

氏名(本籍)	浦崎哲也(鹿児島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2417号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	好酸球活性化反応における細胞質型およびⅡA型ホスホリパーゼA ₂ の機能的役割の解析
主査	筑波大学教授 医学博士 住田孝之
副査	筑波大学教授 医学博士 山本雅之
副査	筑波大学教授 医学博士 関沢清久
副査	筑波大学助教授 医学博士 柴崎正修

論文の内容の要旨

(目的)

アレルギー性炎症疾患は、気管支喘息、アトピー性皮膚炎等の様々な形で現代人を悩ませている。近年の研究により、その原因として好酸球の役割が重要であることが判明してきた。好酸球が炎症反応に関与する患部局所においては、炎症性因子とされる分子量14kDaのⅡA型ホスホリパーゼA₂(PLA₂-ⅡA)が多量に存在することが知られている。好酸球はこのPLA₂-ⅡAを顆粒内に含有するとともに、細胞質内には分子量85kDaのPLA₂(cytosolic PLA₂; cPLA₂)を有することも明らかにされてきた。一般に、PLA₂は脂質メディエーターの産生等を介して炎症性疾患に関与することが知られているが、好酸球における機能に関してはまだ十分な知見は得られていない。そこで、筆者は好酸球におけるPLA₂の機能的役割を解明することを目的とした。

(対象と方法)

1. 健康人およびhypereosinophilic syndrome (HES)患者の末梢血から分離した好酸球を材料とした。
2. Magnetic activated cell sortingによりCD16陰性多形核白血球画分として分離した好酸球を0.1% gelatinを含むHBSSバッファーで懸濁し種々の刺激を加えた後、培養上清を回収した。
 - 1) leukotriene C₄ (LTC₄)の培養上清中への放出はEIAキットを用いて、
 - 2) eosinophil peroxidase (EPO)放出はo-phenylenediamineを基質としてH₂O₂存在下でperoxidase活性を測定することにより、
 - 3) CD69発現は抗CD69抗体を用いたフローサイトメトリーによりそれぞれ検出した。
3. 好酸球lysateを超遠心(180,000×g, 4℃, 30min.)することにより膜画分と細胞質画分に分離し、cPLA₂の検出は特異抗体を用いたウェスタンブロットにより行った。

(結果)

- 1) HES患者の末梢血から得た好酸球において、cPLA₂は未刺激の状態ですでにリン酸化を受けた状態にあり、基質となる膜画分に移行していた。

- 2) A23187により誘導されるLTC₄放出は、cPLA₂の特異的阻害剤であるAACOCF₃で用量依存的に阻害された。
- 3) 好酸球にpLA₂-II Aを添加してもLTC₄やEPOの有意な放出は認められなかったが、好酸球活性化抗原であるCD69を有意に発現させた。このCD69の発現は、p-bromophenacyl bromideで失活させたPLA₂-II Aを用いたり、EDTAでPLA₂-II Aの活性発現に必要な反応液中のCa²⁺をキレートしたりすると認められなかった。また、PLA₂-II Aによる代謝産物候補として数種の脂肪酸とリゾリン脂質の好酸球のCD69発現誘導に対する作用を検討したところ、リゾホスファチジン酸 (lysoPA) を初めとする数種のリゾリン脂質に作用が認められた。

(考察)

好酸球中に存在する二つのPLA₂のうち、cPLA₂は主として刺激後短時間で誘導されるLTC₄放出に関与し、さらにHES患者では末梢血レベルで既にリン酸化され膜画分に移行した状態、すなわち活性化状態にあり、LTC₄放出能の亢進に中心的な役割を果しているものと考えられた。一方、PLA₂-II Aは、好酸球に対しては、数分から数十分の単位で起こる早期型の活性化反応 (LTC₄, EPO 放出) には影響を与えず、数時間の単位で起こる後期型の反応 (CD69発現誘導) に影響を与えることにより、その機能を修飾しているものと考えられた。すなわち、オートクラインあるいはパラクライン的に好酸球の細胞膜表面のリン脂質に作用し、リゾリン脂質等の一部の代謝産物の遊離を介して、活性化抗原CD69の発現を誘導するなどして好酸球の機能を修飾するものと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、アレルギー性疾患の発症機序を明らかにするために、好酸球の炎症の引き金として重要である二つのホスホリパーゼ、細胞質内ホスホリパーゼ (cPLA₂) とII A型ホスホリパーゼ (PLA₂-II A) に焦点をあてて機能的役割について解析した。筆者は、健常人、hypereosinophilic syndrome (HES) 患者から分離した好酸球を対象として解析し、cPLA₂は、HES患者の好酸球では増加していること、未刺激の状態で既にリン酸化を受け膜画分に移行していることを明らかにし、cPLA₂がLTC₄産出に関与していることを示唆した。一方、PLA₂-II Aは、その代謝産物であるリゾリン脂質の遊離を介してCD69発現を誘導することを明らかにし、PLA₂-II AがCD69発現を介して好酸球の機能調節をしていることを示唆した。本研究は、アレルギー性疾患の発症機序、制御機構を解明する上で重要な成果であり、世界的にも高く評価されている。

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。