

論文の内容の要旨

論文題目 リゾホスファチジルセリンによるマスト細胞機能の制御

氏 名 巻出 久美子

【序】

マスト細胞の細胞膜上の IgE 受容体が IgE 抗原複合体により架橋されるとマスト細胞は脱顆粒し、ヒスタミンやセロトニンなどのケミカルメディエーターを放出し、即時型アレルギー反応が引き起こされる。リゾホスファチジルセリン (lysoPS) が *in vitro* において IgE 依存的なマスト細胞の脱顆粒反応を著しく促進することが古くから知られている (図 1)。しかし、その生理的意義については不明な点が多く残されていた。修士課程で私はホスファチジルセリン (PS) を特異的に加水分解して lysoPS を産生する酵素、PS 特異的ホスホリパーゼ A₁ (PS-PLA₁) ノックアウト (KO)

マウスの解析を行い、本酵素が lysoPS の産生を介し即時型アレルギー反応の進展に深く関与することを見出した。ところで、マスト細胞は即時型アレルギー反応以外にも、様々な炎症部位に集積し、活性化されることが知られているが、そのメカニズムについてはよくわかっていない。本研究で私は、PS-PLA₁ KO マウスでは炎症初期の好中球の集積と TNF- α の放出が抑制されていることを見出し、炎症部位では lysoPS の産生とマスト細胞の活性化が引き起こされていることを明らかにした。また、lysoPS がマスト細胞の遊走因子としても機能する可能性を見出した。

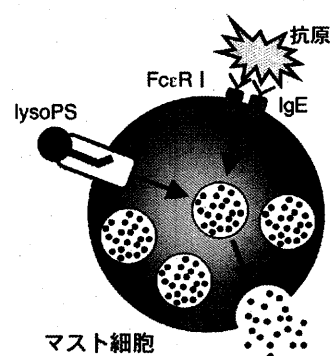


図1. lysoPS は IgE依存的なマスト細胞の脱顆粒反応を促進する

【方法と結果】

lysoPS は炎症部位でマスト細胞の脱顆粒を引き起こす

最近、当研究室の解析により、PS-PLA₁ の発現が様々な炎症刺激により顕著に上昇することがわかってきた。カゼイン腹膜炎においても、腹腔中に PS-PLA₁ の発現が 16 時間前後をピークに劇的に上昇することがわかっている。また、カゼイン腹膜炎では好中球を主体とする炎症性細胞が同様の経時変化で腹腔に集積することが報告されている。そこで、好中球集積への PS-PLA₁ の関与を考え、PS-PLA₁^{-/-} マウスにカゼイン腹膜炎を誘導したところ、PS-PLA₁^{-/-} マウスでは好中球の集積が顕著に抑制されていた (図 2)。腹腔の炎症における好中球の集積には主にマスト細胞から放出される TNF- α が重要であることが知られていることから、腹腔の TNF- α 量を調べたところ、WT マウスで有意に検出される TNF- α が PS-PLA₁^{-/-} マウスでは検出限界以下であった (図 3)。さらに、トルイジンブルー染色により腹腔マスト細胞の活性化を調べたところ、WT マウスでは脱顆粒したマスト細胞が多く観察されるのに対し、PS-PLA₁^{-/-} マウスでは脱顆粒の程度が著しく減弱していることがわかった (図 4)。よって、PS-PLA₁ により産生された lysoPS がマスト細胞を活性化しているものと考えられた。そこで、実際にカゼイン腹膜炎の腹腔に lysoPS が検出されているのか調べることにした。

lysoPS はマスト細胞の活性化の他、これまでに *in vitro* においていくつかの生理活性が報告されているが、生体内で lysoPS が検出された例はない。そこで、今回新たに lysoPS の検出系を確立した。膜からリゾリン脂質を引き抜くことができる高濃度のアルブミンを含むバッファーでマウス腹腔を洗浄し、腹腔洗浄液から固相カラムを用いてリゾリン脂質画分を分画し、ESI-マスマスペクトロメトリーにて lysoPS の検出を行った。その結果、PBS 処理マウスにおいては 18:0 (ステアリン酸) を有する lysoPS がわずかに検出されるのみであったが、カゼイン処理により 18:1 (オレイン酸), 18:2 (リノール酸), 20:4 (アラキドン酸), 22:6 (ドコサヘキサエン酸) などの不飽和脂肪酸を有する lysoPS が著しく上昇した (図 5)。また、これらの lysoPS の上昇は PS-PLA₁^{-/-} マウスでは認められなかった (図 5)。よって、カゼイン腹膜炎においては、PS-PLA₁ によって産生された lysoPS が確かに存在することが明らかとなった。

