

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏 名 脇 紀 彦

「マスト細胞に発現するヘパラーゼの生物学的な役割」と題する本論文は、ヘパリンとヘパラン硫酸のエンド型分解酵素であるヘパラーゼが、アレルギー性炎症の担い手として重要な役割を持つ免疫細胞であるマスト細胞の機能調節に重要であることを発見し、検証した経過が述べられている。序論、抗ヘパラーゼモノクローナル抗体の特異性解析、マスト細胞に発現するヘパラーゼの生物学的役割、マスト細胞様細胞株 MST によるヘパラーゼの取り込み機構、及び総括のタイトルを持つ全5章から成り立っている。

序論の主な部分は、ヘパリンとヘパラン硫酸及びそのエンド型分解酵素(脊椎動物では唯一)であるヘパラーゼ発見の経緯とこれまでの研究の発展経過、及びヘパリンを産生する唯一の細胞である結合組織型マスト細胞の機能の重要性に関する概論である。さらに、これまでの他研究室からの報告からヘパラーゼがマスト細胞内におけるヘパリンの低分子化に関与することが推測されてきたこと、ヘパラーゼが細胞中でヘパリンを低分子化し顆粒中のヘパリン結合性分子の機能を間接的に制御するとの仮説がたてうること、当研究室において樹立されたヘパラーゼに対するモノクローナル抗体 (mAb) RIO シリーズがこの仮説の検証に役立つ可能性があると考えたことが述べられている。

第2章は、抗ヘパラーゼモノクローナル抗体の特異性解析を主要な研究対象としている。ヘパラーゼはプレ前駆体として生合成されシグナル配列の切断を受け前駆体となった後、細胞内における N 末端付近の配列の酵素的な除去に伴い成熟体へ変換されることが知られていた。一方ヘパラーゼの C 末端配列もまた酵素的に除去され、これによりヘパラーゼは C 末端欠損体へ変換されることが知られていた。RIO シリーズの抗ヘパラーゼモノクローナル抗体のうち RIO-6 および 7 はいずれの組換え型蛋白質に対しても高い結合を示したが、RIO-1 および 3 の結合は前駆体に対するよりも C 末端欠損体に対して著しく低かった。RIO-1 および 3 はヘパラーゼ C 末端配列を認識することを明らかにした。

第3章では、結合組織型マスト細胞様の細胞株である MST 細胞培地中にリコンビナントヘパラーゼ前駆体を加えると、細胞内に取り込まれ細胞内顆粒に集積することが学位申請者によって発見されたこと、この現象を利用してマスト細胞内におけるヘパラーゼの重要性が追求されたことが述べられている。ヘパラーゼを取り込ませた細胞の表面の IgE 受容体を架橋して脱顆粒を誘導した後、細胞染色および Western blotting 法によりヘパラーゼを検出すると、ヘパラーゼは MST 細胞中に

は検出されなくなり、マスト細胞内に集積したヘパラーゼが機能的な分泌顆粒に局在し、放出されることが明らかになった。取り込まれた前駆体ヘパラーゼの分子量の経時変化を Western blotting 法により解析した結果、細胞内に取り込まれた前駆体ヘパラーゼは成熟体に変換され細胞顆粒に集積することが明らかになった。ヘパラーゼが細胞内に導入されるとこの細胞で合成されているヘパリンの分子量が低下するか否かを調べた結果、約 60 kDa から 25 kDa よりも小さい分子量になり、ヘパラーゼがヘパリンの低分子化に寄与することが明らかになった。

マスト細胞が産生、放出し、炎症やアレルギーの病態形成に関わる分子は多々あり、ヘパリンにより機能が調節されると考えられているものも多い。それらのうち、低分子量のヘパリン断片によって活性化されることが知られていた酵素がトリプターゼである。トリプターゼはマスト細胞特異的に発現し、分泌顆粒内蛋白質の 25% を構成する主要な顆粒内プロテアーゼである。本論文では、MST 細胞にヘパラーゼを導入した後、細胞可溶化物中のトリプターゼ活性をフィブロネクチンホモ二量体の単量体への分子量変化を指標に測定した結果が述べられている。ヘパラーゼを導入した細胞由来の細胞可溶化物によるフィブロネクチン分解は未処理の細胞由来の細胞可溶化物による分解に比べて亢進しており、これがヘパラーゼによるヘパリンの低分子化によることが強く示唆された。

第4章では、第3章で見出された MST 細胞への細胞外ヘパラーゼの取り込みがどのような分子機構によるかを調べた結果が述べられている。ヘパラーゼはヘパリン硫酸鎖に結合することから、その関与を検討した結果、MST 細胞表面のヘパリン硫酸鎖を受容体とし細胞内輸送依存的に細胞内に取り込まれることが示された。取り込みに関与するヘパリン硫酸鎖を持つプロテオグリカンとしてシンデカンファミリーメンバーを予想してそのメンバーの発現を mRNA および蛋白質レベルで検証したところ、シンデカン-1 のみの発現が確認された。蛍光細胞染色により、取り込まれたヘパラーゼとシンデカン-1 が細胞内において共局在することが見出されたことから、ヘパラーゼはシンデカン-1 に結合することにより細胞内へ取り込まれることが推測された。

総括では主に、トリプターゼの調節がマスト細胞を介する炎症病態形成においていかなる意義を持つかが考察されている。また、これに関連して、エンド型酵素であるヘパラーゼによるヘパリンの限定分解がトリプターゼ活性の調節に重要であるという論拠が述べられている。

以上の研究成果は、唯一のヘパリン産生細胞である結合組織型マスト細胞において、ヘパラーゼがヘパリンの低分子化を通して炎症病態の制御に重要な役割を果たすことを初めて明らかにしたものである。糖鎖の生物学的な機能とその調節機構を明らかにすると言う糖鎖生物学の立場から意義が大きい成果であるとともに、免疫と炎症の制御に新しい角度から知見を得たと言う点でも高く評価すべきものである。従って、本研究を行った 脇紀彦 は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。