

## 審査の結果の要旨

氏名 巻出 久美子

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が、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。巻出は修士課程で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 A<sub>1</sub> (PS-PLA<sub>1</sub>) 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。巻出は博士課程において、PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスでは炎症初期の好中球の集積と TNF- $\alpha$  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。

### 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-PLA<sub>1</sub> の発現が様々な炎症刺激により顕著に上昇することが明らかとなりつつある。カゼイン腹膜炎においても、腹腔中に PS-PLA<sub>1</sub> 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おり、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。そこで巻出は、好中球集積への PS-PLA<sub>1</sub> の関与を考え、PS-PLA<sub>1</sub><sup>-/-</sup>マウスにカゼイン腹膜炎を誘導したところ、PS-PLA<sub>1</sub><sup>-/-</sup>マウスでは好中球の集積が顕著に抑制されていることを見出した。このとき、PS-PLA<sub>1</sub><sup>-/-</sup>マウスでは WT マウスに比較して腹腔の TNF- $\alpha$  量が顕著に少なく、さらに、腹腔マスト細胞の脱顆粒反応も減弱していた。次に、巻出は新たに lysoPS の検出系を確立し、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 が著しく上昇することを見出した。また、これらの lysoPS の上昇は PS-PLA<sub>1</sub><sup>-/-</sup>マウスでは認められなかったことより、カゼイン腹膜炎においては、PS-PLA<sub>1</sub>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。

#### 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ている。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。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<sup>2+</sup>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。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。次に、巻出は GPR34 が関与する機能を探った。まず、未熟なマスト細胞として位置づけられる骨髄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、この BMDC が lysoPS に走化性を示すことを見出した。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。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。

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。巻出は本研究によりこれらの謎の一端を明らかにしたと考えている。

巻出はまず、PS-PLA<sub>1</sub><sup>-/-</sup>マウスにカゼイン腹膜炎を誘導すると、好中球の集積、TNF- $\alpha$  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-PLA<sub>1</sub>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- $\alpha$  の放出を介し

て好中球の集積に関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という非常に新しい概念を提供したことから、薬学（博士）に充分値するものと判断した。