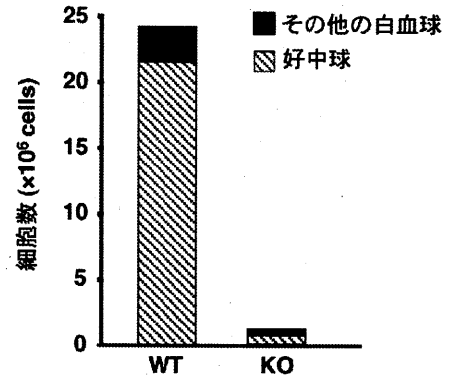


図2. KOマウスでは好中球の集積が抑制されている

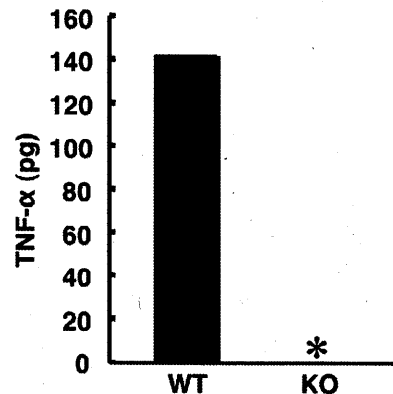


図3. KOマウスでは腹腔TNF- α 量が少ない

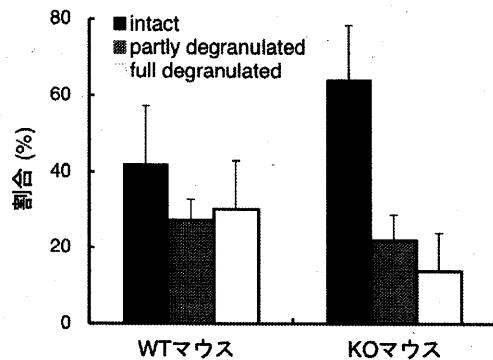
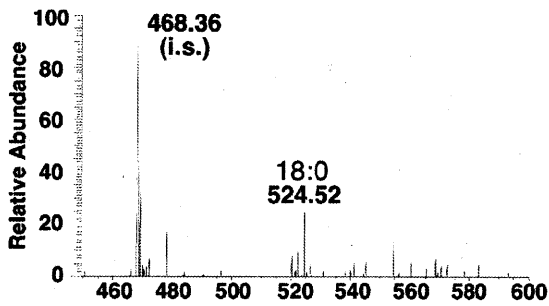
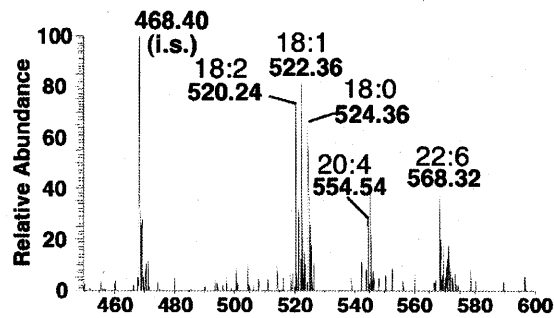


図4. KOマウスではマスト細胞の脱顆粒が抑制されている

PBS処理 (WTマウス)



カゼイン処理 (WTマウス)



カゼイン処理 (KOマウス)

