

T細胞受容体クラスターとPTPN22(Lyp)を含む自己免疫関連分子集合体の解析

多根 (橋本) 彰子¹、佐久間 待恵¹、齊藤 隆¹

¹(独)理化学研究所生命医科学研究センター免疫シグナル研究チーム

チロシン脱リン酸化酵素PTPN22(Lyp)は、GWASにおいて様々な自己免疫性疾患と強い相関が示され、特にアミノ酸変異(R620W)を伴うSNPs産物が注目されている。本研究は、自己抗原への感受性を下げる分子機構として、PTPN22およびPTPN22(R620W)変異体によるT細胞受容体(TCR)活性調節の解明を目的とする。

抗原を認識したT細胞抗原受容体(TCR)がクラスターを形成し活性化を開始する様子は、人工脂質膜と全反射蛍光顕微鏡を用いて詳細に観察されている。そこで、T細胞活性化を抑制するPTPN22とTCRマイクロクラスターの同時観察を行ったところ、PTPN22はTCRマイクロクラスターへ集合した。しかし、ZAP70キナーゼなど活性化分子の速やかな集合に比べると30秒程度遅く、ネガティブフィードバックとして働くと考えられた。一方でPTPN22(R620W)変異体は、TCRマイクロクラスターへの集合量が減少した。

次にPTPN22の分子制御を明らかにするため、マスペクトル解析を用いて会合分子を探索したところ、それぞれが自己免疫性疾患と相関をもつ複数の脱リン酸化関連分子が同定された。これら抑制性分子もPTPN22同様に、TCR活性化に伴ってTCRマイクロクラスターに集合した。興味深いことにPTPN22(R620W)変異体は、それらの分子との結合も弱かった。

PTPN22は、TCR活性化に依存して、複数の脱リン酸化酵素関連分子と抑制性分子集合体を作りながらTCRマイクロクラスターに遅れて集合し、TCR活性化シグナルを抑制している事が予測される。R620W変異体では、TCRマイクロクラスターへの集合、他抑制性分子との結合の両方が阻害され、抑制活性が不十分となり、自己抗原など弱い刺激で活性化される可能性が考えられる。

ハチ毒に対する生体防御反応においてプロスタグランジンD₂受容体CRTH2が果たす役割

○木田 美聖¹、中村 達朗¹、藤原 祐樹¹、村田 幸久¹

¹東京大・院農・放射線動物科学

【背景・目的】近年、抗原特異的なIgE抗体を介した肥満細胞の活性化によって起こるアレルギー反応は、本来ハチ毒やヘビ毒などの動物毒の侵入に対する生体防御反応であるとされている。脂質メディエーターの1つであるプロスタグランジンD₂の受容体CRTH2を介したシグナルは、鼻炎やアトピー性皮膚炎などの様々なアレルギー性疾患を促進する働きをもつことが報告されている。しかし、動物毒に対する生体防御としてのアレルギー反応における役割は不明である。本研究では、CRTH2がハチ毒に対するアレルギー反応において果たす役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】野生型マウス(WT)に、致死量のハチ毒(640 μg)を皮下投与すると、約5時間後に体温が約10°C低下し、投与後3日間におけるその生存率は40%であった。CRTH2遺伝子欠損マウス(*Crth2*^{-/-})においてもWTと同程度の体温低下と生存率の低下が観察された。WTに少量(80 μg)のハチ毒を皮下へ前投与(感作)した後、再び致死量(640 μg)のハチ毒を投与すると、感作せずに致死量のハチ毒を投与した時と比較して、体温低下が有意に抑制され、3日後の生存率も上昇した。一方*Crth2*^{-/-}では、同様のハチ毒投与を行ったところ、感作による体温低下の抑制や生存率の上昇が観察されなかった。次にこのCRTH2を介した生体防御機構を解明するために、アレルギー反応の成立に必須であるIgE産生にPGD₂/CRTH2シグナルが与える影響を評価した。ハチ毒投与による感作後に、ハチ毒特異的なIgE値をELISAにて測定したところ、WTではハチ毒特異的なIgE値が上昇したが、*Crth2*^{-/-}においてはこの上昇の程度が有意に小さかった。樹状細胞は、生体に侵入してきた抗原を捕捉して活性化し、抗原提示能を有して所属リンパ節内に遊走することでIgE抗体産生を促進することが知られている。ハチ毒による感作24時間後の所属リンパ節内において、CD80とCD86を発現する活性化した抗原提示能を持つ樹状細胞の数が、WTのそれと比較して*Crth2*^{-/-}で有意に少なかった。

