

学位論文題名

ヒト好中球の Fc γ R 及び CR3 を介する細胞応答の解析

学位論文内容の要旨

【序論】

生体内に侵入した異物は、IgG 抗体と結合し、免疫複合体(IC)を形成する。さらに、ICは補体系を活性化し、補体フラグメント iC3b と結合した iC3b-IC が生成する。一方、好中球などの食細胞の膜上には、IgG の Fc 部分に結合する Fc レセプター(Fc γ R)や iC3b をリガンドとする補体レセプター3 型(CR3)などのレセプター群が存在しており、iC3b-IC はこれらの食細胞レセプターを介して貪食除去される。ヒト好中球には、二種類の Fc γ R (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB)と CR3 の三種類の食細胞レセプターが発現している。これら個々のレセプターを介する細胞応答については、近年の遺伝子技術を応用した研究から、その情報伝達機構が分子レベルで解明されつつある。しかしながら、一つの食細胞には通常複数の Fc γ R が発現している。さらに、IC は生体内において速やかに iC3b-IC に変換されるため、炎症部位での食細胞の細胞応答は複数の Fc γ R と CR3 が関与する複雑なものであると考えられる。そのため、生体内での異物処理応答を理解する上で、Fc γ R 間、または Fc γ R と CR3 の協同作用による細胞応答の解析が不可欠であるが、現在までそのような視点に立った研究はほとんどない。筆者らは、IC (Fc γ R のみを刺激)、iC3b-IC (Fc γ R と CR3 の両方を刺激)、iC3b-IC [F(ab')₂] (CR3 のみを刺激)の三種類の刺激物に対する好中球の貪食応答の解析を行ってきた。これまでに、好中球が iC3b-IC に対し、他の刺激物よりも強い貪食活性を示すこと、また、IC が主に Fc γ RIIB を介して貪食されるのに対し、iC3b-IC は Fc γ RIIA と CR3 を介して取り込まれることを明らかにしてきた。本研究では、生体内で実際に起こると考えられる好中球の iC3b-IC 貪食応答のメカニズムについて解析を行った。

また、血流中に存在する好中球の異物処理能力は低いが、血管内皮を通り抜けて炎症部位へ浸潤する間に様々な刺激を受けると異物処理能力が亢進することが知られている。このうち、好中球の L-selectin と血管内皮細胞側の糖鎖リガンドとの結合は、炎症反応において好中球が最も初期に受ける活性化ステップであり、Fc γ R や CR3 を介する異物処理応答を増強すると考えられる。そこで、L-selectin のリガンドの一種である sulfatide が Fc γ R や CR3 を介する細胞応答に及ぼす影響についても解析した。

【結果及び考察】

1. ヒト好中球の iC3b-IC 貪食応答における Fc γ RIIA の役割

FITC 標識した三種類の刺激物と好中球を反応し、それぞれの貪食量をフローサイトメーターで測定した。貪食量を比較した場合、iC3b-IC が最も多く貪食された。好中球をチロシンキナーゼ阻害剤 herbimycin A で前処理すると、それぞれの貪食量は約 20% にまで減少した。この結果から、好中球の Fc γ R や CR3 を介する貪食応答におけるチロシンキナーゼの関与が示唆された。次に、好中球の貪食応答における Fc γ RIIA の役割について検討するため、各刺激物による Fc γ RIIA のチロシンリン酸化を比較した。iC3b-IC では Fc γ RIIA の強いリン酸化が認められたが、IC や iC3b-IC [F(ab')₂]ではほとんど検出されなかった。Fc γ RIIA の下流に位置するチロシンキナーゼ

Syk は、それ自身がチロシンリン酸化されるとキナーゼ活性が上昇する。iC3b-IC と反応させた場合、Syk の強いリン酸化が認められるが、IC や iC3b-IC [F(ab')₂] ではほとんど見られなかった。さらに、iC3b-IC 刺激による好中球の食食応答と Syk リン酸化に及ぼす herbimycin A の影響について調べたところ、両者ともほぼ同様の用量-阻害曲線を示した。以上の結果から、好中球の iC3b-IC 食食における FcγRIIA を介した Syk 活性化の重要性が示唆された。