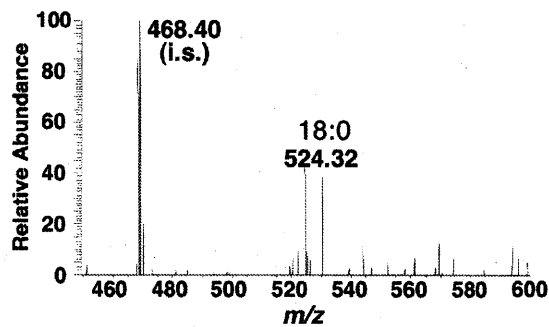


図5. カゼイン腹膜炎では lysoPSが産生される

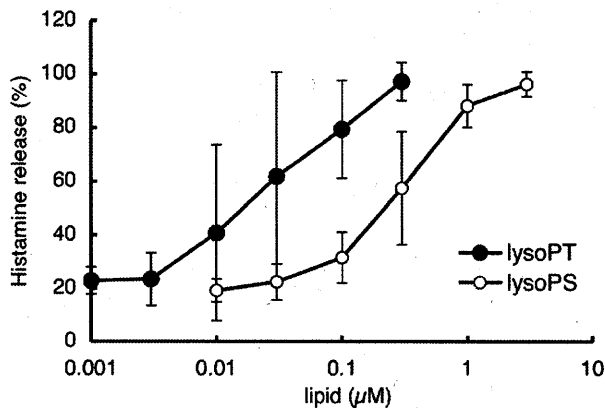


図6. lysoPTはlysoPSよりも強いマスト細胞脱顆粒促進活性を示す

lysoPSはGPR34を介してマスト細胞の遊走を引き起こす

マスト細胞上には lysoPS 受容体の存在が想定されているが、その分子実体は不明である。最近、薬化学教室との共同研究により様々な lysoPS 誘導体が有機化学的に合成され、マスト細胞の脱顆粒促進活性を指標にした構造活性相関研究が行われた。その結果、lysoPS よりも十倍程度強い活性を示す誘導体、リゾホスファチジルスレオニン (lysoPT) が同定された (図6)。一方、orphan GPCRであった GPR34 が lysoPS 応答性を示すことが最近報告された。マスト細胞は GPR34 を発現していることから、lysoPS/lysoPT が GPR34 を介してマスト細胞の脱顆粒を促進していると予想された。しかし、GPR34 安定発現 CHO 細胞を作製して GPR34 の lysoPT 応答性を調べたところ、GPR34 は lysoPS に応答して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、cAMP の産生抑制、ERK のリン酸化を引き起こすものの、GPR34 は lysoPT には一切反応性を示さなかった (図7)。よって、GPR34 は lysoPS によるマスト細胞脱顆粒促進作用には関与しないことが示唆された。

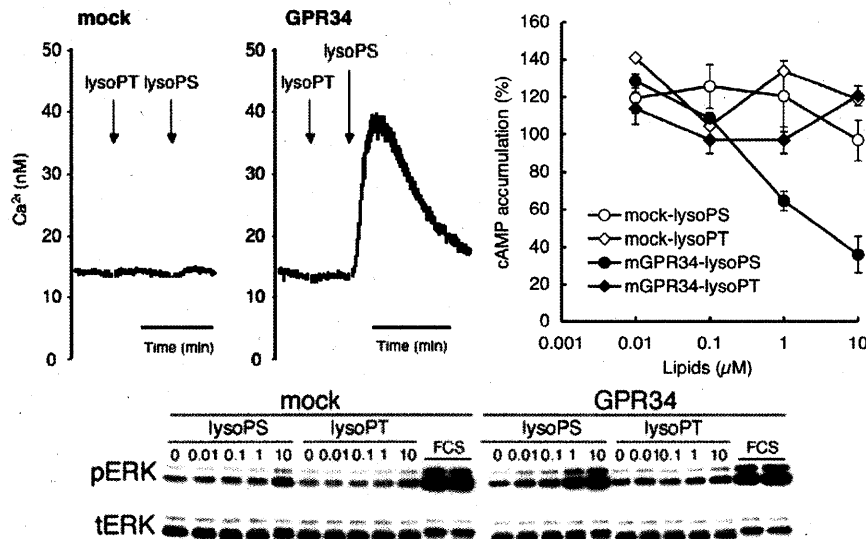


図7. GPR34 は lysoPT 応答性を示さない

次に、GPR34 が関与する機能を探ることにした。まず、未熟なマスト細胞として位置づけられる骨髓由来培養マスト細胞 (BMDC) において GPR34 が発現していることを確認した (data not shown)。この BMDC を用い、様々な lysoPS 応答性を調べたところ、BMDC が lysoPS に走化性を示すことを見出した (図 8)。そこで、この反応が GPR34 を介しているのかを確認するために、GPR34 発現 CHO 細胞の lysoPS に対する細胞遊走活性を調べた。その結果、コントロール細胞では lysoPS に反応しないが、GPR34 発現細胞は lysoPS の濃度依存的に遊走することが確認された (図 9)。このことから、lysoPS はマスト細胞に対し、従来の脱顆粒促進活性に加え、GPR34 を介して細胞遊走活性をも有することが明らかとなった。

