

これらのことより松尾は以下のような考察に至っている。Gq/11と共役して存在するGPRg1は生理学的に活性を持った受容体であり、中枢神経では、線条体での発現が特に強い。これは線条体が関わる生理現象、すなわち運動機能への関与を示唆するものである。また、Gq/11との共役はGPRg1がphospholipase Cの活性化によるシグナル伝達を用いることを示唆する。

本論文が対象とする研究の評価

機能未知のGタンパク共役型受容体の採取からその受容体の分布、機能解析まで一連の研究が行われている。とくに機能解析についてはリガンドが不明な状態でも血清を含んだ状況では細胞内情報伝達経路の活性化が起きていることに着目し、最終的にGPCRの機能解析でもっとも重要とされるG蛋白の同定にまで至っていることは高く評価できる。受容体の採取から機能解析に至る過程を単独で行っており、松尾自身の受容体解析の能力を示したものである。

以上をふまえ、主査と副主査は博士学位論文公聴会（平成20年1月23日）を行い、慎重に審査を行った。その結果、本論文が博士学位論文に値すると判断された。

氏名	いしはし ひで お 市橋 秀夫
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第955号
学位授与の日付	平成20年3月22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	好酸球β2インテグリン依存性接着における phosphatidylcholine-specific phospholipase Cの 役割
論文審査委員(主査)	教授 東 田 有 智
(副主査)	教授 川 田 暁
(副主査)	教授 義 江 修

論文内容の要旨

【目的】

細胞内シグナル伝達経路に作用するリン脂質代謝酵素である phospholipase C (PLC) には 2 つのサブファミリーがある。phosphatidylinositol (PI)-specific PLC は細胞内 Ca²⁺ 濃度の調節に関与していることが知られているが、phosphatidylcholine (PC)-specific PLC はその生理機能について不明な点が多く、特に好酸球については検討されていない。今回、我々は ICAM-1 の代替タンパク質として使用可能な bovine serum albumin (BSA)-coated plate を用いて、platelet-activating factor (PAF) 刺激による好酸球β2 インテグリン依存性接着での PC-PLC の役割について検討した。

【方法】

ヒト好酸球は健康者の末梢血から採取し、抗ヒト CD16 磁気ビーズを用い negative selection 法によって分離した。PAF 刺激による好酸球の BSA-coated plate への接着の評価は、特異的に接着した好酸球に含まれる eosinophil peroxidase を enzyme immunoassay を用いて測定した。PAF 刺激による好酸球細胞表面の接着分子の発現は、特異抗体を用いて FACSCalibur で測定した。好酸球接着機能における PC-PLC の効果は PC-PLC 特異的阻害薬である D609 を用いた。次に好酸球の F-actin を FITC-phalloidin で蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞内 Ca²⁺ 濃度は Fluo 3-AM で染色したものを FACSCalibur を用いて測定し、FlowJo にて解析した。

【結果】

β2 インテグリン依存性の好酸球接着は PAF の濃度および時間依存性に増加した。また PAF 刺激によって CD11b の表面発現は増加したが、CD11a、CD11c の増加は認めなかった。D609 は濃度依存性に PAF 刺激によるβ2 インテグリン依存性接着を阻害したが、CD11b の表面発現は抑制しなかった。また PAF 刺激によって好酸球内の F-actin の重合を認めたが、この変化は D609 によって阻害された。さらに PAF 刺激によって細胞内 Ca²⁺ 濃度は急速に上昇したが、この上昇は D609 によって一部抑制された。

【考察】

PAF 刺激によって好酸球β2 インテグリン依存性接着は亢進したが、D609 はこの接着を阻害した。PC-PLC の好酸球β2 依存性接着への作用機序としては CD11b の発現量には直接作用せず、F-actin 重合を介してインテグリンの cluster 形成と、細胞内 Ca²⁺ 濃度の調節による接着分子の活性化に関与していると考えられた。

【結論】

PC-PLC は PAF 刺激による好酸球β2 インテグリン依存性接着を調節し、その機序として細胞骨格と細胞内 Ca²⁺ 濃度の調節を介して行われている可能性が示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 20 年 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学会雑誌 第 33 巻 第 1 号
	公 表 内 容	平成 20 年 月 日 発行予定
	全 文	

論文審査結果の要旨

好酸球はアレルギー性炎症の重要な effector cell であり、気管支喘息患者の気道にも浸潤を認め、その病態に重要な役割を果たしている。好酸球が組織に移動する際に、血管壁への接着が必要となり、好酸球細胞表面に発現しているインテグリンが血管内皮細胞表面のリガンドを介して特異的に行われる。好酸球が platelet-activating factor (PAF) などの刺激により血管内皮細胞と接着する際に、β2 インテグリン (CD18) が強く関与するが、好酸球ではβ2 インテグリンに対して 3 種類の αM インテグリン (CD11a, CD11b, CD11c) がヘテロダイマー構造を形成している。細胞内シグナル伝達経路に作用するリン脂質代謝酵素である phospholipase C (PLC) には 2 つのサブファミリーの存在が知られている。phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) は細胞内 Ca²⁺ 濃度の調節に関与していることが知られている。一方 phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) は細胞内 Ca²⁺ 濃度への関与を含め好酸球においてどのような作用があるのかは不明である。好酸球β2 インテグリン

依存性接着において、そのメカニズムに PC-PLC がどのような役割を果たしているかを検討した。

方法：

PAF 刺激による好酸球の Bovine serum albumin (BSA) coated plate への接着を、接着により残存した好酸球の EPO から求めた。また PAF 刺激による好酸球細胞表面の 3 種類の $\beta 2$ インテグリンサブファミリー (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18) 各々の発現量の変化を検討した。そこで PC-PLC inhibitor である D609 による接着への影響と、 $\beta 2$ インテグリンの各サブファミリーの発現への影響を検討した。次に好酸球の F-actin を蛍光染色して、PAF 刺激による形態変化と D609 による影響を顕微鏡を用いて観察した。最後に PAF 刺激による好酸球内の Ca^{2+} 濃度を測定し、D609 による影響を調べた。

結果：

$\beta 2$ インテグリン依存性の好酸球接着は PAF の濃度依存性に増加し、さらにこの接着に関与する接着因子である CD11b/CD18 の表面発現は増加したが、CD11a/CD18,

CD11c/CD18 の増加は認めなかった。PC-PLC inhibitor である D609 は、濃度依存性にこの $\beta 2$ インテグリン依存性接着を阻害したが、CD11b/CD18 の表面発現を抑制しなかった。また、PAF 刺激では好酸球内の F-actin の重合を認めたが、これらの変化は D609 によって阻害された。さらに、PAF 刺激によって好酸球の細胞内 Ca^{2+} 濃度は急速に上昇したが、この上昇は D609 によって一部抑制された。

考察：

PAF 刺激による好酸球接着にとって、 $\beta 2$ インテグリンは重要かつ特徴的な接着成分と考えられるが、PC-PLC は好酸球の接着因子の発現量には関与せず、F-actin 重合を通してインテグリンの cluster 形成を調節し好酸球接着に関与している可能性が考えられた。また PC-PLC は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に関与していると考えられた。これらの知見より、好酸球の接着のメカニズム解明の糸口になることが期待され、学位論文として価値ある研究と判断した。