



Title	Zinc is required for FcεRI-mediated mast cell activation
Author(s)	加峰, 弘毅
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47506
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 加 ぶ 峰 こう き 毅

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 0 6 2 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 7 月 20 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当
医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Zinc is required for $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -mediated mast cell activation
(亜鉛は $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を介する肥満細胞の活性化に必須である)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 平野 俊夫

(副査)
教 授 祖父江憲治 教 授 高井 義美

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

亜鉛は生体にとって必須の金属であり、その欠乏は成長遅延や免疫力の低下を招くことが知られている。しかしながら個々の免疫反応に対する亜鉛の役割は明らかにされていない。肥満細胞は顆粒を密に含んだ細胞で、炎症反応や 1 型過敏症などに重要な役割を果たしている。以前我々は抗原刺激による肥満細胞中の顆粒が Ca^{2+} 非依存的に微小管再構成を介して細胞膜まで移行することを報告した。肥満細胞の顆粒中には亜鉛が多く含まれていることが 1960 年代に報告されたが、それ以降肥満細胞の生理的機能に及ぼす亜鉛の役割は報告されていない。そこで本研究では抗原刺激に対する肥満細胞活性化の主たる現象である、脱顆粒とサイトカイン産生に対する亜鉛の必要性を検討した。

【方法ならびに成績】

- ① *In vivo* アレルギー反応に及ぼす Zn^{2+} の影響を検討するため、マウスの 1 型過敏症モデルを用い TPEN 投与に対する影響を検討した。マウスの耳皮内に IgE を投与し、後日抗原ならびに Evans blue を静脈投与した。その結果、TPEN 処理によりマウス耳毛細血管より漏出する Evans blue の量が減少しアレルギー反応が有意に抑えられた。耳の組織染色により抗原刺激によって起こる脱顆粒形態を示す肥満細胞の割合も有意に減少した。
- ② 次に骨髓より IL-3 存在下で肥満細胞誘導し *in vitro* の脱顆粒試験を行った。脱顆粒試験は β -hexosaminidase を生化学的に、 $\text{TNF}\alpha$ 、 LTC_4 、ヒスタミンを ELISA 法で測定した。その結果 TPEN 処理で β -hexosaminidase および $\text{TNF}\alpha$ 、 LTC_4 、ヒスタミンの遊離が抑制された。他の金属 (Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+}) が関与しているか検討するためそれぞれの金属に親和性の高いキレート剤を用いて β -hexosaminidase と $\text{TNF}\alpha$ の遊離試験をおこなった。しかしながらこれら 4 種類に対するキレート剤ではこれらの遊離に影響はなかった。また TPEN による β -hexosaminidase 遊離抑制は、外部より Zn^{2+} およびピリチオンを添加することにより回復した。
- ③ 次に抗原刺激による顆粒の移動に及ぼす TPEN の影響を調べるために共焦点レーザー顕微鏡を用い解析を行った。細胞内の顆粒は可視化するために顆粒膜表面に存在する CD63 抗原に GFP を融合させ肥満細胞に発現させた。その結果抗原刺激による肥満細胞の顆粒の細胞膜への移動は TPEN 処理により抑制された。
- ④ 次に TPEN が及ぼす $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 下流のシグナル伝達への影響をウェスタンブロットおよび免疫沈降法により解析した。

その結果抗原刺激によりおこる総チロシンリン酸化や Fyn、Gab2 の活性化に変化はなかった。また細胞内へのカルシウム流入量にも影響はなかった。

⑤抗原刺激による TNF α と IL-6 の遺伝子発現に及ぼす各種キレーターの影響を検討した。遺伝子発現は RT-PCR 法および定量的 Real time-PCR 法を用いた。その結果 TPEN 処理により TNF α と IL-6 の遺伝子発現が有意に抑制された。しかしながらその他の金属に対するキレーターの処理によっても抗原刺激による TNF α および IL-6 の遺伝子発現に影響はなかった。また TPEN 処理により抑制された TNF α および IL-6 の遺伝子発現は Zn²⁺ とピリチオン処理により回復した。

⑥抗原刺激による転写因子 NF- κ B の活性化におよぼす TPEN の影響を検討した。その結果 TPEN 処理により NF- κ B の核移行および I κ B α の分解が抑制された。次に PKC β I ファミリー阻害剤 (Ro31-8220) の TNF α と IL-6 の遺伝子発現および NF- κ B 活性化におよぼす影響を検討した。その結果、Ro31-8220 処理により NF- κ B の核移行および I κ B α の分解はわずかに抑制された。また抗原刺激による PKC β I 細胞膜移行は TPEN 処理により抑制された。

【総括】

Zn²⁺ はマウスの 1 型アレルギー反応に必要であり、肥満細胞の脱顆粒を制御していることが示された。また、in vitro の検討より Zn²⁺ は抗原刺激による顆粒の細胞膜移動に伴う脱顆粒を制御していることが示唆された。さらに Zn²⁺ は NF- κ B や PKC β I の活性化を制御することにより、抗原刺激依存的な TNF α と IL-6 の遺伝子発現を制御していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

肥満細胞は 1 型過敏症と呼ばれる病態に深く関与している。その原因は抗原となる異物が肥満細胞表面へ結合し、細胞内顆粒に蓄えられているケミカルメディエーターを放出させることによるものと考えられている。本研究は、肥満細胞に多量に存在する重金属である亜鉛とアレルギーとの関係を検討した。その結果、亜鉛のキレート剤である TPEN を処理することでマウスの皮内アレルギーを抑制することを明らかにした。また、in vitro による試験で TPEN の処理により肥満細胞からケミカルメディエーターの放出を抑制した。このメカニズムとして、カルシウム非依存的な顆粒の移動が抑制されていることが明らかとなった。さらに TPEN は抗原刺激による炎症性サイトカインである TNF α 、IL-6 の発現を転写レベルで抑制することを明らかにした。このメカニズムは TPEN 処理により、抗原刺激依存的な PKC β I の細胞膜への移行を抑制した結果、NF- κ B の活性化が抑制されることが原因であることを明らかにした。今回得られた知見は、細胞内の亜鉛濃度を制御することでアレルギーを制御することができる可能性を示した。またこの研究は肥満細胞依存性アレルギーを標的とした創薬に非常に有用な情報となり得ることから学位を授与するに値すると考えられる。