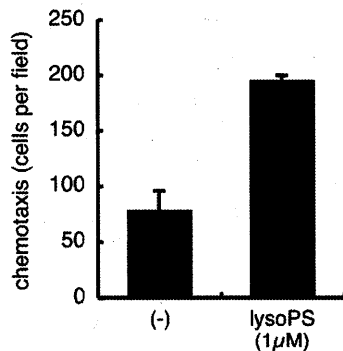


図8. lysoPSによるBMDCの遊走

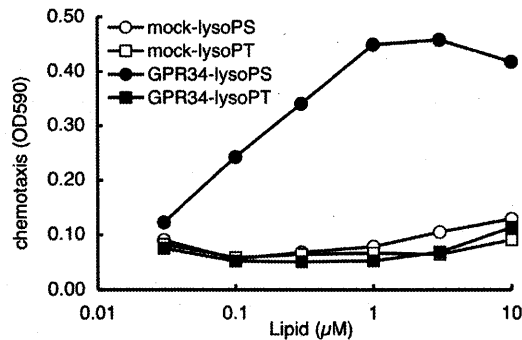


図9. lysoPSはGPR34を介して細胞遊走を引き起こす

【まとめと考察】

マスト細胞は IgE 依存的な即時型アレルギー反応の担い手である。また、古くからマスト細胞は炎症部位に集積し、そこで脱顆粒することにより炎症の進展・終結反応に何らかの役割を持つことが想定されていた。しかし、これまで、マスト細胞が炎症部位に集積し、脱顆粒するメカニズムやその意義は全く不明であった。私は本研究によりこれらの謎の一端を明らかに出来たのではないかと考えている。

私はまず、PS-PLA₁^{-/-}マウスにカゼイン腹膜炎を誘導すると、好中球の集積、TNF- α 量が抑制されていることを見出した。さらに、MS を用いた高感度検出系を構築し、lysoPS が炎症

部位で産生されてくることを初めて明らかにした。炎症部位で PS-PLA₁ により産生された lysoPS がマスト細胞の脱顆粒を引き起こし、TNF- α の放出を介して好中球の集積に参与しているものと考えられる。さらに、lysoPS が lysoPS 受容体 GPR34 を介し、未熟なマスト細胞の遊走を促進することが強く示唆された。従って、マスト細胞はこれらのシステムを利用して炎症部位に集積し、脱顆粒している可能性がある。本研究により、lysoPS がマスト細胞の脱顆粒、遊走促進活性を有する新たな炎症性メディエーターであることが明らかとなった(図10)。マスト細胞の脱顆粒における lysoPS のターゲット分子の実体を明らかにしていくことが今後の課題である。

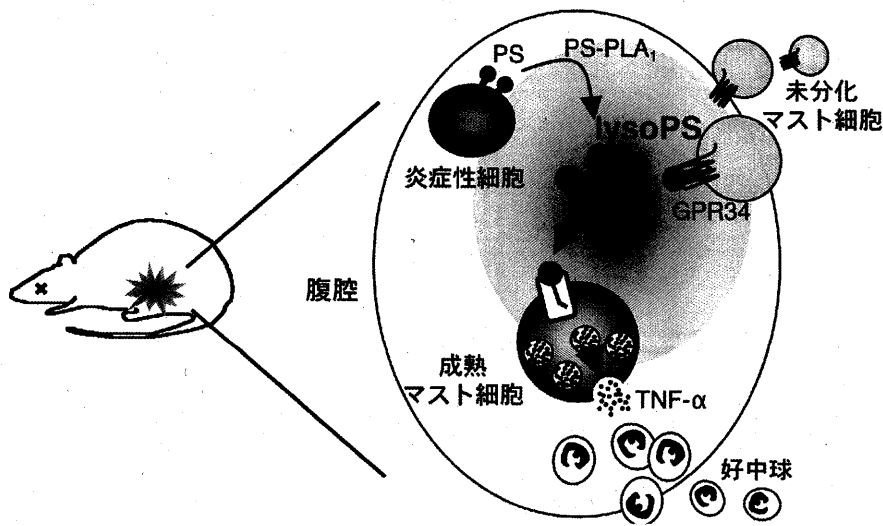


図10. 炎症部位における lysoPS の役割