

博士論文(2019年3月)内容の要旨および審査結果の要旨

鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科

氏名 ^{うちだりょうた}内田亮太

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博(薬)甲第4号

学位授与の日付 平成31年3月15日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目「マスト細胞の活性化制御機構に関する研究

-亜鉛ウェーブの役割とARF1による活性化制御について-

論文審査委員(主査)教授 定金 豊 博士(理学)

(副査)教授 佐藤 英介 医学博士

教授 鈴木 宏治 薬学博士、医学博士

教授 田口 博明 博士(薬学)

助教 坂 晋 博士(薬学)

論文要旨

氏名	内田 亮太
----	-------

論文の題名

マスト細胞の活性化制御機構に関する研究
- 亜鉛ウェーブの役割と ARF1 による活性化制御について -

論文の要旨

序章

マスト細胞は皮下組織や粘膜組織に広く分布する免疫担当細胞であり、様々な炎症性物質を放出して生体を防御している。体内に寄生虫などが侵入すると抗体産生細胞から Immunoglobulin E (IgE) 抗体が産生され、産生された IgE 抗体はマスト細胞の細胞膜にある Fcε 受容体 I (FcεRI) に結合する。そして、このマスト細胞に結合した IgE 抗体に抗原が結合して架橋が形成されると、脱顆粒やサイトカインの産生といった炎症反応が起きる[1]。また、マスト細胞には Toll 様受容体やサイトカイン受容体が発現しており、リポ多糖 (LPS) 刺激やサイトカイン刺激によっても活性化され、炎症反応を起こす[2]。しかし、このように生体防御に関与している一方で、花粉やダニの死骸など無害な抗原にも過剰に応答することがあり、花粉症や喘息・アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の原因にもなっている[2]。そのためマスト細胞の活性化制御機構の解明は重要である。マスト細胞の活性化機構において近年亜鉛シグナルが重要であることが明らかとなりつつある[3]。また、低分子量 G タンパク質 ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) のペプチド断片がマスト細胞の脱顆粒を抑制する作用を有することが報告された[4]。そこで、本研究において、第一章ではサイトカイン産生調節機構における亜鉛ウェーブの役割について、第二章では ARF1 ペプチドによるマスト細胞の活性化制御について検討した。

第一章：炎症性サイトカイン産生制御における亜鉛ウェーブの役割

マスト細胞においては、抗原刺激依存的に細胞質内亜鉛濃度が上昇する現象があり、亜鉛ウェーブと呼ばれている[5]。亜鉛ウェーブは抗原刺激後数分で見られ、およそ 15 分後をピークとして低下する。また、亜鉛ウェーブは小胞体から生じており、小胞体膜上に発現している L 型カルシウムチャネル (LTCC) によって制御されていることが明らかとなっている[6]。さらに、亜鉛ウェーブはサイトカインの転写を促進することが示されている。しかし、マスト細胞は抗原刺激の他に LPS 刺激やサイトカイン刺激によってもサイトカイン産生が誘導されるが、抗原以外の刺激における亜鉛ウェーブの関与の有無は明らかでなかった。そこで、亜鉛ウェーブが抗原刺激を介するシグナル経路以外にも関与している可能性について検証した。まず、LPS またはサイトカインである IL-33 刺激によって細胞質内亜鉛濃度の上昇が観察されるか否か亜鉛蛍光プローブを

用いて調べたところ、いずれの刺激においても刺激 30 分後に有意な蛍光強度の上昇が認められた。この上昇は LTCC 遮断薬であるニカルジピンによって抑制された。また、LPS および IL-33 刺激による IL-6 転写へのニカルジピンおよび亜鉛キレーター *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) の影響を検討したところ、ニカルジピンおよび TPEN で処理することによって有意に転写率が抑制された。これらの結果から、マスト細胞では LPS およびサイトカインによる活性化経路においても亜鉛ウェーブが関与していることが判明した。LPS はマスト細胞の他にも主に自然免疫担当細胞を活性化させてサイトカイン産生を誘導することから、これらの細胞の活性化においても亜鉛ウェーブが関与している可能性が考えられた。そこで次に、自然免疫担当細胞の一つである樹状細胞を用いて、サイトカイン産生における亜鉛ウェーブの関与の有無を調べた。その結果、樹状細胞を LPS 刺激した際にも亜鉛ウェーブが観察され、亜鉛ウェーブがマスト細胞特異的なシグナル経路に関与するだけではなく、様々な細胞のサイトカイン転写経路に関与している可能性が示唆された。(Uchida et al., Biol Pharm Bull. 42, 87-93 (2019).)

