

学位請求論文の内容の要旨

領 域	医療生命科学	分 野	病態解析科学
氏 名	中野 学		
(論文題目) UDP/P2Y6 receptor signaling regulates IgE-dependent degranulation in human basophils (UDP/P2Y6 受容体によるヒト好塩基球 IgE 依存性脱顆粒反応の調節)			
主 査	伊藤 巧一		
副 査	丹藤 雄介		
副 査	高橋 徹		
副 査	高見 秀樹		
<p>【背景と目的】</p> <p>細胞外ヌクレオチド受容体である P2Y 受容体は、G タンパク共役型受容体である。細胞外ヌクレオチドの刺激は、P2Y 受容体を介し cAMP 産生、PKC 活性化や細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘導することで、細胞機能を調節する。細胞外ヌクレオチドは、アレルギー性炎症などで死滅した細胞からの漏出や、活性化した免疫細胞が放出することが報告されている。</p> <p>P2Y 受容体ファミリーである P2Y6 受容体は、UDP を特異的アゴニスト、MRS2578 を特異的アンタゴニストとする。UDP 刺激は、P2Y6 受容体に結合する Gαq タンパク、または Gα12/13 タンパクを作動させる。Gαq タンパクは、主に PKC 活性化と細胞内小胞体からの Ca^{2+} 放出を誘導する。また、Gα12/13 タンパクは、RhoGTP 産生と cAMP 産生による細胞外 Ca^{2+} の細胞内流入を誘導する。</p> <p>好塩基球は、寄生虫感染に対する生体防御の役割等を果たしているが、過剰反応によりアレルギー反応を誘導する。好塩基球の FcεRI シグナルは、PKC 活性化と細胞内小胞体からの Ca^{2+} 放出を誘導する。Gαq タンパクにより誘導されるシグナルは、FcεRI シグナルと同様であるため、Gαq タンパクの作動により好塩基球の脱顆粒が誘導されることが考えられる。好塩基球の脱顆粒を誘導する細胞内シグナルには、細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇が不可欠であり、Gα12/13 タンパクは細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることから、IgE 依存性脱顆粒を促進することが考えられる。</p>			

(注) 論文題目が外国語の場合は、和訳を付すこと。

【細則様式第 1 - 2 号続き】

本研究では、好塩基球の脱顆粒反応に対するP2Y6受容体の作用について検討した。好塩基球の脱顆粒で放出されるヒスタミンやロイコトリエンは、アレルギーの発症に重要な因子である。この研究は、アレルギー疾患治療のターゲットとして、P2Y6受容体が有用であるか評価する上で重要である。

【方法】

インフォームド・コンセントが得られた10名の健常人末梢血液から、磁気ビーズ法で好塩基球を単離した。FITC標識抗FcεRI抗体及びAPC標識抗CD123抗体で染色して、フローサイトメトリー解析により、細胞純度が94%以上であることを確認した。好塩基球のP2Y受容体及び細胞外ヌクレオチダーゼ(ENTPDase)発現をRT-PCR法で確認した。カルシウムプローブで標識した好塩基球を、HEPES-HBSS培地で 1×10^5 cells/mLに調製し、UDP刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。HEPES-HBSS培地で 1×10^5 cells/mLに調製した好塩基球を、UDP及び抗IgE抗体で刺激し、細胞表面脱顆粒マーカーであるCD63発現量の変化をフローサイトメトリー法で測定した。好塩基球をRPMI1640で 1×10^5 cells/mLに調製し、18時間培養した。培養上清を回収し、HPLC分析により細胞外ヌクレオチドを検出した。更に、好塩基球を5%自己血清/RPMI1640で 1×10^5 cells/mLに調製し、P2Y6受容体特異的アンタゴニストであるMRS2578存在下で培養した。培養後、IgE抗体で刺激し、CD63発現量の変化フローサイトメトリー法で測定した。MRS2578の細胞毒性は、Annexin-V及び7-AADを用いて評価した。