好中球の CR3 を介する細胞応答には、ホスホリパーゼ D(PLD)の関与が示唆されている。PLD は、ホスファチジルコリン(PC)をホスファチジン酸(PA)に分解する酵素であり、エタノール存在下では PLD による PA 産生は抑制される。そこで、次に、好中球の iC3b-IC 食食に及ぼすエタノールの影響について検討した。エタノールで前処理しても、好中球の IC 食食応答には変化が見られなかった。一方、iC3b-IC はエタノール量に依存して食食量が減少し、0.7%で IC とほぼ同じレベルになった。さらに、PA をジアシルグリセロール(DG)に変換するホスファチジン酸ホスファターゼの活性を抑制するプロプラノロールで細胞を前処理しても、同様の結果が得られた。以上の結果から、好中球の iC3b-IC 食食における PLD を介した DG 産生の重要性が示唆された。

2. CR3 レクチン部位を介したヒト好中球の食食応答の調節

mAb を用いた阻害実験から、好中球の IC 食食応答は主に FcγRIIIB を介することが示唆された。FcγRIIIB は細胞内領域を持たない GPI アンカー型膜蛋白質で、好中球の細胞膜上で CR3 と会合している。そのため、FcγRIIIB からの情報は CR3 を経由して細胞内へ伝達されると考えられている。しかしながら、好中球の FcγRIIIB を介する食食応答に CR3 が関与するかは明らかではない。FcγRIIIB と CR3 との会合は CR3 のレクチン部位と FcγRIIIB の糖鎖間の結合を介しており、mannose によって会合が遮断されることが知られている。そこで、好中球の IC 食食応答に及ぼす糖質の影響について解析した。mannose で前処理すると、好中球の IC 食食応答は 25%にまで抑制された。一方、mannose 以外の糖質で前処理した場合にはこのような抑制は見られなかった。これまで、好中球では、CR3 以外の mannose レセプターの存在は報告されていない。そのため、この FcγR を介する食食応答の抑制は、CR3 レクチン部位に mannose が結合することにより惹起されると考えられた。また、mannose は CR3 自身を介する iC3b-IC [F(ab')₂] 食食応答も抑制した。この結果は、CR3 のレクチン部位に mannose が結合すると、FcγRIIIB だけでなく CR3 自身の細胞応答も低下することを示唆している。

3. 硫酸化スフィンゴ糖脂質 sulfatide によるヒト好中球の細胞応答の調節

好中球を可変量の sulfatide で前処理後、三種類の刺激物に対する食食応答を測定した。好中球の食食応答は、前処理に用いた sulfatide 量に依存して亢進し、sulfatide 250 μg/ml では、IC と iC3b-IC では未処理細胞の約 3 倍に、iC3b-IC [F(ab')₂] では約 7 倍に増加した。このとき、CR3 発現量も未処理細胞の約 3 倍に増加しており、iC3b-IC や iC3b-IC [F(ab')₂] 食食応答が亢進する理由のひとつと考えられた。sulfatide から硫酸基を除いた galactocerebroside では食食増強効果は認められないことから、硫酸化糖の部分が重要だと考えられた。好中球上で発現が報告されている唯一の sulfatide 結合分子である L-selectin は、chymotrypsin で処理すると膜表面から切断除去されることが知られている。しかし、好中球を chymotrypsin 処理しても、sulfatide による食食応答の亢進効果に変化は認められなかった。そのため、sulfatide は L-selectin 以外の膜分子と結合して細胞応答を亢進すると考えられた。これらの結果から、ヒト好中球の細胞膜上に、新規 sulfatide 結合分子の存在が示唆された。そこで、chymotrypsin 処理したヒト好中球の膜画分から sulfatide 結合分子の単離を試みた結果、lactoferrin が同定された。以上の結果から、sulfatide が、好中球の膜上に存在する lactoferrin と結合して好中球の食食応答を亢進することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 澤 滋 治

副 査 教 授 五十嵐 靖 之

副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

副 査 助 教 授 井ノ口 仁 一

学 位 論 文 題 名

ヒト好中球の Fc γ R 及び CR3 を介する細胞応答の解析

病原体などの異物(抗原)が生体内に侵入すると、これに対する IgG 抗体が産生されて抗原と結合し、免疫複合体(IC)を形成する。さらに、IC は古典的経路を介して補体系を活性化し、補体フラグメント iC3b と結合した iC3b-IC が生成する。一方、好中球やマクロファージなどの食細胞の細胞膜上には、IgG の Fc 部分に結合する Fc レセプター(Fc γ R)や iC3b をリガンドとする補体レセプター3 型(CR3)などのレセプター群が存在しており、iC3b-IC はこれらのレセプターを介して貪食除去される。

