

学位論文題名

モルモット食細胞に発現する Fc レセプターの構造と機能の研究

－炎症部位における活性化機構の解析－

学位論文内容の要旨

本論文において、筆者は以下結果を得た。

1. モルモットMφのFc γ 2Rをコードする遺伝子のクローニングと機能の解析

ヒトのFc γ RIIIのcDNAをプローブとしてモルモットMφのcDNAライブラリーよりFc γ 2RのcDNAを単離した。その結果、このレセプターはヒトやマウスのFc γ RIIIに相当する細胞膜貫通型の蛋白であることを見い出した。さらに遺伝子レベルで可溶型のサブタイプが存在する可能性を示唆した。また、ヒトやマウスのFc γ RIIIとは異なり、モルモットのFc γ RIIIは単独でCOS-7細胞膜上に発現するが、Fc ϵ RIの γ 鎖(γ 鎖)との共発現によりFc γ RIIIの発現量が増大し、 γ 鎖により安定して細胞表面に発現できることを見い出した。このように細胞に発現させたFc γ RIIIの種々の機能を検討した結果、Fc γ RIII単独の発現でもIgG2-ICとの結合活性を示すが、ICの食食作用にはFc ϵ RIの γ 鎖との共発現が必要であることを見い出した。さらにFc γ RIIIはICの刺激により遺伝子レベルでその発現が抑制されていることを見い出した。また、得られたcDNAをプローブに用いてノーザンプロットを行った結果、PMNとMφに発現しているFc γ 2Rは遺伝的に異なったタイプであることを示唆する結果を得た。

2. プロテアーゼによるFc γ RIIBの機能亢進のメカニズムの解析

血液中の好中球をプロテアーゼの複合物であるプロナーゼで処理するとFc γ RIIBのIgG-ICの結合能の亢進が認められるようになるが、実際に生体内では、好中球由来エラスターーゼやカテプシンGなどのセリンプロテアーゼが機能亢進に関与していることを見い出した。この結果より、好中球は自己の放出したプロテアーゼにより自らのFc γ RIIBを活性化している可能性が考えられた。

好中球のFc γ RIIBと種々の組成で作成したICとの反応性を調べたところ、抗原抗体比が0.1のような1つの抗原に多数の抗体が結合した大きなICでは著しい結合能の亢進が認められたが、IgG単量体や小さなIC(抗原抗体比=10)ではほとんど変化は認められなかった。この結果から、プロテアーゼ処理を行ってもFc γ RIIB自身の抗体との親和性は増大しないことが示唆された。また、Fc γ RIIBの発現量が高いMφを用いてプロテアーゼ処理によるIC結合性の変化を調べると、IC結合性の増大の割合は非常に少なかった。これらの結果から、Fc γ RIIBの発現量の違いによりプロテアーゼによる活性上昇の割合に変化があることが示唆された。

さらに、種々の密度でFc γ RIIBを発現させたCHO細胞を用いてプロテアーゼ処理の影響を調べると、好中球と同程度の密度でFc γ RIIBを発現している細胞ではICとの結合性を示さなかったがプロテアーゼで処理することによりICの結合が認められるようになった。また、Mφと同じ程度の密度で発現している細胞ではICとの結合が認められたが、プロテアーゼ処理によりICの結

合の増大が観察された。この結果は、好中球とMφにおけるプロテアーゼ処理による効果の相違と一致し、Fc γ RIIBのIC結合性には細胞膜上での発現密度が影響していることが確認された。次に高密度にFc γ RIIBを発現しているCHO細胞を用いてプロテアーゼ処理によるIC結合性の変化を調べた。その結果、プロテアーゼ処理をしても結合性に大きな変化は認められず、Fc γ RIIBの発現密度が非常に高い細胞ではプロテアーゼ処理による影響を受けないことを見い出した。

これらの結果から、プロテアーゼ処理によりFc γ RIIB自身のICとの親和性が高まるのではなく、この処理によりFc γ RIIBの細胞膜上での流動性が増大してFc γ RIIBの密度が局所的に高まることが可能となり、多価のICとの結合性が増大することが考えられた。

実際に、プロテアーゼ処理前後でのFc γ RIIBの細胞膜上での分布を調べるために共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて細胞膜でのFc γ RIIBの分布を調べた。その結果、プロテアーゼ処理を行ってもFc γ RIIは細胞膜上に均等に分布しているのが、Fc γ RIIを架橋するとプロテアーゼ未処理の細胞は細胞膜上に均等に分布しているのに対し、プロテアーゼ処理をした細胞のFc γ RIIBは細胞表面で局在化していることが確認された。このことから、プロテアーゼ処理により直接Fc γ RIIBの局在化が引き起こされるのではなく、プロテアーゼ処理により細胞膜上での流動性が高まった結果、ICのような多価の結合部位を持ったリガンドと効果的に結合できるようになることが考えられた。

プロテアーゼ処理を行っても、Fc γ RIIBの分子量に変化は認められず、プロテアーゼはFc γ RIIBに直接作用していないことが明らかとなった。

細胞内領域を欠損させたFc γ RIIBと、細胞膜貫通領域と細胞内領域をマウスCD28に置換させたFc γ RIIを発現させたCHO細胞を用いてプロテアーゼ処理の影響を調べた結果、この2種類の細胞において、プロテアーゼ処理によりIC結合性の増大が認められた。この結果から、Fc γ RIIBの細胞膜貫通領域と細胞内領域はプロテアーゼ処理による抗体結合性の増大には無関係であり、細胞外領域のみがプロテアーゼ処理による抗体結合性の増大に関与していることが示唆された。

