI の凝集を抑制し、マスト細胞の活性化を制御している可能性が示唆された (図 1)。

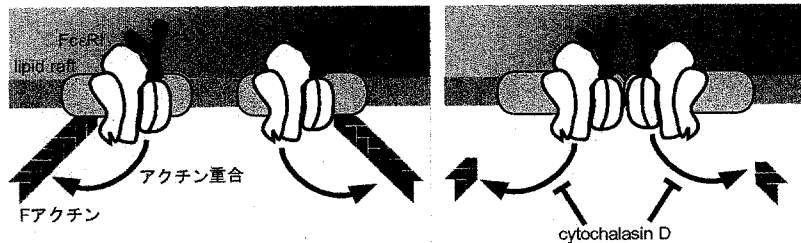


図 1 比較的低濃度の IgE を処置したマスト細胞でもアクチン重合が起こり、これが細胞の活性化を抑制する負のフィードバック機構を担っている可能性が示唆された。

3) 抗原により増加する線維状アクチンの細胞内 Ca^{2+} 濃度制御

抗原でマスト細胞を刺激した際の線維状アクチンの役割について検討した。50 ng/ml IgE を感作させたマスト細胞を抗原で刺激すると、 IP_3 が産生され、小胞体から Ca^{2+} が放出された。このとき線維状アクチン量も増加していた。Cytochalasin D を前処置したマスト細胞を抗原で刺激すると、線維状アクチン量の増加が抑制されると同時に、産生される IP_3 量が有意に増加した。さらに cytochalasin D を前処置した細胞では、抗原刺激による小胞体からの Ca^{2+} 放出速度が増加されることで小胞体の Ca^{2+} 枯渇状態が促進され、容量依存性 Ca^{2+} 流入が増強された。

以上の結果から、抗原で刺激された際に増加するマスト細胞の線維状アクチンは、 IP_3 産生を抑制する負のフィードバック機構を担っていることが示唆された。さらに、抗原刺激時に持続的に産生される IP_3 が、小胞体にとりこまれた Ca^{2+} を再度放出することで小胞体の Ca^{2+} 枯渇を維持し、容量依存性 Ca^{2+} 流入を促進することがわかった (図 2)。

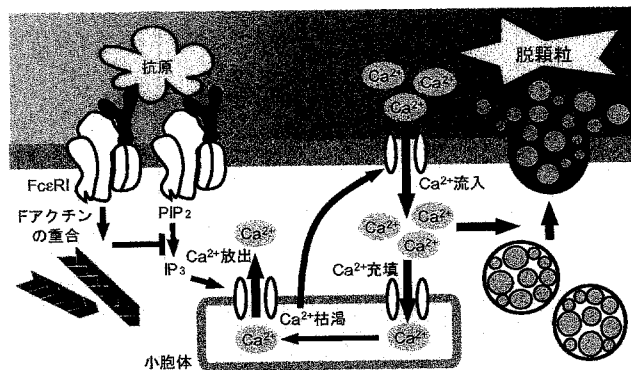


図 2 抗原刺激時に増加する線維状アクチン (F アクチン) が、 IP_3 産生量を抑制する負のフィードバック機構を担っていることが示唆された。

4) 微小管の容量依存性 Ca^{2+} 流入活性化機構への関与

線維状アクチンと共に重要な細胞骨格である微小管の脱顆粒情報伝達系への関与を調べた。微小管脱重合薬である nocodazole および colchicine はマスト細胞の脱顆粒反応を抑制した。Nocodazole や colchicine を前処置したマスト細胞では、抗原で刺激することにより起こる小胞体からの Ca^{2+} 放出は正常に誘起されたが、それに続く Ca^{2+} 流入が著しく抑制された。Nocodazole を前処置したマスト細胞では、小胞体 Ca^{2+} ポンプ ATPase 阻害薬である thapsigargin および cyclopiazonic acid による容量依存性 Ca^{2+} が、nocodazole の処置時間に依存して抑制された。さらに、nocodazole を処置したマスト細胞では、核の近傍に存在する中心体から放射状に存在する微小管構造が消失するとともに、核近傍に多く局在していた小胞体の分布像が消失した。また、同一細胞において小胞体分布の変化を経時的に確認すると、nocodazole の処置時間にともない小胞体の分布が変化することが確認された。最後にラット受身皮膚アナフィラキシー反応を用いて、in vivo におけるアレルギー反応に対する nocodazole および colchicine の作用を確認したところ、これらの薬剤はアレルギー反応を抑制した。

以上の結果より、微小管は小胞体の位置を正常に保つことにより、小胞体の「 Ca^{2+} 枯渇」という情報を細胞膜の容量依存性チャンネルに伝える情報伝達系に関与していることが示唆された。さらに、容量依存性 Ca^{2+} 流入の抑制を標的としたアレルギー反応制御の可能性が示された。

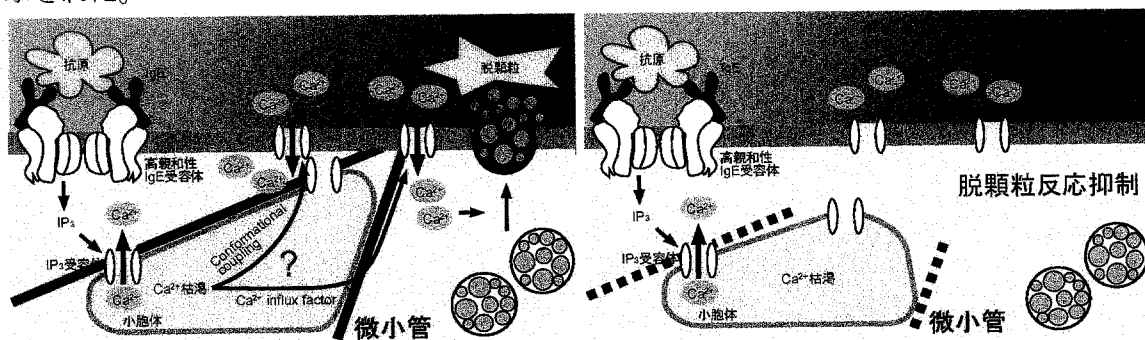


図3 微小管は小胞体の位置取りを正常に保つことで、容量依存性 Ca^{2+} 流入の活性化機構に関与している可能性が示唆された。