

Title	肥満細胞からのhistamine遊離機序の解析
Author(s)	見尾, 光庸
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/35692
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【14】

氏名・(本籍)	み 見	お 尾	みつ 光	のぶ 庸
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	8037	号	
学位授与の日付	昭和63年3月17日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	肥満細胞からのhistamine遊離機序の解析			
論文審査委員	(主査)			
	教授	岩田平太郎		
	(副査)			
	教授	近藤 雅臣	教授	三浦 喜温
			教授	佐々木喜男

論文内容の要旨

肥満細胞からのhistamine遊離反応においては、抗原抗体反応やhistamine遊離物質により刺激情報を細胞表面で認識することが、反応開始の第一段階である。これに続いて、細胞膜を介した情報伝達が生じる。細胞内でsecond messengerとして作用するのは、 Ca^{2+} であると考えられており、細胞骨格やcalmodulinなどの Ca^{2+} に依存した細胞機能調節因子を活性化し、最終的にhistamine遊離が惹起されると考えられている。しかし、その詳細な機構や抗アレルギー薬のhistamine遊離抑制機序については、不明な部分が多い。肥満細胞からのhistamine遊離とその抑制機序を解明する事を目的として本研究を開始した。

Histamine遊離の際に生じる肥満細胞の形態変化を電子顕微鏡により検討したところ、多くの顆粒が腫大し顆粒が細胞膜表面へと突出しているのが観察された。細胞膜の膜内粒子は隆起した顆粒を取り囲むように側方移動しており、細胞膜表面の抗原抗体結合物も腫大した顆粒を取り囲むようにその周辺に分布していることが判明した。細胞膜流動性の測定により、このような形態変化と一致して、肥満細胞膜リン脂質二重層の流動性が亢進していることが明かとなった。これらの所見より、肥満細胞からのhistamine遊離には、細胞膜リン脂質二重層の流動性が著しく亢進することが明かになった。

人工的なモデル膜に抗原抗体反応を起こさせたり、histamine遊離物質であるcompound 48/80 (48/80)を作用させると、black lipid membrane (BLM)の電気抵抗が減少することを認めた。また、histamine含有liposomeに抗原抗体反応を惹起させたり、48/80を作用させると、速やかにhistamineが遊離された。更に、抗原抗体反応あるいは48/80により、モデル膜リン脂質二重層の流動性が亢進することも判明した。これらの知見より、肥満細胞にhistamine遊離物質を作用させた際には、細胞膜リン

脂質二重層の流動性及び膜透過性が亢進することが明かとなった。

Histamine遊離の際に観察される肥満細胞の流動性上昇が、細胞膜における phosphatidylethanolamine (PE) のメチル化反応により誘発されるという仮説の当否を検討するため、phosphatidylcholine (PC) 及び PE liposome の膜流動性と相転移に及ぼす N-methyl PE (MPE) 添加の影響を調べた。MPE の混在は、dipalmitoyl PC (DPPC) liposome の膜流動性を低下させた。dipalmitoyl PE liposome の膜流動性は、MPE を混在させても殆ど影響されなかった。DPPC に MPE を添加した liposome の相図より、両者が均一な固溶体を形成している事が判明した。これらの所見は、PE の N-methyl 化が細胞膜リン脂質二重層の膜流動性を、むしろ低下させている事を示唆している。

ラット腹腔肥満細胞に対する lysophosphatidylcholine (lyso-PC) の影響を、histamine 遊離及び ^{45}Ca uptake について検討したところ、 $4\ \mu\text{M}$ 以下の lyso-PC は、48/80 によって惹起される肥満細胞からの histamine 遊離及び ^{45}Ca uptake を濃度依存的に抑制した。同じ濃度範囲で、lyso-PC は carboxyfluorescein (CF) 含有 liposome からの 48/80 による CF 遊離を抑制し、DPPC liposome の液晶状態の膜流動性を低下させた。この結果、lyso-PC は $4\ \mu\text{M}$ 以下の濃度においては、リン脂質二重層に対して膜安定化効果を発揮し、肥満細胞の Ca^{2+} uptake 及び histamine 遊離を抑制することが明らかになった。 $8\ \mu\text{M}$ 以上の濃度では、lyso-PC は細胞膜を障害し、肥満細胞から histamine や lactate dehydrogenase を遊離させた。これらの知見は、lyso-PC が生理的な濃度範囲では、むしろ内存在の細胞膜安定化物質である可能性を示している。

肥満細胞からの histamine 遊離を抑制する抗アレルギー薬の DPPC liposome に対する作用を、差走査熱量分析法と、膜流動性の測定により検討した。抗アレルギー薬の多くは、DPPC の相転移度を低下させ、相転移幅を拡大した。この知見は、これら抗アレルギー薬の細胞膜リン脂質二重層に対する分配の高さを反映しており、肥満細胞膜の情報伝達に關与する協同性の高い cluster の大きさが、抗アレルギー薬の存在下に減少し、リン脂質二重層における情報伝達が抑制される事を示唆している。また、抗アレルギー薬の多くは、DPPC liposome の液晶相における流動性を低下させ、細胞膜リン脂質二重層を安定化する効果を持つことが明らかとなった。

肥満細胞内 Ca^{2+} の分布とその変化を microfluorometry と画像処理によって解析した。 Ca^{2+} 感受性蛍光色素がある quin 2 を取り込ませたラット腹腔肥満細胞に Ca-free の媒液中で 48/80 あるいは substance P を作用させたところ、肥満細胞内 quin 2 の蛍光は著しく増大し、細胞内 Ca store から Ca^{2+} が遊離していることが示された。対照細胞内の Ca^{2+} 濃度は、核及び顆粒で低く、顆粒間隙の細胞質に分布していたが、histamine 遊離条件下に細胞全体の Ca^{2+} level が上昇した。theophylline, dibutyryl cAMP, terfenadine, oxatomide, disodium cromoglycate といった抗アレルギー薬の作用下に、細胞内 Ca store からの Ca^{2+} 遊離は抑制された。同様の効果は Ca antagonist を作用させた際にも観察されたが、遙かに高い濃度を必要とした。

本研究における肥満細胞の刺激応答機構の解析から、肥満細胞からの histamine 遊離反応においては、細胞膜リン脂質二重層の perturbation が生じて細胞膜の流動性及び膜透過性が亢進する事、これに続いて細胞内 Ca store からの Ca^{2+} の遊離や細胞外 Ca の流入を生じ、histamine 遊離反応を抑制することが

明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

本論文は肥満細胞からの histamine 遊離反応における細胞膜リン脂質二重層, 細胞内カルシウムイオンの動態を解析し, 遊離反応にたいする抗 histamine 等の作用機序についても検討を加えたもので, 薬学博士の学位を授与するに値するものである。