以上の結果より、プロテアーゼはFc γ RIIB以外の膜表面蛋白質に作用し、細胞外の環境を変化させることで、Fc γ RIIBの細胞膜での流動性を高め、ICとの結合性を増大させると考えられた。

3. 抗体依存性細胞傷害反応に及ぼす2種類のFc γ Rの機能の相違

Mφに発現している2種類のFc γ RのADCC反応を引き起こす能力を比較した結果、Fc γ RIIのみにADCC活性が存在することを見い出した。さらに、Fc γ RIIは2種類のIgGと結合するにもかかわらず、IgG2を介した結合でのみ特異的に引き起こされることを見い出した。

4. ラットFc γ RIIをコードする遺伝子の単離とその機能

ラットPMNよりFc γ RIIをコードする遺伝子を単離し、CHO細胞に発現させてその機能について調べた。その結果、ラットFc γ RIIはいくつかのIgG単量体に対しても結合できる性質を持っていることを見い出した。また、IgG-ICの取り込み能を保持していた。さらに、ヒトやモルモットのFc γ RIIと同様にプロテアーゼ処理することでIgG-ICの結合が亢進することを見い出した。

学位論文審査の要旨

主査教授 長澤滋治
副査教授 野村靖幸
副査教授 上出利光
副査助教授 高橋和彦

学位論文題名

モルモット食細胞に発現する Fc レセプターの構造と機能の研究 －炎症部位における活性化機構の解析－

細菌などの異物が生体内に侵入すると、補体系の活性化などにより異物を破壊する。そして、マクロファージなどの抗原提示細胞は、その情報をT細胞に伝え、T細胞はこれらの抗原を認識するB細胞の活性化を促す。活性化されたB細胞は、抗体産生細胞へと分化し、抗体を分泌するようになる。抗体は抗原を特異的に認識して、免疫複合体を形成し、細菌の体内侵入をくい止める。さらに、免疫複合体は好中球やマクロファージなどの食食細胞のFcレセプターを介して取り込まれ、消化分解をうける。この一連の反応は体液性免疫と呼ばれる。したがって、Fcレセプターを介した標的異物の排除過程は生体防御機構の仕上げ段階ともいえるものであり、Fcレセプターは重要な働きをする膜分子である。

近年、Fcレセプターの研究は分子生物学の進歩と相俟って急速に進展し、ヒト、マウスのFcレセプターの構造が遺伝子解析から明らかにされつつある。

本研究は、これまで実体が不明であったモルモットマクロファージのFcレセプター(Fc_γIII)の遺伝子クローニングに成功し、その全配列を決定した。さらに、その遺伝子を導入した細胞を用いて、食食作用における役割を解析し、食食活性には新たに「鎖」と呼ばれる別種の蛋白質が関連することを見いだした。さらに、食細胞のFcレセプターの存在状態について検討し、細

胞が刺激を受けて活性化状態になると、Fcレセプターも膜表面を移動して、より強い細胞応答を惹起するようになることを証明した。

以下に、その成果の概略を述べる。

1: モルモットマクロファージに発現しているFcレセプターをコードする遺伝子の単離とその機能

マクロファージに発現しているFcレセプターのcDNAのクローニングを行い、そのアミノ酸配列を推定し、このレセプターはヒトやマウスのFcレセプターのタイプIIIに相当する細胞膜貫通型の蛋白質であることを見いたしました。また、遺伝子レベルで可溶型のサブタイプが存在する可能性を示唆した。また、モルモットのFcレセプターは単独で細胞膜に発現してIgGとの結合活性を示すが、貪食作用などの機能にはFcイプシロンレセプターの γ 鎖との共発現が必須であることを明らかにした。

2: Fcレセプターのプロテアーゼによる機能亢進の機構について

末梢血の白血球と炎症部位に浸潤してきた白血球とでは、免疫複合体の貪食活性が著しくことなり、炎症性白血球の方が高い活性を示す。しかし、末梢血白血球をプロテアーゼ処理すると、炎症性白血球同様な活性を示すことが報告されている。Fcレセプター遺伝子を導入して強制発現させた細胞を用いてこの機構を解析した。Fcレセプターを発現した細胞をプロテアーゼ処理してもレセプターの切断などの構造的な変化は見られず、細胞表面のレセプター分布が極端に変動し、集積する傾向が観察された。これは、細胞膜の流動性が変化して、レセプター密度が局所的に高まることで、免疫複合体との結合性を強めることが示唆された。

3: Fcレセプターの細胞障害活性

モルモットマクロファージには2種類のFcレセプターが発現している。それぞれのFcレセプターを単独に強制発現させた細胞を用いて、その機能を比較検討した。2種類のFcレセプターのうち、FcRIIBが強い細胞障害活性を示すことが明らかになった。さらに、このFcRIIBに相当するレセプターをコードする遺伝子をラット白血球からも分離し、その構造を決定した。

以上、本研究において、モルモットマクロファージのFcレセプターの構造や機能を明らかにした。モルモットは炎症剤開発に用いられる実験動物であり、この研究成果は抗炎症薬開発を進めるうえで貢献するものであり、博士(薬学)の学位に値する業績と評価される。

◇