

| | |
|----------|--|
| 氏 名 | たかのひろつぐ 高野裕嗣 |
| 学位(専攻分野) | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 薬博第649号 |
| 学位授与の日付 | 平成20年3月24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 | 薬学研究科生命薬科学専攻 |
| 学位論文題目 | Terminal differentiation of connective tissue-type mast cells (結合組織型マスト細胞の最終分化に関する研究) |

論文調査委員 (主査) 教授 中山和久 教授 伊藤信行 教授 竹島 浩

論 文 内 容 の 要 旨

マスト細胞は全身の様々な組織に分布する白血球の一種であり、造血幹細胞に由来する。マスト細胞の細胞質に存在する多数の顆粒には、ヒスタミンをはじめとする多彩な炎症性メディエーターが含まれており、刺激に応じてその内容物が細胞外へと放出される。マスト細胞に関しては、これまで即時型アレルギー応答や寄生虫感染防御における主要なエフェクター細胞という位置づけのもとで研究が行われてきた。一方で、近年の研究からは、マスト細胞はそれらに加えて、接触性皮膚炎や自己免疫疾患、腫瘍免疫など多様な病態に関与していることが明らかにされており、広く免疫応答の調節因子としてのはたらきがあることが明らかにされつつある。こうしたマスト細胞の機能を考察する上で重要な視点として、マスト細胞の分化をあげることができる。マスト細胞は骨髄に由来するが、循環血中には検出されない。即ち、マスト細胞は浸潤した組織において最終的な分化を遂げると考えられる。しかしながら、従来の研究ではこの点については軽視されており、未成熟なマスト細胞が生体内のマスト細胞のモデルとして利用されてきた。そこで、本研究ではマスト細胞の成熟過程のメカニズムを明らかにすることを目的として、その過程を模倣する実験系を確立し、その解析を行った。

第一章では皮膚型マスト細胞の成熟過程を模倣する共培養系の確立と、その過程における遺伝子発現解析から得られた新しい知見について、第二章ではマウス皮膚組織のマスト細胞数を制御する重要な因子の一つが、マスト細胞の成熟過程で誘導されるヒアルロン酸受容体であるCD44であることについてそれぞれ述べる。

第一章 マスト細胞の成熟過程における遺伝子発現変化の網羅的解析

これまで、マスト細胞の組織における最終分化過程に着目した報告は僅かである。そこで、未成熟な骨髄由来初代培養マスト細胞を stem cell factor 存在下、Swiss 3T3 線維芽細胞株と共培養することにより成熟マスト細胞に類似した細胞を得る手法を確立した。この培養系では、顆粒プロテアーゼ活性、ヒスタミン含量、サフラニン染色性、カチオン性刺激に対する脱顆粒応答といった指標の増大がいずれも確認され、組織での成熟過程を反映した変化が起こっていることが分かった。そこで、この系における経時的な遺伝子発現変化をマイクロアレイにより解析した。上記の指標の増大を裏付ける遺伝子発現変化に加えて、いくつかの遺伝子群の発現変化は成熟に伴ういくつかの遺伝子群の発現変化を今回新たに見いだした。

1. カチオン性刺激に対する脱顆粒応答の増大と並行して、 $G\alpha_{11}$ の誘導が認められた。従来、 $G\alpha_{12}$ あるいは $G\alpha_{13}$ の関与が示唆されていたが、これらの誘導は認められなかった。
2. 成熟に伴ってIgE依存性抗原抗体反応による脱顆粒率が低下したが、並行してFcγRIIやCD33といったITIM配列を持つ抑制性受容体、あるいはCD81やRabGEF1のような脱顆粒抑制因子の遺伝子発現が増大した。
3. ARF6やRab27bといった膜輸送、integrin類やCD44といった接着に関連する遺伝子群の誘導がそれぞれ見いだされた。
4. 転写因子では、マスト細胞の分化を制御するGATA1の発現が成熟に伴って低下する一方で、Gfi1の一過性の誘導が認められた。

本研究で得られた培養系は組織におけるマスト細胞の成熟の特徴をよく反映しており、今回新たに明らかにとなった遺伝子発現のプロファイルは、マスト細胞の成熟過程を解明する上で重要な情報といえる。

第二章 CD44によるマウス皮膚組織におけるマスト細胞数の制御

ヒアルロン酸は皮膚組織における主要な細胞外マトリックスの一つであることから、マスト細胞が皮膚組織において成熟する過程でヒアルロン酸の影響を受ける可能性は十分考えられる。そこで、マスト細胞の成熟により誘導される遺伝子群のうち、ヒアルロン酸受容体CD44に着目した。種々の血球系細胞において、CD44は接着のみならず、細胞内シグナル伝達の修飾を介して細胞増殖や分化に関わることが報告されている。

