

学位論文審査結果の要旨

氏名	Trivadila
審査委員	主査 松田 正司 副査 大八木 保政 副査 加藤 英政 副査 楠目 和代 副査 西田 直哉

論文名 マスト細胞におけるトランスポーターを介するヒスタミンの
取り込み機構の解析
審査結果の要旨

【緒言】 生体活性アミンであるヒスタミンはマスト細胞で産生・貯蔵され、抗原刺激により遊離してアレルギー反応を引き起こす。マスト細胞におけるヒスタミン遊離機構の解明は培養腫瘍細胞株であるラット好塩基球性白血病細胞(RBL-2H3)を用いた研究により進展してきたが、マスト細胞におけるヒスタミンの取り込みに関しては細胞内ヒスタミン濃度が高いことが解析の妨げとなってきた。申請者は新たにヒスタミン産生酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素活性を有さず、ヒスタミン含量が低下した RBL-2H3 細胞の亜株である RBL-2H3 Sc98 細胞を確立した。有機カチオントランスポーター organic cation transporter (OCT 1-3) と plasma membrane monoamine transporter (PMAT) はヒスタミン、セロトニンやカテコラミンの“uptake-2”トランスポーターとして知られている。申請者は RBL-2H3 Sc98 細胞を用いて細胞外からのヒスタミンの取り込みを確認し、さらにいずれのトランスポーターがマスト細胞におけるヒスタミンの輸送に関与するかを明らかにする目的で、それぞれのトランスポーターに対する阻害薬の作用と mRNA の発現を検討した。

【実験方法】

1) RBL-2H3 Sc98 細胞を 15%胎児血清と抗生物質を含む MEM 培地中で 5%CO₂、37°C条件下で培養した。

- 2) ヒスタミンを RBL-2H3 Sc98 細胞に負荷したのち、細胞内へのヒスタミンの取り込み（総ヒスタミン含量）を HPLC-蛍光法にて測定した。
- 3) uptake-2 トランスポーター阻害薬のヒスタミンならびに FFN206（蛍光カチオントランスポーター指示薬）に対する取り込み阻害効果を検討した。Uptake-2 トランスポーター阻害薬として decynium-22（非特異的 OCT 阻害薬）、desipramine（OCT-1 阻害薬）、cimetidine（OCT-2 阻害薬）、corticosterone（OCT-3 阻害薬）、lopinavir（PMAT 阻害薬）を用いた。
- 4) 2H3 Sc98 細胞における OCT ならびに PMAT の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。

【結果・考察】 RBL-2H3 Sc98 細胞はヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素活性の低下からヒスタミン含量は RBL-2H3 細胞の 0.5% であった。RBL-2H3 Sc98 細胞は細胞外からヒスタミンを濃度並びに時間依存的に取り込み、 EC_{50} は 111.4 M であった。RBL-2H3 Sc98 細胞は小胞モノアミントランスポーター (VMAT-2) を発現しており、細胞質に取り込まれたヒスタミンは VMAT-2 を介して顆粒に取り込まれ貯蔵される。RBL-2H3 Sc98 細胞において抗原刺激によるヒスタミンならびに α -ヘキソサミニダーゼの遊離が用量依存的に認められることから開口分泌過程は十分機能している。decynium-22 (10nM) によりヒスタミンの取り込みは 30.1% まで抑えられた。lopinavir、desipramine の FFN206 取り込み抑制における IC_{50} はそれぞれ 29.1 M、15.3 M であった。一方 cimetidine、corticosterone は抑制を認めなかった。同様に lopinavir、desipramine のヒスタミン取り込み抑制の IC_{50} はそれぞれ 3.78 M、20.7 M であり、cimetidine、corticosterone による抑制は認められなかった。RT-PCR 法にて PMAT ならびに OCT1 の mRNA の発現は認められたが、OCT-2、3 の発現はほとんど認められなかった。

【結論】 粘膜型マスト細胞の培養モデル細胞である RBL2H3 細胞の亜系であり、ヒスタミン産生能が低下した RBL-2H3 Sc98 細胞を用いて細胞外から取り込まれたヒスタミン含量を直接測定することによりヒスタミンが有機カチオントランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、mRNA の発現とトランスポーターに対する阻害薬の検討から PMAT と OCT-1 が候補トランスポーターであることが明らかとなった。アレルギーや炎症反応において末梢組織で分化増殖するマスト細胞が産生するヒスタミンは開口分泌を介さずに本トランスポーターを介して細胞外に輸送される可能性を考慮すると、本トランスポーターの生理かつ病態における役割を解明することが重要となる。

審査会は平成 28 年 8 月 5 日に開催された。発表後、本研究に対して質疑応答が行なわれ、1) RBL-2H3 細胞のマスト細胞のモデルとしての妥当性、2) 腹腔マスト細胞でのトランスポーターの発現パターンとの比較、3) トランスポーターのタンパク質レベルでの発現の確認、4) siRNA によるトランスポーター機能の確認、5) 本トランスポーターの病態での意義 6) uptake-2 トランスポーター阻害薬の VMAT-2 への影響、等の質問、指摘があり申請者は的確に回答した。申請者は、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があることを審査員全員一致で確認した。