

氏名	竹内 智也
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬科学
学位記授与番号	博甲 第 5515 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 薬科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	マスト細胞における小胞型ポリアミントランスポーターの発現と機能
論文審査委員	教授 須藤 雄気 (主査) 教授 山下 敦子 教授 上原 孝

学位論文内容の要旨

マスト細胞は即時型アレルギーに関与する免疫細胞の一種であり、多数の分泌顆粒を持つのが特徴である。分泌顆粒内には、ヒスタミンやポリアミン (スペルミジン, スペルミン), サイトカインなどの多様な生理活性物質が蓄積されており、抗原刺激により開口放出される。マスト細胞は、スペルミンを単独で過剰に添加した場合にも炎症性メディエーターであるヒスタミンを開口放出することが報告されている。また、スペルミン及びその前駆体であるスペルミジンは、分泌顆粒内に蓄積され、そのうちスペルミジンは抗原刺激によって放出されることも明らかにされていた。しかし、これらポリアミンの分泌顆粒内への濃縮機構は明らかになっていない。また、マスト細胞から放出されたポリアミンの生理的機能も不明である。当研究室では、SLC18 ファミリーに属し、分泌小胞内へのポリアミン濃縮を担う小胞型ポリアミントランスポーター (VPAT) を同定した。そこで本研究では、VPAT に着目することでマスト細胞における分泌顆粒内へのポリアミン濃縮機構の解明及びポリアミン放出機構の解明を試みた。さらに、VPAT をターゲットにすることで、マスト細胞から放出されたポリアミンの生理的機能の解明を試みた。

本研究では、マウス骨髄誘導マスト細胞 (BMMC) あるいはラット腹腔マスト細胞 (RPMC) を用いた。RT-PCR 法による解析の結果、BMMC と RPMC で VPAT 遺伝子が発現していた。また、ウエスタンブロット法によりマスト細胞分泌顆粒画分において VPAT タンパク質のシグナルを検出した。免疫組織化学法でも細胞内に顆粒状の VPAT

由来シグナルを検出した。VPAT と主要な顆粒マーカーを二重染色した結果、VPAT は VAMP3 と共局在し、VAMP2, VAMP7, VAMP8 とほとんど共局在しなかった。また、ヒスタミン、セロトニン、カテプシン D とほとんど共局在しなかった。

VPAT の機能解析では、BMBCs の膜画分に ATP 依存性のスペルミジン輸送活性がみられた。この輸送活性は、SLC18 ファミリーの阻害剤あるいは V-ATPase の阻害剤により阻害された。また、スペルミン、スペルミジン、ヒスタミン、セロトニンでも競合阻害された。

抗原刺激による BMBCs からのスペルミンとスペルミジンの放出は、抗原濃度依存的かつ時間依存的に増加した。また、カルシウム依存性、温度依存性を示す他、V-ATPase の阻害剤あるいはテタヌス毒素に感受性を示した。RNAi 法を用いて VPAT の発現を抑制すると、スペルミンとスペルミジンの放出量が減少した。さらにこの時、ヒスタミン放出量も減少しており、この減少はスペルミンの添加により回復した。

本研究より、マスト細胞において VPAT は VAMP3 陽性の分泌顆粒に局在し、ポリアミンの分泌顆粒内輸送及び開口放出に関与することが明らかになった。また、VPAT を介して開口放出されたスペルミンは、ヒスタミンの開口放出を正に制御する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

平成29年1月11日に申請者より提出された博士論文を主査および副査が別々に読み、特に予備審査で改善が必要と考えられた内容『VPAT の生理的意義（基質となり得るヒスタミン、セロトニンとの関係など）や分子メカニズム（抗体の取得、コントロールの置き方、定量的な解析）に関する結果の提示、考察、まとめ方』について審査委員会の意見をまとめ、同1月20日に主査及び副査2名が対面にて本人に伝えた。また、それらに対する返答から、申請者自身の発想および結果に基づくものであるかを口頭試問形式で確認した。これらをもとに、申請者から、同1月30日に修正稿が提出された。修正稿では、本研究の目的や結果が明確となり、加えて本論文の主旨（VPAT のマスト細胞における発現と機能）や考察が明確になった。同2月8日に再度軽微な修正点を対面にて本人に伝え、それを踏まえた再修正稿が提出された。原著論文が平成29年1月12日に科学誌に受理されたことをメール及びweb siteにて確認した上で、本論文で得られた結果は、学術上の高い新規性・進歩性を有すると本審査委員会は判断し、博士の授与に値すると判断した。