

論文の内容の要旨

論文題目 アレルギー病態における血小板活性化因子局所的産生機序の解析

氏名 鈴木 知之

血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) は、IgE 感作ウサギ好塩基球から放出される血小板凝集因子として最初にその存在が発見されたが、後にアレルギーや炎症に関わる脂質メディエーターであることがわかった。これまで PAF の機能に関して国内外で精力的に研究が進められ、喘息やアナフィラキシーを含むアレルギー性疾患、敗血症、急性呼吸切迫症候群、気道過敏、虚血再還流障害、疼痛、自己免疫疾患など様々な疾患の病態生理に関与することが疫学研究や動物モデル実験により示されてきた。特に致死性の高いアナフィラキシーにおける PAF の機能についてこれまで精力的に研究が進められてきた。重篤な食物アナフィラキシーを起こした患者の血清 PAF 量は健常人の血清と比較して高値であり、その血清 PAF 量と重症度が正の相関を示すことが報告されている。また、アナフィラキシー患者において、ヒスタミンやマスト細胞の活性化の指標として一般的に使われるトリプターゼと比較して、PAF はアナフィラキシーの重症度とより高い相関を示している。全身性アナフィラキシーの動物モデル実験においても PAF を投与するモデルが用いられている。

このように疫学研究や動物実験から、アレルギー病態において PAF の地位は確立している。一方で各種アレルギー病態において、いつどこでどの細胞が PAF を合成するのか、その PAF がどのような細胞に作用して病態に寄与するのか、コンセンサスが得られていない。PAF の生合成酵素としてリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素

(lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT) 1 と LPCAT2 が知られているが、どちらがアレルギー病態における PAF 産生酵素であるのか調べられていない。また、特に PAF 合成の責任細胞とその固有の機能について *in vivo* レベルで証明されたものはない。PAF は短時間で分解され組織レベルでは測定困難な脂質であるため、病態が進行する過程でその時空間的な挙動を捉えることが局所においてもこれまで困難であった。今回、皮膚における I 型アレルギーという局所病態に着目し、PAF 生合成酵素である LPCAT1 や LPCAT2 欠損マウス及び PAF 受容体 (PAF receptor, PAFR) 欠損マウスを用いて解析した。

I 型アレルギーの即時相における PAF の動態を明らかにするために、受動皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) マウスモデルでの皮膚中 PAF の定量を試みた。PCA は、IgE を皮内注射することでマスト細胞を感作させ、その翌日に IgE 特異的な抗原を全身投与し I 型アレルギー反応を皮膚で誘発するモデルである。PAF

を測定するにあたり、所属研究室で確立済みの液体クロマトグラフィータンデム型質量分析を用いた脂質メディエーター一斉定量系を使用した。従来法では皮膚組織中の PAF は検出限界近傍であったため、測定系の改良を行い、PAF 検出感度を約 10 倍上げることに成功した。この改良法により、IgE 刺激後 30 分における耳組織中の PAF 量の推移を検証したところ、10 分でピークとなることが明らかとなった。

次に、LPCAT1 と LPCAT2 が I 型アレルギー反応即時相の局所 PAF 産生に果たす寄与について検証を行った。それぞれの酵素の欠損マウスおよびその対照マウスで PCA を行い、IgE 刺激 10 分後の耳組織中 PAF 量を上記の新規 PAF 測定法により測定した。LPCAT1 欠損マウスにおいては野生型マウスと同程度の耳組織中の PAF 産生が認められた。一方、LPCAT2 欠損マウスにおいては耳組織中の PAF 産生量は野生型マウスの 1/40 未満に留まった。以上より、2 つの PAF 生合成酵素（リゾ PAF アセチル転移酵素）のうち LPCAT2 が I 型アレルギー反応即時相における PAF 産生責任酵素であることが明らかになった。

続いて LPCAT1 および LPCAT2 の I 型アレルギー病態における関与を検証するため、本病態の主要な表現型である血管透過性の亢進について評価を行った。PCA において抗原と同時にエバンスブルーを静脈より全身投与し、その耳組織における漏出量を定量することで血管透過性を評価した。また、血管透過性亢進に伴う浮腫を抗原刺激前後の耳介厚差をもって評価することで血管透過性のもう一つの指標とした。LPCAT1 欠損マウスは野生型マウスと同程度の色素漏出量が認められた。一方、LPCAT2 欠損マウスにおいては野生型マウスに比べて色素漏出量は約 4 割、耳介厚差は約 6 割程度減弱することが認められた。以上により、IgE 依存的な即時反応において LPCAT2 が血管透過性の増悪に寄与することが示された。

IgE 刺激により皮膚組織中で速やかに PAF を産生する責任細胞を同定するため、マウス耳組織における LPCAT2 の発現分布をホールマウント蛍光免疫染色によって評価した。その結果、野生型マウスの耳組織において、主に列状に連なる様に分布する LPCAT2 陽性細胞が数多く認められ、マスト細胞との共局在を認め、マスト細胞が LPCAT2 を発現することが明らかとなった。

アレルギー反応時の局所 PAF 産生責任細胞がマスト細胞であることをさらに証明するため、マスト細胞欠損自然変異マウスである $\text{Kit}^{\text{W}^{\text{sh}}/\text{W}^{\text{sh}}}$ (W^{sh}) マウスにマスト細胞の初代培養であるマウス骨髄由来肥満細胞 (bone marrow derived mast cells, BMMC)s を移入、定着させるマスト細胞再構成モデルを用いることとした。LPCAT2 欠損型マウス由来の BMMCs (LPCAT2 欠損 BMMCs) を移入することで、局所的にマスト細胞のみが