【結論】アレルギー反応はハチ毒の侵入に対する生体防御として機能しており、CRTH2シグナルはハチ毒特異的なIgE産生を促進することで、そのアレルギー反応を成立させていることが示された。またそのメカニズムとして、樹状細胞のリンパ節移行を促進している可能性が示された。

マウス移植癌における肥満細胞の性状

○山崎 愛理沙¹、中村 達朗¹、小林 幸司¹、堀口 和秀²、林 亜佳音¹、村田 幸久¹

¹東京大・院農・放射線動物科学、²福井大学学術研究院医学系部門解剖学分野

【背景・目的】

癌は自身の増殖のため、浸潤してきた血管や免疫細胞の性状を変化させて利用する。肥満細胞はアレルギーの発症に関与することで知られる免疫細胞であるが、ヒトの癌組織にもこの細胞が存在し、その数が肺癌では患者の予後不良と、乳癌では予後良好と相関することが報告されている。しかし、その詳細は明らかにされていない。本研究では、マウス移植癌における肥満細胞の由来や性状変化、およびその機構を明らかにすることを目的とした。

【結果】

組織学的検討により、正常組織(胃)の肥満細胞(正常肥満細胞)と比較して、マウスに移植した肺癌の肥満細胞は顆粒含量が少なく未成熟であった。一方、乳癌の肥満細胞は正常肥満細胞と同程度の顆粒を含有していた。また、免疫染色において、正常肥満細胞と比較して、肺癌の肥満細胞はIL-1 β や血管新生増殖因子VEGFを含む癌増殖促進因子の蛋白が強く発現していたのに対し、乳癌の肥満細胞ではこれらの発現上昇は観察されなかった。マウスの骨髄から単離分化させた肥満細胞へ、肺癌細胞の培養上清を処置したところ、上記の癌増殖促進因子のmRNA発現量は上昇したが、乳癌細胞の培養上清を処置するとこれらの発現は減少した。続いて、肥満細胞が肺癌の増殖に与える影響を検討した。野生型マウスに移植した肺癌は経時的に増殖した。このとき、癌組織内には多くの血管が新生し、マクロファージの浸潤が確認された。一方、肥満細胞欠損マウスに移植した肺癌の増殖は野生型のそれと比べて有意に遅く、新生血管とマクロファージの数も減少していた。これらの癌増殖の抑制および血管とマクロファージ数の減少は、骨髄由来肥満細胞を皮内に投与することで、一部回復した。遺伝子発現解析から、肥満細胞の成熟や活性を刺激する幹細胞因子SCFや形質転換増殖因子TGF- β のmRNA発現が、正常皮膚組織と比較して、肺癌組織において有意に上昇していることが分かった。興味深いことに、骨髄由来肥満細胞において、肺癌細胞の培養上清処置により上昇した癌増殖促進因子のmRNA発現は、TGF- β 受容体阻害剤の処置により有意に抑えられた。

【結論】

マウス肺癌に浸潤する肥満細胞は、癌細胞が産生するTGF- β の刺激を受けて癌増殖促進性の性質を獲得することが示唆された。一方で、乳癌に浸潤する肥満細胞は癌増殖抑制性に性状が変化していることが示唆された。

ブレオマイシンで誘発した肺線維症の病態形成における骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の役割