共培養系では線維芽細胞から産生されるヒアルロン酸がマトリックスを形成しており、マスト細胞はヒアルロン酸依存的にクラスターを形成して存在することが明らかとなった。CD44欠損マウスから未成熟マスト細胞を調製して共培養を行うと、クラスターのサイズは減少し、同時に培養過程における細胞増殖が抑制された。一方、成熟指標に変化は認められなかった。これらの変化は共培養系中に抗CD44抗体を添加することでも再現された。このことからマスト細胞の成熟過程において、CD44はマスト細胞の増殖を促進するはたらきをもつと考えられた。次に、線維芽細胞のヒアルロン酸合成酵素の発現をRNAiにより抑制すると、マスト細胞のクラスターは消失し、共培養時の細胞増殖は著しく増大した。この時、CD44欠損マウス由来の未成熟マスト細胞を用いた場合でも、野生型と同程度の細胞増殖が認められ、成熟指標の変化にも影響はなかった。このことから、ヒアルロン酸の非存在下では、CD44は細胞増殖には影響を与えないことが分かった。次に、CD44欠損マウスを用いて個体レベルの解析を行ったところ、皮膚組織と腹腔においてマスト細胞数が減少していることが明らかとなった。そこで、どの段階でマスト細胞数の変化が生じるかを検討するために、マスト細胞欠損マウス(W/W^Vマウス)への未成熟マスト細胞の再構成実験を行った。未成熟マスト細胞は移植された皮膚組織に定着、増殖するが、CD44欠損型の未成熟マスト細胞では定着はするものの組織中での増殖は観察されなかった。このことから皮膚組織におけるマスト細胞の成熟過程において、ヒアルロン酸受容体CD44は細胞増殖に関わり、組織マスト細胞数を制御していると考えられる。

本研究を通じ得られた成果は、従来不明であった結合組織におけるマスト細胞の最終分化過程の一端を明らかにするものであり、特に皮膚組織におけるマスト細胞増殖にCD44が必須であることを示すものである。皮膚組織におけるマスト細胞数の調節機構の解明は、皮膚炎、腫瘍、感染防御といった様々な側面で機能するマスト細胞を標的とする新たな創薬の可能性を開くものである。

論文審査の結果の要旨

マスト細胞は寄生虫感染や即時型アレルギーにおける主要なエフェクターであるが、近年の研究では自己免疫疾患や腫瘍免疫といった疾患への関与が示され、免疫応答に広く関与することが明らかにされつつある。マスト細胞は造血幹細胞由来であり、全身の様々な組織に分布しているが、循環血中においてマスト細胞の性質を示す細胞は見いだされない。このことは、マスト細胞の最終分化は、浸潤した組織において、その微小環境の影響のもと起こることを示している。種々の組織におけるマスト細胞の機能を知る上で、その分化過程の解明は欠かすことができない。しかしながら、従来この点に着目した研究は少なく、マスト細胞の成熟過程に関しては不明な点が数多く残されていた。また、結合組織中に散在するという特徴も、成熟マスト細胞の解析を困難なものとしている。そこで著者は、マスト細胞の最終分化過程を模倣する培養系を構築し、そのプロセスを解明することを目的として以下の研究を行った。

著者は、マスト細胞が多数分布し関連疾患も多い皮膚を標的として、骨髄由来初代培養マスト細胞をSwiss 3T3線維芽細胞株と共培養することにより成熟マスト細胞に類似した細胞を得る手法を確立した。この培養系では、顆粒の成熟や刺激応答性の変化といったプロセスを高い再現性のもと確認することが可能であった。そこで、この系における経時的な遺伝子発現変化をマイクロアレイにより解析した。その結果、皮膚組織におけるマスト細胞の成熟に伴う変化を反映する遺伝子発現変化が認められ、それらのいくつかはタンパク質レベルの変化としても確認された。従来、成熟マスト細胞の応答を調べるための適当な培養系は存在せず、個体レベルでの実験が行われてきたが、本培養系は成熟マスト細胞を対象とした研究、あるいは薬物開発において有用なシステムであるといえる。

一方で、ここで得られたマスト細胞の発現プロファイルは、これまで未知であったマスト細胞の成熟プロセスを解明する有力な情報を含んでいることが予想された。著者は、マスト細胞の成熟に伴い発現変化する遺伝子群から、皮膚における主要なマトリックス成分であるヒアルロン酸の主要な受容体であるCD44に着目した。本培養系では、線維芽細胞から産生されるヒアルロン酸がマトリックスを形成し、マスト細胞はヒアルロン酸依存的にクラスターを形成することが明らかとなった。また、CD44欠損マウス骨髄由来のマスト細胞を用いた場合や、抗CD44抗体を添加した場合には、マスト細胞の成熟には影響がないが、培養過程における細胞増殖が抑制された。次にCD44欠損マウスを用いて個体レベルの解析を行ったところ、皮膚組織のマスト細胞数が減少していることが明らかとなった。CD44は細胞遊走にも関与する分子であり、マスト細胞の組織への浸潤に関与する可能性も考えられたため、著者はさらに遺伝的にマスト細胞を欠損するマウスへの未成熟マスト細胞の再構成実験を行った。移植マスト細胞は皮膚に定着、増殖するが、CD44を欠損するマスト細胞では定着は起こるものの増殖は認められなかった。このことから皮膚組織におけるマスト細胞の成熟過程において、CD44は細胞増殖に関わり、組織マスト細胞数を制御していることが示唆された。

本研究を通じ得られた成果は、従来不明であった結合組織におけるマスト細胞の最終分化過程の解明に寄与するものであり、得られた知見をもとに皮膚組織におけるマスト細胞増殖にCD44が必須であることを明らかにしたことである。これらは皮膚組織におけるマスト細胞を標的とする新たな創薬の可能性を開くものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。