

氏名	なかしま かずこ 中島加珠子
学位(専攻分野)	博士 (社会健康医学)
学位記番号	社医博第14号
学位授与の日付	平成18年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科社会健康医学系専攻
学位論文題目	Differentiation, Distribution and Chemical State of Intracellular Trace Elements in LAD2 Mast Cell Line. (肥満細胞系 LAD2細胞における細胞内微量元素の変動, 分布及び化学状態)
論文調査委員	(主査) 教授 淀井淳司 教授 小泉昭夫 教授 上杉志成

論文内容の要旨

〔意義・目的〕 本研究の意義はアレルギー疾患の炎症機構の解明の一助として、蛍光 X 線を用いた分光分析による元素解析の有用性の検討にある。免疫応答においては様々な受容体を介した各細胞間で物質の相互作用や移動が起こっている。過去に同定された疾患関連遺伝子の中には金属の輸送体であることが明らかとなったものもある。故に本研究では細胞内外の金属元素に注目した。本研究では、肥満細胞を用い、抗原抗体反応で誘導された脱顆粒時の金属元素の動態の変化を探索することで、標的元素を絞り込む事が第一の目的である。その後、標的元素の働きの解明を試みる。

<放射光解析>

〔方法〕 予備実験は Photon Factory (KEK) の BL4A, 本実験は SPring-8 (JASRI) の BL37XU で実施。元素マッピングは SRXRF 分析, 価数動態は XAFS 分析で解析した。Ionomycin (500ng/mL) 及び α NIP-IgE (1 μ g/mL) で感作した後, NIP-BSA (1ng/mL) による刺激 (30分) 脱顆粒を誘導。刺激後の細胞を回収, 25 μ m 厚の PET 膜上にサイトスピニにより接着した後 EtOH 固定して分析に供した。

〔結果〕 IgE 架橋と Ionomycin 刺激間の元素分布は明らかに異なっていた。鉄と銅の動態には変化がなかったが, 脱顆粒に伴う亜鉛とカルシウムの動態に大きな違いが見られた。架橋刺激では細胞内亜鉛量に著しい減少が確認された。また, XAFS 解析の結果, 架橋刺激では鉄の価数には二価から三価へのシフトが観察されたが, Ionomycin 刺激ではシフトは観察されなかった。以上の事より脱顆粒現象において微量金属元素の関わるシグナルが存在し, そのシグナルは刺激によって異なる事が示唆された。

<生化学的解析>

〔方法〕 マイクロアレイによる解析及び, 放射光解析の結果を踏まえ, 亜鉛を標的元素とした。培養肥満細胞である LAD2 に加え, 臍帯血由来の肥満細胞 (c-mast) を用い, 検証を行った。亜鉛特異的蛍光プローブ (Zinquin ethyl ester, Dansylaminoethyl-cyclen) による染色で, 亜鉛が顆粒に存在している事が示された。蛍光顕微鏡, 共焦点レーザー顕微鏡を用い, 脱顆粒誘導時の細胞内の亜鉛の状態のイメージングを時系列で施行した。細胞外亜鉛に関しては, ICP-質量分析法を用いて, 時系列での定量を行った。また, TPEN で亜鉛をキレートすることにより, 脱顆粒への影響を確認した。脱顆粒の指標としては β -Hexosaminidase (以下, β Hex) 又は Histamine の release を用いている。脱顆粒の誘導刺激は, LAD2 では NIP-BSA, c-mast では α IgE を用いた。

〔結果〕 細胞内亜鉛は刺激後徐々に膜に移動し, 流出することが確認された。刺激後15分までは, β Hex release と高い相関が見られ, 顆粒とともに細胞外に出ている事が示唆された。一方で, 細胞外亜鉛は脱顆粒に相関して増加が見られたが, 30分以降は刺激前と同レベルまで減少した。つまり, 一旦は顆粒共に細胞外に出るが, 再び取り込まれていることが示された。また, TPEN の添加によって脱顆粒は抑制されるが, 亜鉛を後から添加することにより, 再度脱顆粒を誘導させる事ができた。また, 亜鉛のキレートによって脱顆粒が抑制されたのは架橋刺激においてのみであり, Ionomycin 刺激での脱顆

粒を抑制する事はできなかった。

【考察】 マイクロアレイのデータより、刺激後の肥満細胞において、排出、流入両方の亜鉛 transporter の発現上昇が確認され、細胞内亜鉛のホメオスタシスの重要性が示唆された。必須元素である亜鉛は、各種酵素の活性中心でもあり、細胞内では一定量に保つ必要があるのだろう。亜鉛のキレートにより脱顆粒の制御ができたことから、従来のカルシウム流入による刺激以外に亜鉛の関わるシグナルが入っている可能性が示された。Ionomycin での脱顆粒は亜鉛のキレートによっても制御できなかった事から、亜鉛の関わるシグナルは架橋刺激においてのみ働いていることが示された。また、肥満細胞は他の細胞に比べて高い亜鉛含有量を示す事から、生体内での亜鉛供給という役割も考えられ、更なる分析の必要があるだろう。放射光解析の結果を支持するデータが得られたことより、放射光解析は生化学的な解析にも応用が可能である事が示された。様々な金属の分布を同時に捉える事のできるこの手法は、細胞に特別な処理を必要としない為、特にスクリーニングツールとして有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究の意義はアレルギー疾患の炎症機構の解明の一助として、蛍光 X 線を用いた分光分析による元素解析の有用性の検討にある。過去に同定された疾患関連遺伝子の中には金属の輸送体であるものもある。本研究では、肥満細胞を用い、架橋刺激で誘導された脱顆粒時の金属元素の動態の変化を探索することで、標的元素を絞り込み、その後、標的元素の働きの解明を試みた。

放射光解析により、刺激の異なる脱顆粒現象において、元素分布の相違がみられ、異なるシグナル伝達系の存在が予想された。マイクロアレイにより、刺激後の肥満細胞において、排出、流入両方の亜鉛輸送体の発現上昇が確認され、細胞内亜鉛の恒常性の重要性が示唆された。亜鉛のキレートによる脱顆粒の抑制、カルシウム非存在下での架橋刺激による脱顆粒が誘導から、従来のカルシウム流入刺激以外の亜鉛の関わるシグナルの存在が示された。Ionomycin での脱顆粒は亜鉛のキレートによる制御ができず、亜鉛の関わるシグナルは架橋刺激において働いていることが示された。放射光解析の結果を支持するデータが得られたことより、放射光解析は生化学的な解析にも応用が可能である事が示された。様々な金属の分布を同時に捉える事のできるこの手法は、細胞に特別な処理を必要としない為、特にスクリーニングツールとして有用であると考えられた。

以上の研究は、炎症の発生機構の解明及び分析のターゲットの選定に寄与するところも多い。

したがって、本論文は博士（社会健康医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年3月31日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。