○倉金 虎太郎¹、小塚 友理¹、松山 真吾¹、磯濱 洋一郎¹

¹東京理科大・薬・応用薬理

【背景・目的】肺線維症は、慢性かつ進行性の線維化を主体とする間質性肺疾患である。本疾患は、肺間質に生じる慢性炎症によって誘発されるために、その治療は炎症を抑制することに主眼が置かれてきた。しかし近年では、ステロイドや免疫抑制薬などが、逆に予後を悪化させることが判明し、線維化そのものの病態生理に基づく新たな治療戦略の構築が望まれている。一方、肺線維症には肺癌が高率(6.3-31.6%)で合併し、このことは線維化と癌に共通する悪性化因子の存在を示唆している。そのような観点から本研究では、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)に着目し、肺線維症の病態形成時のMDSCの役割を調べた。

【方法】雄性ICRマウス(6週齢)にbleomycin(5 mg/kg)を気管内投与することで肺線維症罹患モデル動物を作製した。肺および骨髄中のMDSC(CD11b, Gr-1両陽性細胞)数をflow cytometry法で測定するとともに、肺の病態は Masson trichrome 染色による病理組織観察および線維化関連遺伝子の発現により評価した。また、本モデル動物に、抗Gr-1抗体(1 mg/kg, i.v.)によるMDSC阻害、またはマウス骨髄から単離したMDSCの移植(5.0×10⁶ cells, i.v.)を行い、肺線維症病態への影響を調べた。

【結果・考察】Bleomycin投与後、1～7日目に一過性の気道炎症(第1相)に続いて、14□21日目に徐々に肺の線維化(第2相)が進行した。肺内のMDSC数を経日的に調べると、第1相では著明で一過性の増加、第2相では穏やかで持続的な増加を認めた。本マウスに抗Gr-1抗体を投与して各相のMDSCを阻害すると、第1相のMDSCの阻害が炎症および線維化をともに増悪させたのに対し、第2相のMDSCを阻害すると線維化は軽減された。また、第2相期にMDSCを移植すると、その後の線維化が増悪する傾向にあった。すなわち、MDSCは肺線維症の病態形成において、初期の炎症段階では抑制的に、後期の線維化段階では促進的にと相反する働きをすることが考えられた。

これらの成績は、MDSCが線維化の段階でこれを促進する悪性因子として働くことを示唆する初めての知見であり、肺線維症の治療戦略を考える上で新たな視点を与えるものとして興味深い。

インスリン分泌後のエンドサイトーシス制御機構の解析

○木村 俊秀¹、山岡 真美²、石崎 敏理²、石川 智久¹

¹静岡県立大学薬学部薬理学教室、²大分大学医学部薬理学講座

【目的】Rab27aは膵B細胞に高発現する低分子量Gタンパク質で、そのGTP型はインスリン分泌経路の内でエキソサイトーシスの上流過程を制御している。私たちは、新たなRab27a結合タンパク質を探索する過程で、これまで不活性型と考えられていたGDP型のRab27aに結合するcoronin3とIQGAP1を同定した。さらに、グルコースによってGDP型に変換されたRab27aがIQGAP1やcoronin3と結合することで、開口放出で細胞膜に融合したインスリン顆粒膜を細胞内に回収するステップであるエンドサイトーシスを制御することを明らかにした。本研究では、新たなGDP型Rab27a結合タンパク質の同定とその機能解析を行うことで、膵B細胞でエンドサイトーシスを制御する分子メカニズムの解明を試みた。

【方法】プロテオーム解析より、GDP型Rab27a新規結合タンパク質を探索した。結合の様式は、免疫沈降実験やpull down assayにより調べた。細胞内の局在は、培養膵B細胞であるMIN6細胞を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

【結果】GDP型Rab27a新規結合タンパク質としてプロトンポンプを同定した。生化学的な解析より、両者の結合は特異的かつ直接であった。さらに、プロトンポンプのGDP型Rab27a結合サイトを同定した。同定したサイトを用いてタンパク質間の結合を阻害した結果、プロトンポンプ活性が阻害された。