第二章：ARF1 ペプチドを用いた活性化制御機構の検討

ARF1 は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、一般的に細胞骨格の制御や小胞輸送、リン脂質の代謝などに関与していることが知られている。また、マスト細胞においては脱顆粒に関与していることが報告されている。さらに、ARF1 の N 末端ペプチド断片である ARF1(2-17)に膜透過モチーフ(MTM)を結合させた MTM-ARF1(2-17) (以下 ARF1 ペプチドと呼ぶ)には ARF1 の働きを阻害する作用があり、マスト細胞に関しては細胞レベルで脱顆粒を阻害する[4]。そこで、ARF1 ペプチドを用いてマスト細胞の活性化に及ぼす影響を検討した。まず、ARF1 ペプチドの脱顆粒抑制効果に関する構造活性相関を明らかにするため、ARF1 ペプチドの C 末端側および N 末端側からアミノ酸を削っていき、脱顆粒抑制効果に重要なアミノ酸配列を調べた。その結果、ARF1 ペプチドの 10, 16 番目のリシン (Lys) 残基を含む ARF1(10-16)の配列がマスト細胞の脱顆粒抑制効果の発現に重要であることが示された。次に、ARF1 ペプチドを用いてマスト細胞のサイトカイン産生および脂質メディエーター産生への影響を調べた。その結果、ARF1 ペプチドはこれらの物質の産生を阻害した。この結果から、ARF1 は脱顆粒のみならず、サイトカイン産生および脂質メディエーター産生にも関与する可能性が示された。さらに、ARF1 ペプチドの抗アレルギー効果を調べるためにマウスのアナフィラキシーモデルを用いてアナフィラキシー反応に及ぼす影響を検討した。その結果、ARF1 ペプチドはマウスのアナフィラキシー反応を抑制した。この結果から、ARF1 を標的としたアレルギー治療薬開発の可能性が示唆された。(Uchida et al., Mol Immunol. 105, 32-37 (2019))

以上の研究により、亜鉛ウェーブは様々な細胞において見られる重要なサイトカイン転写制御機構である可能性が示唆され、また、マスト細胞活性化機構における ARF1 シグナル経路の役割について新たな知見を見出した。

引用文献

1. Turner, H. and J.P. Kinet, *Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B24-30.
2. da Silva, E.Z., M.C. Jamur, and C. Oliver, *Mast cell function: a new vision of an old cell*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(10): p. 698-738.
3. Nishida, K. and R. Uchida, *Regulatory Mechanism of Mast Cell Activation by Zinc Signaling*. Yakugaku Zasshi, 2017. **137**(5): p. 495-501.
4. Nishida, K., et al., *Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in FcepsilonRI-mediated granule translocation and mast cell degranulation*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 932-41.
5. Yamasaki, S., et al., *Zinc is a novel intracellular second messenger*. J Cell Biol, 2007. **177**(4): p. 637-45.
6. Yamasaki, S., et al., *A novel role of the L-type calcium channel alpha1D subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: zinc wave*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39654.

※和文で作成すること。用紙サイズ A4、2500 字以内 (MS 明朝 10.5 ポイント)。

論文審査結果の要旨

【判定結果】

当委員会は、内田亮太氏による学位申請論文の審査および口述による諮問を行った結果、博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判定した。

【判定理由】

申請された論文は、マスト細胞の活性化制御機構に関する内容であり、マスト細胞で見出された細胞質内の亜鉛濃度上昇という現象の普遍性と、マスト細胞の脱顆粒を阻害するペプチドの構造と機能の関係について主に細胞生物学的手法での解明を試みた研究成果の報告である。

第一章では、マスト細胞で発見された抗原刺激による細胞質内の亜鉛濃度上昇（亜鉛ウェーブ）が、サイトカイン産生などのシグナル経路のセカンドメッセンジャーとして機能するという現象について、その普遍性について論じた。リポ多糖（LPS）刺激およびインターロイキン（IL）-33 刺激でも、抗原刺激時と同様にマスト細胞質内での亜鉛ウェーブを確認し、炎症性サイトカイン IL-6 産生のシグナル経路に関わっていることを明らかにした。さらに、自然免疫担当細胞の一つである樹状細胞においても、LPS 刺激により細胞質内での亜鉛ウェーブを確認し、IL-6 産生のシグナル経路に関与していることを示した。これらの結果から、マスト細胞で見出された亜鉛ウェーブの機構が、炎症性サイトカイン産生のシグナル経路に関わる普遍的な機構である可能性を示した。

第二章では、低分子量 G タンパク質 ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) の N 末の 2~17 残基のペプチドに膜透過モチーフ (MTM) を結合させた (MTM-ARF1²⁻¹⁷) が、マスト細胞の脱顆粒を阻害するという現象について詳細な解析を行い、脱顆粒阻害に関わるペプチド構造と阻害ペプチドの生体アレルギー反応への影響について論じた。ARF1²⁻¹⁷ の N 末端側および C 末端側のアミノ酸残基を段階的に削除したペプチドに MTM を結合した一連の MTM-ARF1 ペプチド群の脱顆粒阻害効果を調べ、MTM-ARF1¹⁰⁻¹⁶ が阻害効果を示す最小単位であることを示し、ペプチドに含まれる 3 つの Lys 残基の役割について考察した。また、MTM-ARF1⁸⁻¹⁶ が、炎症性サイトカインおよび脂質メディエーターの産生を阻害することを示し、マスト細胞の代表的な 3 つの細胞応答のシグナル経路を阻害することを示した。さらに、MTM-ARF1⁸⁻¹⁶ を腹腔内に投与すると、マウスのアナフィラキシー反応を抑制されることを示し、動物個体のアレルギー反応にも有効であることを示した。

以上の研究成果は、マスト細胞の活性化ならびにアレルギー反応の制御機構の解明に寄与するとともに、マスト細胞で見出された亜鉛ウェーブが炎症性サイトカイン産生のシグナル経路に関わる普遍的な現象であることを明らかにした点で高く評価でき、博士の学位を授与することに値する。