Fc γ R は、一次構造や IgG との親和性の相違から三種類のタイプ (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) に分類される。これら個々の Fc γ R を介する細胞応答については、近年の遺伝子技術を応用した研究から、その情報伝達機構が分子レベルで解明されつつある。しかしながら、生体内での主要な食細胞である好中球では二種類の Fc γ R が存在する。さらに、IC は生体内において速やかに iC3b-IC に変換されるため、炎症部位での食細胞の細胞応答は複数の Fc γ R と CR3 が関与する複雑なものである。本論文の前半部では、IC (Fc γ R のみを刺激), iC3b-IC (Fc γ R と CR3 の両方を刺激), iC3b-IC [F(ab')₂] (CR3 のみを刺激)の三種類の刺激物を用いて、生体内で実際に起こると考えられる好中球の貪食応答のメカニズムについて解析を行い、以下の成果を挙げた。

好中球の貪食応答における Fc γ RIIA の役割について検討するため、各刺激物による Fc γ RIIA のチロシンリン酸化を比較した。iC3b-IC では Fc γ RIIA の強いリン酸化が認められたが、IC や iC3b-IC [F(ab')₂]ではほとんど検出されなかった。Fc γ RIIA の下流に位置するチロシンキナーゼ Syk は、それ自身がチロシンリン酸化されるとキナーゼ活性が上昇する。iC3b-IC と反応させた場合、Syk のリン酸化が認められるが、IC や iC3b-

IC [F(ab')₂]ではほとんど見られなかった。以上の結果から、好中球の iC3b-IC 貪食における FcγRIIA を介した Syk 活性化の重要性が示唆された。

更にヒト好中球の iC3b-IC 貪食応答における CR3 の役割について研究を行い、ヒト好中球の iC3b-IC 貪食応答は、FcγRIIA を介し Syk の活性化を経て情報伝達される経路だけでなく、CR3 を介し PLD 活性化を経て情報伝達される経路も重要であることを明らかにした。更に、CR3 のレクチン部位を介した FcγRIIIB-CR3 間の結合は、FcγRIIIB を介する IC 貪食応答と、CR3 を介する iC3b-IC [F(ab')₂]貪食応答の両方に必要であることを明らかにした。

これらの知見は、生体内で実際に起こると考えられる好中球の iC3b-IC 貪食応答のメカニズムについての新たな知見であり、極めて独創性の高い研究成果といえる。

本論文の後半部では、ヒト好中球の sulfatide 結合因子について研究を行った。血流中に存在する好中球の異物処理能力は低いが、炎症部位へ浸潤する間に様々な刺激を受けると異物処理能力が亢進することが知られている。このうち、好中球の L-selectin と血管内皮細胞側の糖鎖リガンドとの結合は、炎症反応において好中球が最も初期に受ける活性化ステップである。そこで、L-selectin のリガンドの一種である sulfatide が FcγR や CR3 を介する細胞応答に及ぼす影響について解析した。好中球上で発現が報告されている唯一の sulfatide 結合分子である L-selectin は、chymotrypsin で処理すると膜表面から切断除去されることが知られている。しかし、chymotrypsin 処理しても、sulfatide による貪食応答の亢進効果に変化は認められなかった。これらの結果から、ヒト好中球の細胞膜上に、新規 sulfatide 結合分子の存在が示唆された。そこで、chymotrypsin 処理したヒト好中球の膜画分からの sulfatide 結合分子の単離を試みた。二種類のアフィニティクロマトグラフィーにより、sulfatide に特異的に結合する分子量約 70 K の膜蛋白質の単離に成功した。構造解析から、この膜蛋白質はラクトフェリンであることが明らかになった。

以上の研究成果は、炎症反応における好中球の過剰な応答を制御する医薬品の開発研究に有力な手がかりを与えるものであり、博士（薬学）の学位に値する業績と評価した。