【考察】インスリン顆粒内のpHは、プロトンポンプによって制御されている。これは、インスリンの成熟に必須の過程である。一方、開口放出による急激なpHの上昇は、プロトンポンプの活性を一時的に阻害することが知られている。私たちは、GDP型Rab27aがプロトンポンプの再活性化を介してエンドサイトーシスを制御することを明らかにした。この過程は、取り込まれた小胞がリソソームやエンドソームなどの酸性オルガネラと融合する際に必要な過程である。

DGK γ 欠損による膵 α 細胞機能への影響の検討

○芹澤 環¹、金子 雪子¹、戸倉 広貴¹、松浦 朋哉¹、澤谷 俊明¹、石川 智久¹

¹静岡県立大学薬学部薬理学分野

【目的】近年、膵 α 細胞欠損マウスにおいて膵 β 細胞を破壊しても血糖値が上昇しないなどの報告から、糖尿病発症過程における膵 α 細胞機能およびグルカゴンの作用についての重要性に注目が集まっている。生理活性脂質である diacylglycerol (DAG)は糖尿病病態下においてインスリン分泌機能障害の原因の一つであると考えられ、その量は diacylglycerol kinase (DGK)により制御されている。当研究室ではDGK γ が膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進的に制御する分子であることを明らかにしている。しかし、DGK γ と膵 α 細胞機能との関連性は不明である。そこで、膵 α 細胞機能に対するDGK γ の役割を明らかにするため、全身性DGK γ 欠損マウス(DGK γ KO)を用いて膵 α 細胞機能の検討を行った。

【方法】膵臓薄切切片を用いた免疫染色法により膵 α 細胞及び膵 β 細胞面積の定量を行った。DGK γ 欠損31週齢DGK γ KOマウスにstreptozotocin (STZ)を投与し、随時血糖値・体重を測定した。さらに、血漿グルカゴン濃度、血漿アミノ酸値の測定を行った。

【結果及び考察】膵臓薄切切片を用いた免疫染色法により、膵 α 細胞においてDGK γ が発現していることを確認した。また、膵 α 細胞量について画像解析を行った結果、DGK γ hetero KOマウスにおいて膵 α 細胞面積比がWTと比較して増加傾向を示し、グルカゴン分泌量が増加している可能性が考えられた。しかし、WTとDGK γ hetero KOマウスで随時血糖値に差は認められなかった。 α 細胞量はDGK γ 欠損により増加傾向を示したが、一方で膵 β 細胞量は変化しないことから、インスリンによりグルカゴン分泌が抑えられているため、血糖値の変化が現れていない可能性が考えられた。そこでSTZ投与により膵 β 細胞を破壊した条件下におけるDGK γ 欠損マウスの血糖値への影響について検討した。しかしながら、STZを投与してもSTZ誘発高血糖症状のさらなる上昇は認められず、膵 α 細胞量の増加によるグルカゴン分泌の亢進の可能性は否定された。そこで、血漿グルカゴン値の測定を行った結果、DGK γ 欠損マウスにおいて血漿グルカゴン値が空腹時ではWTと比較して有意に低値を示した一方で、摂食時では高値を示すという、血漿グルカゴン値の異常が認められた。また、DGK γ の肝臓アミノ酸代謝への影響について確認した結果、血中アミノ酸レベルにDGK γ 欠損の影響は認められなかった。以上の結果より、DGK γ 欠損マウスにおいて、膵 α 細胞量の増加とグルカゴン分泌異常が惹起されていることが示唆された。

中枢ドパミンD₂受容体による血糖調節機構の糖尿病における変化○竹田 祥大¹、浜田 真美加¹、米持 奈央美¹、亀井 淳三²、池田 弘子¹¹星薬科大・薬・薬物治療、²星薬科大・薬・生体分子薬理

