

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 清井武志

学位論文名 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

【背景と目的】

ベージュ(*bg/bg*)マウスは、*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(CHS)のモデル動物である。

bg/bg 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(北村ら 1977)が著明であるが、その機能解析に関する報告は乏しい。本研究ではヘテロ型(*bg/+*)を含めた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皮膚受動アナフィラキシー反応について検討を行った。

【動物】

ベージュマウス(C57BL/6-*bg/bg*)とその野生型(C57BL/6-+/+)およびヘテロ型(C57BL/6-*bg/+*)を用いた。

【方法】

1. ジェノタイプピング

LYST 遺伝子の変異を確認するため、上記 3 系統マウスのジェノタイプピングを行った。

2. 形態学的解析

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、マスト細胞開口分泌過程の観察を行った。

3. ヒスタミン含量ならびにヒスタミン遊離率の測定

ヒスタミンの定量には HPLC-蛍光法を用いた。耳皮膚組織、骨髄由来培養マスト細胞(BMNCs)(IL-3(5ng/ml)存在下 4 週培養後、IL-3(5ng/ml)+SCF(10ng/ml)存在下 2 週培養)、腹腔マスト細胞(PMCs)のヒスタミン含量測定を行った。また BMNCs および PMCs を用いて、Compound48/80 (1, 10, 100, 1000 μ g/ml)、Thapsigargin (0.5 μ M)、Ionomycin (1 μ M)および抗原 DNP-BSA(0.2, 2, 20, 200ng/ml) による、ヒスタミン遊離率の測定を行った。

4. 皮膚受動アナフィラキシー反応の評価

耳皮膚を対象として、抗原刺激(DNP-BSA)による受動皮膚アナフィラキシー(PCA)反応の評価を行った。

【結果と考察】

1. 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。
2. 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、細胞数は各系統間で差を認めなかった。また *bg/bg* マウス BMMC_s ならびに PMC_s に巨大顆粒を確認した。
3. *bg/bg* マウスにおける耳皮膚組織、BMMC_s、PMC_s のヒスタミン含量は、それぞれ+/+マウスの 0.58 倍、0.60 倍、0.65 倍と低値を示した。一方、*bg/+*マウスは+/+マウスと有意な差を認めなかった。
4. *bg/bg* マウス BMMC_s の Compound 48/80 (10μg/ml)、Thapsigargin (0.5μM)、Ionomycin (1μM)、抗原 DNP-BSA に対するヒスタミン遊離率は、それぞれ+/+マウスの 1.31 倍、1.65 倍、1.61 倍、3.97 倍であった。また同様に *bg/bg* マウス PMC_s では、それぞれ 1.68 倍 (Compound 48/80 10μg/ml)、1.25 倍 (Thapsigargin 0.5μM)、1.59 倍 (Ionomycin 1μM) であった。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。
5. 抗原刺激による PCA 反応について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】

bg/bg 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、反応性は高いことが明らかとなった。*bg/bg* マスト細胞の性質は正常とは異なるが、生体においてマスト細胞由来の即時反応は正常と近似した反応性を示すことが示唆された。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。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済みである。

主論文 : Kiyoi T, Liu S, Sahid MNA, Shudou M, Ogasawara M, Mogi M, Maeyama K.

Morphological and functional analysis of beige (Chèdiak-Higashi syndrome) mouse mast cells with giant granules. *International Immunopharmacology* 2019 Apr;69:202-212.

DOI: 10.1016/j.intimp.2019.01.053.