

氏名(本籍)	柳 ^{やなぎ} 沢 ^{さわ} 裕 ^{ひろ} 美 ^み (埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1145号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	アナフィラトキシンC5a受容体cDNAのクローニング
主査	筑波大学教授 理学博士 坂内 四郎
副査	筑波大学教授 医学博士 小山 哲夫
副査	筑波大学教授 医学博士 渡邊 照男
副査	理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター 造血制御研究チーム チームリーダー (筑波大学客員教授) 医学博士 中内 啓光
副査	筑波大学助教授 医学博士 中村 了正

論 文 の 要 旨

〈目的〉

炎症は生体における防御機構の主要な過程のひとつであり、炎症巣には好中球、単球などの血液細胞の浸潤を認める。血液細胞が血管内皮細胞のバリアを通過し炎症巣へと動員されるためには走化性因子の濃度勾配による走化の誘導と、それに引き続くさまざまな機能の賦活化が必要である。本研究は、炎症巣における血液細胞の動員・活性化のメカニズムを分子レベルで解明しその炎症における役割を探ることを目的とした。そこで最も強力な走化性因子であり、アナフィラトキシンとして多彩な生理活性を有する補体由来のC5aを取り上げ、発現クローニング法によるC5a受容体cDNAのクローニングをおこなった。得られたcDNAクローンを用いて、C5a受容体の生化学的・薬理的検討をおこない、病態生理学的意義を含めて考察した。

〈方法〉

(1) C5a受容体cDNAのクローニングおよび全塩基配列決定

分化誘導したヒト前骨髄性白血病細胞株HL-60より、ポリ(A) RNAを調製し、ランダムプライマーを用いて2本鎖cDNAを合成した。pCDM8プラスミドベクターとcDNAのライゲーションをおこない、60万クローンからなるcDNAライブラリーを得た。cDNAをサブプールに分け、COS-7細胞にトランジェントトランスフェクションし、標識C5aを用いたバインディングアッセイとプ

レートのアートラジオグラフィーによりスクリーニングをおこなった。得られたクローンをサンガー法を用いて、シーケンシングした。

(2) C5a受容体サブタイプの検討

ゲノムサザン解析を行ない、C5a受容体cDNAとクロスハイブリダイズする関連の遺伝子が存在するかどうかを検討した。

(3) C5a受容体cDNAの薬理的検討

cDNAをCOS-7細胞にトランジェントトランスフェクションし、標識C5aとの結合に対する非標識C5aの阻害効果を検討した。cDNAをマウスLtk-細胞にトランスフェクションしstable transformantを作成した後、C5a刺激による細胞内カルシウムの上昇を検討した。

(4) C5a受容体mRNAの発現と細胞分化

U937細胞をdibutyryl-cAMPにより分化誘導する過程で経時的にノーザン解析を行い、mRNAの発現量を検討した。また同じ過程でC5aおよびFMLPに対する細胞内カルシウム上昇を検討した。

(5) C5a受容体のエンドトキシン血症における発現

ラットにリポポリサッカライドを経静脈投与しエンドトキシン血症をつくり、各臓器におけるC5a受容体mRNAの発現量の変化をノーザン解析法を用いて検討した。

〈結果および考察〉

(1) C5a受容体cDNAの全塩基配列決定と推定構造およびサブタイプの検討

ヒトC5a受容体cDNAをコードするクローンpC5aR-1をバインディングアッセイを用いた発現クローニング法により単離した。pC5aR-1は全長1269bpから成り、350個のアミノ酸残基をコードしていた。翻訳アミノ酸配列は全体としてG蛋白質共役受容体スーパーファミリーと有意な類似性を認め、特に7回の膜貫通部位において強く認められた。pC5aR-1とクロスハイブリダイズする関連遺伝子は、ヒトゲノム上では検出できなかった。

(2) C5a受容体の薬理学的特性

pC5aR-1をトランスフェクションしたCOS-7細胞と標識C5aの結合は非標識C5aによって競合的に阻害された。またC5a刺激によりC5aの濃度に依存して立ち上がりの早い細胞内カルシウムの上昇を認め、そのEC₅₀値は約0.15nMであった。

(3) C5a受容体mRNAの発現と細胞分化

C5a受容体mRNAは、顆粒球系および単球系の細胞において特異的に発現しており、それぞれの分化によってきわめて早期から誘導されることがあきらかとなった。また発現量は分化と共に増強することがわかった。

(4) エンドトキシン血症におけるC5a受容体mRNAの発現

ヒトC5a受容体mRNAの組織分布は、ラットでは肺において認められており、それはリポポリサッカライドによりdown-regulationされることがわかった。その標的細胞として、肺胞マクロファージやエンドトキシン血症によって肺に集積した末梢好中球などが考えられる。またC5a受容体mRNAは、受容体自身のリガンドであるC5aによってdown-regulationされることがわかった。

(5) 今後の展望

顆粒球系および単球系細胞の分化および機能のすぐれた指標となり得るC5a受容体mRNAの発現量を、白血病や骨髄異形成症候群などにおいて調べることは今後有意義であると思われる。またC5a-C5a受容体システムに異常をきたす病態において、C5a受容体を分子レベルで詳細に検討することは有意義であると考えられる。

審 査 の 要 旨

補体由来の走化性因子であるC5a受容体について、独自の手順でそのcDNAをクローニングした。このcDNAを用いてC5a受容体mRNAの発現を調べ、C5a受容体の発現が顆粒球系および単球系細胞の分化および機能のすぐれた指標となりうることを示した。また、C5a自身によるC5a受容体mRNAのdown-regulation, いわゆるhomologous down-regulationという注目すべき現象があることを、細胞レベルでも、個体レベルでも見つけている。これらの知見は、急性・慢性骨髄性白血病、走化性異常症などの病態を理解する上で、とりわけ専用である。たとえば、C5a受容体の発現程度を白血病細胞の成熟段階を評価する新しい指標として導入する可能性や、C5a受容体の量的あるいは質的異常がある種の走化性異常症の病態を説明する可能性が考えられる。これらのことより、本論文は博士（医学）学位論文として十分であると考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。