糖尿病は慢性的な高血糖状態を主徴とする疾患であり、主に1型と2型に大別される。高血糖状態が長期間続くと様々な合併症をひき起こすため、血糖値を正常にコントロールすることは糖尿病治療において非常に重要である。血糖調節は末梢組織のみならず中枢神経によっても制御されることが示唆されているが、中枢神経による血糖調節の詳細には不明な点が多い。当研究室では、中枢のドパミンD₂受容体が血糖調節に関与することを報告している。そこで本研究では、中枢のドパミンD₂受容体による血糖調節の機序を明らかにするとともに、糖尿病時に中枢のドパミンD₂受容体による血糖調節機構が変化するか検討した。まず、6週齢のICR系雄性マウスにドパミンD₂受容体作動薬のquinpiroleを脳室内投与したところ、対照マウスと比較して有意な血糖値の上昇が認められ、この作用はD₂受容体拮抗薬のl-sulpirideにより抑制された。次に、中枢のドパミンD₂受容体刺激による血糖上昇作用に肝糖産生が関与するか検討した結果、quinpiroleの投与により肝臓における糖新生酵素phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) およびglucose-6-phosphatase (G6Pase) のmRNA発現量は増加し、グリコーゲン量は減少した。さらに、中枢のドパミンD₂受容体の刺激による血糖上昇作用に自律神経が関与するか検討した結果、quinpiroleによる血糖上昇作用は肝迷走神経の切除により抑制されたが、β₂アドレナリン受容体拮抗薬のICI 118,551の前処置では変化しなかった。これらの結果から、中枢のドパミンD₂受容体の刺激は、副交感神経を介して肝糖産生を亢進させることにより血糖値を上昇させることが示唆された。次に、ドパミンD₂受容体による血糖調節が糖尿病時に変化するか検討した。1型糖尿病モデルのstreptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスにquinpiroleを投与しても、血糖値の上昇は認められなかった。そこで、エネルギー調節を担う視床下部のドパミンD₂受容体のmRNA発現量を測定したところ、STZ誘発糖尿病マウスではD₂受容体mRNA発現量が減少していた。さらに、肝糖産生について検討したところ、STZ誘発糖尿病マウスでは対照マウスと比較してPEPCK mRNA発現量は増加していた一方、G6Pase mRNA発現量は減少しており、quinpiroleを投与してもこれらの発現は変化しなかった。以上の結果より、STZ誘発糖尿病マウスでは視床下部のドパミンD₂受容体の減少ならびに肝糖産生能の変化により、中枢のドパミンD₂受容体刺激による血糖上昇作用が消失することが示唆された。