LPCAT2 を欠損する環境を作出できる。野生型および LPCAT2 欠損 BMMCs を W^{sh} マウスの耳に皮内注射し、約 6 週間の組織への定着期間を空けた上で PCA を行なった。その結果、LPCAT2 欠損 BMMCs を移入した耳組織中の PAF 量は野生型 BMMCs を移入した耳組織中と比較して約 1/15 であることが確認された。従って、局所 IgE 依存的 I 型アレルギーの即時相において、マスト細胞の LPCAT2 が PAF を産生することが明らかとなった。さらに当該マウスにおける PCA による血管透過性亢進の程度についてエバンスブルーの漏出量および耳介厚差により評価を行った。その結果、LPCAT2 欠損 BMMCs を移入した W^{sh} マウスの耳組織において、対照となる野生型 BMMCs を移入した耳組織に比べて色素漏出量は約 3 割、耳介厚差は約 6 割程度減弱していることが確認された。以上の結果から、局所 IgE 依存的 I 型アレルギーの即時相において、マスト細胞の LPCAT2 依存的に PAF が産生され、その PAF が局所での血管透過性増悪に寄与することが示唆された。

以上のように、局所 I 型アレルギー反応即時相においてマスト細胞の LPCAT2 が局所 PAF 産生及び血管透過性増悪に寄与することが明らかとなった。PAF は主に細胞膜上の PAFR を介して働くと考えられているが、PAFR 非依存的な PAF の機能についても近年注目されている。従って、産生された PAF が PAFR 依存的に血管透過性に作用するか検証すべく PAFR 欠損マウスを用いて PCA を行なった。野生型および PAFR 欠損マウスの背部の皮膚において PCA を行い、エバンスブルーの色素漏出量により血管透過性の評価を行った。その結果、PAFR 欠損マウスの皮膚における色素漏出量は野生型マウスと比較して 5 割程度減弱した。さらに、PAFR 拮抗薬である ABT-491 を用いて本病態における PAFR の寄与を薬理的に検証した。その結果、ABT-491 投与群において皮膚の色素漏出量は vehicle 投与群と比較して約 5 割減弱しており、PAFR 欠損マウスを用いた上記の結果と矛盾しない結果が得られた。従って、PAFR が局所 I 型アレルギー反応の即時相における血管透過性増悪に寄与することが遺伝学および薬理的に示され、本病態で LPCAT2 依存的に急速に局所産生される PAF が PAFR を介して血管透過性増悪を惹起する可能性が示唆された。

PAF は組織中で速やかに代謝されるため、PAF の標的細胞としてマスト細胞自身である可能性が考えられた。そこで、PAFR 欠損マウス由来の BMMCs (PAFR 欠損 BMMCs) を調整し、 W^{sh} マウスにてマスト細胞再構成を行うことで、マスト細胞特異的な PAFR の役割について検証を行った。当該モデルマウスを用いて IgE 刺激の PCA を行い、血管透過性をエバンスブルーの漏出量および耳介厚差により評価を行った。その結果、PAFR 欠損 BMMCs を移入した W^{sh} マウスの耳組織においては、対照となる野生型 BMMCs を移入した耳組織と比較して、色素漏出量も耳介厚差も同程度であることが確認された。従って、局所 IgE 依存的 I 型アレルギーの即時相において、マスト細胞の PAFR は血管透過性増悪に寄与しないことが示唆された。これまでの結果と併せて、マスト細胞

で LPCAT2 により局所合成された PAF がマスト細胞以外に発現する PAFR を介して血管透過性の亢進をもたらすというモデルが考えられた。

本病態における PAFR 依存的な PAF の生理機能を考えるにあたり、その標的となる細胞の同定は重要課題である。マスト細胞が主要 PAF 産生細胞であること、また PAF が組織中で速やかに合成・分解されることとから、マスト細胞自身の PAFR を介したオートクリン・パラクリンによる制御がその可能性として考えられる。実際、虚血再灌流モデルや接触性皮膚炎モデルにおいてマスト細胞の PAFR 依存的な生理的作用が示されている。また、ミクログリアにおいて PAF のオートクリン的な PAF の作用も、神経障害性疼痛モデルにおいて提唱されている。しかしながら PAFR 欠損 BMMCs 再構成モデルの実験結果により、即時型アレルギーにおいては、マスト細胞以外の皮膚構成細胞の PAFR を介する可能性が高いと考えられた。従って、本病態におけるマスト細胞由来の PAF の標的となる細胞を同定すべく、新規に PAFR flox マウスを作製した。今後、血管内皮細胞やマクロファージなどの特異的な PAFR 欠損マウスを樹立し、検証していく予定である。

以上のように、本研究は I 型アレルギー即時相における PAF の局所挙動に迫り、マスト細胞の LPCAT2 によって産生される PAF が、PAFR 依存的に病態に関わることを明らかにした。この研究成果はこれまで類推に過ぎなかった PAF の動態やその整理機能発揮の実態に迫るものである。今後、PAF の標的細胞の同定をはじめとして、細胞特異的欠損マウスを用いた解析などにより、さらにその詳細が明らかになると考えられる。このようなアレルギー反応時の PAF の産生及び機能発揮の全貌の解明は、複雑なアレルギー反応のメカニズムのみならず、新たな治療・予防戦略の開発・発展につながると期待される。