

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	清井 武志
審査委員	主査 佐山 浩二 副査 鳥居 本美 副査 檜垣 高史 副査 長谷川 均 副査 下川 哲哉

論文名：

ベージュマウス(Chédiak-Higashi 症候群)における巨大顆粒を有するマスト細胞の形態および機能解析

審査結果の要旨：

【背景と目的】

ベージュ(*bg/bg*)マウスは、*CHS*/*LYST* 遺伝子に突然変異を認め、細胞中の巨大化した分泌顆粒やライソゾームを特徴とするヒト Chédiak-Higashi 症候群のモデル動物である。ベージュマウスのマスト細胞に関する研究は、巨大顆粒をマーカーとしてマスト細胞が骨髄由来前駆細胞より分化することを証明した報告があるが、その機能解析に関する報告は乏しい。本研究ではベージュマウスのマスト細胞における開口分泌過程を形態学的に解析すると共にヒスタミン含量とヒスタミン遊離能の測定、さらにはヒスタミン遊離が引き起こすアナフィラキシー反応について検討を行った。

【方法】

雄性(10-15 週齢)の *bg/bg* マウス(C57BL/6-*bg/bg*) とその野生型(C57BL/6-+/+)およびヘテロ型(C57BL/6-*bg/+*)を実験に用いた。

DNA シーケンスによる *LYST* 遺伝子の解析により変異を確認した。

耳皮膚を採取し、パラフィン試料と透過型電子顕微鏡による組織学的解析を行った。また走査型電子顕微鏡(SEM)により、ヒスタミン遊離時に生じる開口分泌過程の形態観察を行った。

HPLC-蛍光法により皮膚ヒスタミン含量の測定を行った。また結合組織型マスト細胞として腹腔マスト細胞、粘膜型マスト細胞モデルとして IL-3(5ng/ml)存在下で培養(3~4 週)した骨髄

由来培養マスト細胞 (BMMCs) のヒスタミン含量ならびにヒスタミン遊離率を測定した。

耳皮膚に IgE を皮下注射し、24 時間後に抗原(DNP-BSA)とエバンスブルー混合液を尾静脈から投与した。30 分後に皮膚組織に漏出するエバンスブルー量を吸光測定し PCA 反応の評価を行った。さらに抗原刺激による耳皮膚組織中ヒスタミン含量とヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)活性の変化を測定した。

【結果と考察】

DNA シーケンスによる遺伝子解析から本研究で用いた *bg/bg* マウスの *Lyst* 遺伝子のエクソン 54 に 3 塩基欠損変異が明らかとなった。

耳皮膚の組織学的解析では、*bg/bg* マウスに巨大顆粒を有するマスト細胞を認めたが、マスト細胞数は各系統間で差を認めなかった。また *bg/bg* マウスの腹腔マスト細胞、ならびに BMMCs に巨大顆粒を確認した。

bg/bg マウスにおける耳皮膚のヒスタミン含量は+/+マウスの 57.7%と低値を示した。*bg/bg* マウスの腹腔マスト細胞、BMMCs のヒスタミン含量は、+/+マウスに比べてそれぞれ 64.8%、35.3%(3 週培養)と低値を示した。一方、*bg/+*マウスは+/+マウスと有意な差を認めなかった。

bg/bg マウス腹腔マスト細胞の Compound 48/80 に対するヒスタミン遊離率の最大反応値は+/+マウスの 1.53 倍、Thapsigargin(0.5 μ M)、Ionomycin(1 μ M)では+/+マウスのそれぞれ 1.25 倍、1.59 倍と高値を示した。また *bg/bg* マウス BMMCs の DNP-BSA に対するヒスタミン遊離率の最大反応値は+/+マウスの 4.6 倍、Thapsigargin(0.5 μ M)、Ionomycin(1 μ M)では+/+マウスのそれぞれ 2.89 倍、1.92 倍と高値を示した。SEM による形態学的観察では、ヒスタミン遊離時に起こる巨大顆粒の開口分泌過程を *bg/bg* マウスで確認した。*bg/+*マウスは+/+マウスと有意な差を認めなかった。

抗原刺激による PCA 反応の検討について、IgE 感作群ではコントロール群(PBS)に対してエバンスブルー漏出色素量の増加率は各系統間で差を認めなかった。また抗原刺激後の組織中ヒスタミン含量は低下しており、HDC 活性の上昇が見られたが各系統間で差を認めなかった。

【結論】

ベージュマウスのマスト細胞は野生型ならびにヘテロ型と比べてヒスタミン含量は低値を示すが、遊離反応性は高いことが明らかとなった。またヘテロ型のマスト細胞は、形態および生理機能的に野生型と類似した性質を示すことが明らかとなった。

本研究は Chédiak-Higashi 症候群のモデル動物であるベージュマウスのマスト細胞に関する研究である。巨大顆粒を有するベージュマウスのマスト細胞を詳細に解析しており、その成果からマスト細胞の脱顆粒反応機構の解明の進展が期待できる。

公開審査会は平成 28 年 2 月 22 日に開催され、申請者は研究内容を明快に発表し、以下の内容を含む多くの質問に対する的確に回答した。主な質疑の内容として、1) *Lyst* 遺伝子産物の組織、細胞内分布、2) 顆粒のサイズとヒスタミン含有量の相関関係について、3) 臨床研究に関して、4) ヒスタミン総量およびヒスタミン遊離のタイミングに関して、5) *Lyst* 遺伝子変異が Chédiak-Higashi 症候群の病態とどのように関わるのか、などであった。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。