Streptozotocin 誘発糖尿病マウスの社会性行動の変化に対する neuropeptide Y の関与

○植田 大暉¹、山岸 愛実¹、米持 奈央美¹、亀井 淳三²、池田 弘子¹

¹ 星薬科大・薬・薬物治療、²星薬科大・薬・生体分子薬理

糖尿病は様々な合併症をひき起こし、日常生活が困難になることが問題となる。糖尿病患者では精神障害の罹患率が高いことが報告されている。精神障害の一因として、社会性の低下による他者とのストレスや関係性の低下が挙げられることから、糖尿病患者では社会性の低下により精神障害を発症する可能性が考えられる。一方、視床下部には様々なペプチド神経が存在し、これらは全身のエネルギー状態の変化により活性が調節される。その1つである neuropeptide Y (NPY) 神経は全身のエネルギー低下により活性化し、摂食行動を促進させる。また、NPYは社会性行動にも関与する可能性が指摘されている。糖尿病時には全身のエネルギー状態が大きく変化することから、視床下部のNPY神経の活性が変化することで社会性が低下する可能性が考えられる。そこで本研究では、1型糖尿病モデルであるstreptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスにおける社会性行動の変化に脳内NPYが関与するか検討した。実験には4週齢のICR系雄性マウスを用い、糖尿病はSTZ (200 mg/kg, i.v.) により誘発した。Social interaction testにより社会性行動を測定した結果、STZ誘発糖尿病マウスでは対照マウスと比べて社会性行動の低下が認められた。次に、視床下部におけるNPY mRNA発現量を測定した結果、対照マウスと比べてSTZ誘発糖尿病マウスではNPY mRNA量が有意に増加した。そこで、NPYが社会性行動に関与するか明らかにするため、NPY Y₁受容体とY₂受容体の作動薬を未処置マウスに投与し、社会性行動を測定した。その結果、Y₁受容体作動薬の [Leu³¹, Pro³⁴]-neuropeptide Yを脳室内投与しても社会性行動は変化はしなかったものの、Y₂受容体作動薬のneuropeptide Y 13-36 (NPY 13-36) の脳室内投与により社会性行動の低下が認められた。また、NPY 13-36による社会性行動の低下は、Y₂受容体拮抗薬のBIIE 0246を前処置することによって改善した。以上の本研究の結果より、NPYはY₂受容体を介して社会性行動を低下させることが示された。また、糖尿病時にはNPY神経が活性化し、Y₂受容体を刺激することで、社会性行動が低下することが示唆された。

Streptozotocin誘発糖尿病マウスにおける恐怖記憶の変化とAMPA受容体の関与

○山岸 愛実¹、植田 大暉¹、米持 奈央美¹、亀井 淳三²、池田 弘子¹¹星薬科大・薬・薬物治療、²星薬科大・薬・生体分子薬理

糖尿病患者ではうつ病や不安障害といった精神疾患の罹患率が高いことが報告されているが、その発症メカニズムは不明である。これまでに当研究室では、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスにおいて恐怖記憶が増強することを報告している。恐怖記憶には扁桃体や海馬のグルタミン酸神経が関与し、特にAMPA受容体が重要な役割を果たすことが報告されている。したがって、STZ誘発糖尿病マウスにおける恐怖記憶の増強には、扁桃体や海馬のAMPA受容体の機能変化が関与する可能性が考えられる。そこで本研究では、STZ誘発糖尿病マウスの恐怖記憶の増強に扁桃体および海馬のAMPA受容体が関与するか検討した。実験には4週齢のICR系雄性マウスを使用した。糖尿病はSTZ (200 mg/kg, i.v.) により誘発した。また、対照マウスにはクエン酸緩衝液を投与した。恐怖条件付け試験を行った結果、STZ誘発糖尿病マウスでは対照マウスと比較してすくみ行動持続率が増加した。次に、STZ誘発糖尿病マウスの扁桃体または海馬にAMPA受容体拮抗薬のNBQXを微量注入したところ、STZ誘発糖尿病マウスにおけるすくみ行動持続率の増加は抑制された。そこで、扁桃体および海馬に注目し、AMPA受容体サブユニットの一つであるGluR1およびSer 845部位がリン酸化されたGluR1 (pGluR1) のタンパク質量をWestern blot法を用いて検討した結果、STZ誘発糖尿病マウスの扁桃体および海馬においてpGluR1のタンパク質量が有意に増加した。GluR1のSer 845部位はprotein kinase Aの触媒サブユニット (PKAc) によってリン酸化されることが報告されていることから、PKAcおよびその活性化体であるリン酸化PKAc (pPKAc) のタンパク質量を測定した。その結果、STZ誘発糖尿病マウスの扁桃体および海馬においてpPKAcのタンパク質量が有意に増加した。最後に、STZ誘発糖尿病マウスにPKA阻害薬のH-89を脳室内投与したところ、STZ誘発糖尿病マウスにおいて認められたすくみ行動持続率の増加はH-89により減少した。以上の本研究の結果より、糖尿病時には扁桃体および海馬のPKAの活性が増強することによりAMPA受容体の機能が亢進し、恐怖記憶が増強することが示唆された。

