

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岡 竜也

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

マスト細胞(肥満細胞)はアレルギー疾患において最も重要な細胞で、その脱顆粒反応は、細胞表面に発現している高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に IgE が結合し、これらの複合体が抗原により架橋されることで活性化される。血清 IgE 値が高い個体において様々なアレルギー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も最近提唱されている。これを裏付けるものとして、抗原の非存在下において IgE 単独でマスト細胞の生存日数を延長したり、サイトカイン産生や遊走能を亢進することなどが報告されている。

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 Ca 濃度が増加し、脱顆粒反応が誘起される。細胞内 Ca 濃度の増加機構は、IP₃ による小胞体からの Ca 放出と細胞外からの Ca 流入の 2 つの機構によってもたらされる。細胞外からの Ca 流入は、小胞体の Ca 枯渇が引き金となって起こるため、容量依存性 Ca 流入と呼ばれている。

ところで、細胞骨格の研究は、骨格としての形態維持機構の研究にはじまって運動などの細胞機能といった研究へと進展した。しかし、最近では細胞内 Ca 濃度調節機構といった情報伝達系に細胞骨格が関与している可能性が示唆されるようになった。

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、さらに、線維状アクチンと微小管の 2 つの細胞骨格に着目し、細胞骨格のマスト細胞 Ca 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て実験を行い、以下の成績を得た。

1) 抗原非存在下における単量体 IgE の脱顆粒誘起

これまで、IgE 単独の脱顆粒反応への関与は報告されていないことから、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 (BMDC) に処置すると、高濃度で細胞内 Ca 濃度の増加、および脱顆粒が起こった。精製した単量体 IgE を用いても、RBL-2H3 細胞、BMDC 共に細胞内 Ca 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 刺激時の線維状アクチン量を測定した。すると、細胞内 Ca 濃度の増加や脱顆粒を誘起するよりも低い濃度の IgE で、線維状アクチン量の増加がみられた。この 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 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 IgE 処置により細胞内 Ca 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制御を担っていることが示唆された。

3) 抗原により増加する線維状アクチンの細胞内 Ca 濃度制御

IgE を感作させたマスト細胞を抗原で刺激すると、IP₃ が産生され、小胞体から Ca 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 IP₃ 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 放出速度が増加されることで小胞体の Ca 枯渇状態が促進され、Ca 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、IP₃ 産生を抑制する負の制御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 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 放出は正常に誘起されたが、それに続く Ca 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 ポンプ ATPase 阻害薬である thapsigargin および cyclopiazonic acid 処置によって生じる容量依存性 Ca 流入が、nocodazole の処置時間に依存して抑制された。さらに、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 の作用を検討したところ、これらの薬剤はアレルギー反応を抑制した。

以上のように本研究は、マスト細胞において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 枯渇という情報を細胞膜の Ca 流入機構に伝える経路に関与していること、さらに、Ca 流入の抑制を介したアレルギー反応制御系の存在を指摘したものであり、学術上寄与するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位に値するものと判断した。