本研究は、弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得ている。

【結果・考察】

好塩基球は、P2Y6受容体 mRNA を発現していた。UDP 刺激は、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。また、MRS2578 は、UDP 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制した。以上の結果から、好塩基球に発現している P2Y6 受容体は、細胞内にシグナルを伝達していることが示唆された。UDP 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、抗 IgE 抗体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と同程度であった。P2Y6 受容体に $\text{G}_{\alpha q}$ が合する場合、UDP 刺激により脱顆粒が誘導されることが考えられた。UDP と抗 IgE 抗体の共刺激では、抗 IgE 抗体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対し 2 倍以上の上昇が確認された。この結果から、UDP 刺激は IgE 依存性脱顆粒を促進することが考えられた。

【細則様式第 1－2 号続き】

UDP 刺激は、好塩基球の脱顆粒を誘導せず、IgE 依存性脱顆粒を促進した(図 1)。この結果から、好塩基球の IgE 依存性脱顆粒の調節に P2Y6 受容体が関与していることが考えられた。また、UDP 単独刺激により脱顆粒が誘導されなかったことから、好塩基球の P2Y6 受容体に結合する G タンパクが $G_{\alpha q}$ ではないことが考えられる。

好塩基球の培養上清中から UTP を検出した。また、好塩基球で ENTPDase mRNA が発現していることを確認した。これらの結果から、好塩基球がオートクラインにより、P2Y6 受容体を刺激していることが考えられた。実際、MRS2578 存在下で培養した好塩基球は、抗 IgE 抗体の刺激による脱顆粒が誘導されず、この抑制効果は経時的に増強された(図 2)。この抑制効果が、MRS2578 による細胞傷害によるものではないことは確認している。

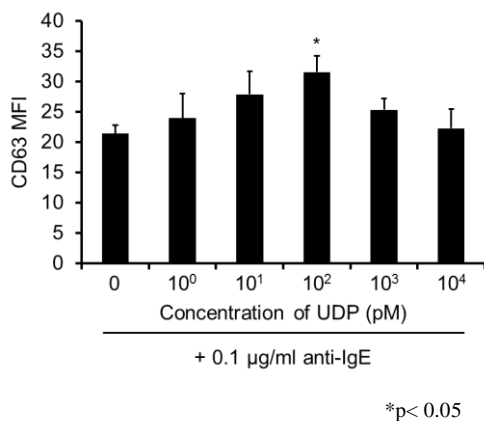


図1 UDP刺激によるIgE依存性脱顆粒の促進

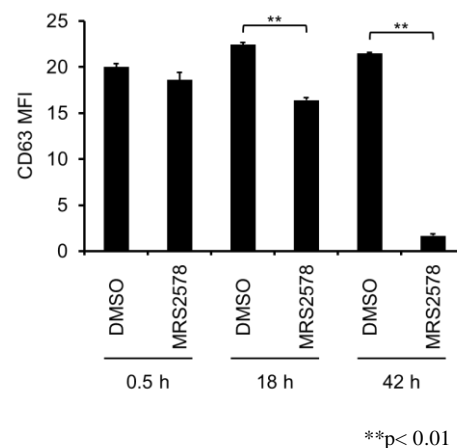


図2 MRS2578によるIgE依存性脱顆粒の抑制

【結語】

本研究の結果、好塩基球はオートクラインにより P2Y6 受容体を刺激し、IgE 依存性脱顆粒を促進している可能性が示唆された。また、MRS2578 が好塩基球の脱顆粒を抑制したことから、アレルギー症状の緩和治療のターゲットとして P2Y6 受容体は重要であると考えられる。

本研究は、好塩基球の脱顆粒に焦点を絞り検討した。今後は、好塩基球のサイトカイン産生等に対する P2Y6 受容体の作用を確認し、アレルギー症状の緩和だけでなく、アレルギー疾患根本治療のターゲットとして P2Y6 受容体が有用であるか検討する。

【細則様式第 1－2 号続き】

学位論文のもととなる研究成果としての筆頭著者原著

論 文 題 目	UDP/P2Y6 receptor signaling regulates IgE-dependent degranulation in human basophils
著 者 名	Manabu Nakano, Koichi Ito, Takeo Yuno, Nobuyuki Soma, Syun Aburakawa, Kosuke Kasai, Toshiya Nakamura, Hideki Takami
掲載学術誌名	ALLERGOLOGY INTERNATIONAL
巻, 号, 項	未定
掲載年月日	未定