ドーパ受容体 GPR143 遺伝子欠損マウスにおけるニコチンの効果および喫煙患者における GPR143 の一塩基多型解析

○増川 太輝¹、西澤 大輔²、笠原 由佳¹、北村 慧¹、金井 香央里¹、池田 和隆²、五嶋 良郎¹

¹横浜市立大・医・分子薬理神経生物、²(公財)東京都医学総合研究所精神行動医学研究分野

L-DOPA(ドーパ)はそれ自体では生理活性を持たず、その薬理作用は L-アミノ脱炭酸酵素 (AADC) によってドパミンに変換されることにより発現するものと考えられてきた。一方、我々はドーパ自体が神経伝達物質であるとの仮説を提起してきた。我々は今まで、ニコチンが、ドーパを側坐核および線条体から遊離させることや、ニコチンの行動に及ぼす効果の一部が、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステルにより抑制されること等を明らかにしてきた。最近になり、我々は G 蛋白質関連型受容体 GPR143 がドーパ受容体候補分子である事を報告した。今回、ニコチンの薬理作用における GPR143 の役割を解明するため、ニコチンによる行動変化を野生型および GPR143 遺伝子欠損マウスを用いて比較・検討した。野生型マウスにおいて、ニコチン(1.0 mg/kg, i.p.) は、自発運動量を抑制した。その効果は GPR143 遺伝子欠損マウスにおいて減弱した。また、条件付け場所嗜好試験により、ニコチン (0.5 mg/kg, i.p.) の報酬効果について検討した。その結果、ニコチンによる報酬効果は、野生型と GPR143 遺伝子欠損マウスとの間で差は認められなかった。以上の知見は、GPR143 が少なくともニコチンの急性効果に関与することを示す。これらのことから、ニコチンの薬理作用の一部にドーパ-GPR143 シグナルが関与することが示唆された。現在、喫煙患者における GPR143 遺伝子の一塩基多型との関係性を解析しつつある。

パーキンソン病態下ドパミン神経細胞の脆弱性に対するアストロサイトの影響

○松本 紘聡¹、須田 雪明²、葛巻 直子^{1,2,3}、海野 日向¹、成田 道子¹、服部 信孝⁴、岡野 栄之^{2,3}、成田 年^{1,2}

¹星薬科大学薬理学研究室、²星薬科大学先端生命科学研究センター(L-StaR)、³慶應義塾大学医学部生理学教室、
⁴順天堂大学医学部脳神経内科

神経細胞の機能や生死を規定するのは、神経細胞内要因だけではなく、神経細胞外微小環境の影響も重要であると言える。実際に、近年、神経細胞を取り巻くグリア細胞を含む脳内環境の変化が、脳虚血や筋萎縮性側索硬化症などの神経細胞死を伴う神経疾患の病態形成に関与していることが明らかとなっている。一方、パーキンソン病(PD)病態下で認められるドパミン(DA)神経特異的脆弱性におけるアストロサイトの変容やその関与については、未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、ヒトiPS細胞からアストロサイトを誘導し、PD病態下DA神経細胞の脆弱性に対するアストロサイトの影響について検討を行った。まず、健常者ならびにPD患者由来iPS細胞からアストロサイトへの誘導を試みた。その結果、健常者群ではGFAP陽性アストロサイトへの分化が確認されたのに対し、PD患者群では同条件下で分化誘導させたにも関わらず、GFAP陽性アストロサイトの存在はほとんど認められなかった。一方、グリア前駆細胞の段階から発現することで知られるCD44ならびにvimentinについては、健常者群と同様にPD患者群においても発現が確認されたことから、PD病態下では、成熟分化できずにグリア前駆細胞のまま分化が停止した未熟な細胞集団である可能性が示唆された。そこで次に、DA神経細胞の脆弱性に対するアストロサイトの保護作用の有無について検討するため、健常者ならびにPD患者由来iPS細胞からDA神経細胞を作製し、成熟アストロサイトとの共培養を試みた。細胞障害性を有する6-OHDAを作製したDA神経細胞に処置し、乳酸脱水素酵素(LDH)遊離量を指標に細胞脆弱性の評価を行った。その結果、PD病態下で認められる6-OHDA処置によるLDH遊離量の著明な増加は、アストロサイトの共培養により有意に抑制された。これらの結果より、DA神経障害の亢進に対して、アストロサイトは保護的な役割を持つことが明らかとなった。以上、本研究の結果より、DA神経細胞障害に対するアストロサイトの保護作用の破綻が、PD病態下におけるDA神経細胞の細胞死を惹起する一因である可能性が示唆された。

