

氏名	千原敏裕
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博乙第 3330号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	cAMPによる好中球走化能抑制機序に関する研究
論文審査委員	教授 滝川正春 教授 村山洋二 教授 福井一博

学位論文内容の要旨

【緒言】

好中球の走化は次のステップで起こると考えられる。まず、*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) などの走化性因子が好中球細胞膜上のレセプターに結合することによって、細胞内カルシウムイオン濃度が一過性に上昇する。カルシウムイオンはカルモジュリンと結合してカルシウム-カルモジュリン複合体となり、この複合体がミオシン軽鎖キナーゼに結合してこれを活性化させ、ミオシン軽鎖のリン酸化を引き起こす。ミオシン軽鎖のリン酸化を契機にアクチンとミオシンが互いに反対方向に滑るようになり、アクチンフィラメント上に収縮力が生じ、走化性因子に向かう運動が起こる。

この走化の運動は、細胞内刺激伝達物質の一つである adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) によって抑制される。しかし、その作用機序は不明のままである。

本研究では、cAMP による好中球走化能の抑制の機序に関連して、細胞内 cAMP が細胞内カルシウムイオン濃度変化および調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化にどのような影響を及ぼすかを調べた。

【材料および方法】

1. 好中球

健常者のヘパリン加末梢血から mono-poly resolving medium (ICN Biomedicals) および Histopaque[®]-1077 (Sigma) の不連続密度勾配遠心法を用いて好中球を分離した。

2. 試薬

細胞内 cAMP 濃度を上昇させるものとして 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX: cAMP 分解酵素阻害剤), forskolin (cAMP 合成酵素促進剤), dibutyryl cAMP (cAMP 誘導体) を、そして走化性因子として fMLP を用いた。

3. 細胞内刺激伝達関連項目の測定系

好中球の細胞内 cAMP 濃度の上昇系および非上昇系を設けた。それらの系で各種試薬を作用させ、好中球の走化能・ランダムマイグレーション能、細胞内カルシウムイオン濃度および調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化を調べた。

4. 細胞内 cAMP 濃度

サイクリック AMP キット「ヤマサ」(ヤマサ醤油)を用いてラジオイムノアッセイにて測定した。

5. 細胞内カルシウムイオン濃度

細胞内カルシウムイオン濃度測定装置 FES-300 (スカラテック)を用いて測定した。すなわち、好中球に fura 2 を導入し、2 波長高速励起切替えによる 340 nm および 380 nm の励起光に対する 510 nm の蛍光強度の比で表した。

6. 走化能およびランダムマイグレーション能

Synderman らの変法ポイデンチャンバー法を改良して測定した。

7. 調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化

好中球を細胞溶解液 (9 M urea, 10% Triton[®]X-100, 1% dithiothreitol) で可溶化し、15% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。そして、モノクローナル抗ホスホセリン抗体 (Sigma) を作用させ、ECL[™] ウェスタンブロッティング検出システム (Amersham) を用いて調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化の程度を評価した。

【結果および考察】

1. 好中球の細胞内 cAMP 濃度を上昇させても、細胞内カルシウムイオン濃度および fMLP による細胞内カルシウムイオン濃度変化に影響を与えなかった。よって、cAMP による好中球走化能の抑制作用は、細胞内カルシウムイオン濃度変化に依拠するものではないと考えられる。また、cAMP は細胞内カルシウムイオン濃度上昇以降の刺激伝達系に作用すると考えられる。
2. 好中球の細胞内 cAMP 濃度を上昇させると、走化能が低下すると同時にランダムマイグレーション能も低下した。したがって、cAMP によって細胞の運動性そのものが抑制されている可能性がある。
3. 好中球の細胞内 cAMP 濃度を上昇させると、fMLP 刺激の有無に関わりなく調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化の程度は低下した。この結果は、cAMP によって細胞運動そのものが抑えられるという上述の考察を間接的にはあるが支持するものである。すなわち、細胞内 cAMP 濃度の上昇によって調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化が抑制された状態では、走化性因子 fMLP で刺激しても、細胞内 cAMP 濃度の上昇によって調節性ミオシン軽鎖のセリン残基はリン酸化されないため走化能は機能しないと考えられる。

【結 論】

cAMP による好中球の走化能抑制は、細胞内カルシウムイオン濃度への作用を介さず、調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化を阻害することによって、細胞の収縮運動自体を抑えることによって起こると考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究は、細胞内 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) による好中球走化能の低下の機序を知ることがを目的とし、細胞内 cAMP 濃度の上昇が細胞内カルシウムイオン濃度および調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化に及ぼす影響について調べたものである。

論文には次の知見が記されている。

1. 好中球の細胞内 cAMP 濃度の上昇は、細胞内カルシウムイオン濃度および fMLP による細胞内カルシウムイオン濃度の変化に影響を与えない。
2. 好中球の細胞内 cAMP 濃度の上昇は、走化能を低下させると同時にランダムマイグレーション能も低下させる。
3. 好中球の細胞内 cAMP 濃度を上昇させると、fMLP 刺激の有無に関わりなく調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化の程度は抑制される。

これらの知見は、cAMP による好中球走化能の抑制は、細胞内カルシウムイオン濃度への影響を介さず、調節性ミオシン軽鎖のセリン残基リン酸化の程度を直接抑制することによって細胞の収縮運動それ自体を制限するために起こることを示すものである。このことは、好中球の細胞運動の機序の一端を明らかにしたことになる。

よって、本申請論文は博士の学位を受けるに足るものと認める。