アルファ7型ニコチン受容体に対する新たな内在性修飾因子Ly6Hの作用機構: GPIアンカーの必要性

○浅野 慎介¹、森脇 康博¹、渡邊 みずほ¹、久保 那月¹、加藤 総夫²、三澤 日出巳¹

¹慶應義塾大・薬・薬理、²東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター神経生理

【目的】ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)はイオンチャネル型受容体であり、多数のサブタイプが存在する。その中でも脳内で高度に発現が見られる $\alpha 7$ サブタイプは、学習・記憶や注意・集中などの高次脳機能に重要な役割を果たす他、神経伝達物質放出を制御していることが報告され、様々な神経変性疾患の創薬ターゲットとして注目を集めている。我々は $\alpha 7$ nAChRと強い結合性を持つヘビ神経毒 α -ブンガロトキシンと類似構造を持つ内在性タンパク質群 lymphocyte antigen-6 superfamily (Ly6SF)に着目している。Ly6SFに属する約30種類のタンパク質は分子量が10 kDa程度と小さく、GPIアンカー型(膜結合型)として存在する。このうちの1つであり、脳および免疫系細胞で高い発現がみられるLy6Hは、 $\alpha 7$ nAChRの内在性修飾因子である可能性が高いと考え、その生理的役割の解明に取り組んでいる。

【方法】HEK293細胞に $\alpha 7$ nAChRの発現に重要な2種類の分子シャペロンNACHOおよびRIC-3と $\alpha 7$ nAChR cDNAを導入することで $\alpha 7$ nAChR形質膜上安定発現細胞株(TARO細胞)を作製した。TARO細胞にLy6Hを発現させ、 $\alpha 7$ nAChRを介したリガンド応答電流の変化をパッチクランプ法にて測定し、Ly6Hの修飾作用を解析した。次にLy6Hが形質膜上で作用を示すことをGPIアンカー切断処理や可溶型Ly6Hの細胞外投与実験により確認した。また、Ly6H作用のGPIアンカーの重要性を調べるために、Ly6HのGPIアンカー部分をLDL受容体の膜貫通領域に置き換えたコンストラクト(Ly6H TM)を作製し、共免疫沈降法、パッチクランプ法にて、結合性やチャネル活性に対する作用を解析した。

【結果】TARO細胞にLy6Hを発現させ、 $\alpha 7$ nAChRを介したリガンド応答電流を解析した結果、応答電流の抑制が見られた。一方で、GPIアンカー切断処理により、Ly6Hの修飾機能はキャンセルされたことから、Ly6Hは形質膜上で修飾作用を示すことが示唆された。次に、可溶型Ly6Hを投与した結果、リガンド応答電流の抑制は見られたものの、野生型Ly6Hを細胞に共発現した時に比べ、抑制率が低下していた。また、Ly6H TMはLy6Hと同様の $\alpha 7$ nAChR結合能は認められるものの、リガンド応答電流の抑制は観察されなかった。以上の結果より、Ly6Hの修飾作用にはGPIアンカーが重要であることが示唆された。

【結論】 Ly6Hは $\alpha 7$ nAChRの細胞外領域に結合して阻害作用を示すが、その作用発現には、単に $\alpha 7$ nAChRに結合するばかりでなく、GPI配列を介した形質膜への繫留が必要であることが示された。