


医研191

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論文題目 : Mast cell-derived VEGF enhances the passage of IgE FE-3 through rat aortic endothelial cell monolayer

(肥満細胞由来VEGFは、単層培養血管内皮細胞のIgE FE-3透過性を促進する)

氏名 仲宗根 敏幸 

論文要旨

(/)

「目的」血管外組織にみられるIgEを介するアレルギー反応は、IgE、標的細胞（例えば肥満細胞）及び抗原の免疫相互作用により惹起されることが知られている。しかしながら循環血中のIgEが血管外組織へ移行する詳細な機序は未だ不明である。我々は、これまでに培養ラット胸部大動脈血管内皮細胞のIgE透過性がヒスタミン添加により亢進するのを報告している。本研究では、アレルギー病態形成の主要である肥満細胞の、血管内皮細胞のIgE透過性への関与を検討した。また、肥満細胞由来の透過性亢進惹起因子の同定を試みた。

「方法」移植片培養法にて確立したラット胸部大動脈由来の血管内皮細胞を、コラーゲン処理したdual chamber上槽の膜上で培養した。ラット腹腔内から採取し部分精製した肥満細胞をIgE FE-3存在下で刺激培養し、得られた培養上清を、下槽に添加した。IgE透過性は上槽にIgE FE-3 (10 μg/ml)を添加し、

単位時間当たりの下槽への移行量を
 IgE-capture ELISA法にて測定し算定した。ま
 た、ヒスタミンレセプターアンタゴニスト
 (diphenhydramine, cimetidine)、血管内皮細
 胞成長因子(VEGF)(vascular endothelial
 growth factor)レセプターアンタゴニスト
 (suramin)、及びプラスミノーゲンアクチベ
 タ抑制物質(t-AMCHA)を、IgE FE-3刺激肥満
 細胞培養上清に添加し、血管内皮細胞のIgE
 透過性亢進に対する抑制効果を調べた。さら
 に、ヘパリンセファロースを用いたアフィニ
 ティークロマトグラフィーにより肥満細胞
 由来のヘパリン結合因子を部分精製し、その
 血管内皮細胞のIgE透過性に及ぼす影響を調
 べた。ラットVEGFは、ヤギ抗ヒトVEGFポ
 リクローナル抗体を用いて検出した。
 「結果」 IgE FE-3で刺激した肥満細胞培養
 上清添加群では、刺激に用いたIgE FE-3の濃
 度依存性に血管内皮細胞のIgE透過係数が増
 加し、 $10 \mu\text{g/ml}$ で最大の値、 9.86 ± 0.46

論文要旨




(3)

| | | | | |
|--------|-----------------|--------------|----------|-------------|
| × | 10 ⁶ | cm/s、 | を示した。 | この血管内皮細胞 |
| の | IgE | 透過性 | 亢進は、 | VEGF結合阻害剤であ |
| る | suramin | により | ほぼ完全に | 抑制された。さ |
| らに、 | ヘパリン | カラムで | 部分精製した | 肥満細胞 |
| 由来の | VEGF | を含む | フラクションは、 | 濃度 |
| 依存性 | および | 時間依存性 | に血管内皮細胞の | |
| IgE | 透過係数 | を増加させた。 | 「考察」 | 本研究 |
| により | 血管内皮細胞の | IgE | 透過性 | 亢進には、 |
| 肥満細胞 | 由来の | VEGF | が関与する | ことが明ら |
| かとなった。 | 生体内 | においては、 | 血管内皮細 | |
| 胞を | 透過した | IgE | が肥満細胞の | 高親和性 |
| レセプター | (FcεRI) | に結合し、 | その結果 | Fcε |
| RI | の発現 | が upregulate | するとともに、 | 増加 |
| した | FcεRI | にさらに | IgE | が作用し、 |
| の | VEGF | 産生 | 及び放出 | を亢進すると |
| る。 | そして | 反応局所 | において | 産生された |
| VEGF | が血管内皮細胞 | に作用し、 | IgE | 透過性を |
| さらに | 促進し、 | 組織への | IgE | 移行の増幅が |
| じると | 考えられる。 | この増幅 | 反応が、 | アレルギー |
| 増悪 | の一つの | メカニズム | と考えられる。 | |

*論文要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

論文審査結果の要旨

(1)

| | | | | |
|---|-----------------|---------|---|---|
| 報告番号 | 課程博 * 論文博 | 第 号 | 氏 名 | 仲宗根 敏幸 |
| 論文審査委員 | 平成 14 年 4 月 8 日 | | | |
| | 主査教授 | 田 中 勇 悦 | |  |
| | 副査教授 | 吉 見 直 己 | |  |
| 副査教授 | 野 田 寛 | |  | |
| (論 文 題 目) | | | | |
| Mast cell-derived VEGF enhances the passage of IgE FE-3 through rat aortic endothelial cell monolayer | | | | |
| (肥満細胞由来 VEGF は、単層培養血管内皮細胞の IgE FE-3 透過性を促進する) | | | | |
| (論文審査結果の要旨) | | | | |
| 上記論文に対して、研究に至る背景と目的、論文の内容、特に、実験方法、手技と学術的水準、研究の成果とその意義について慎重に審査し、以下の審査結果を得た。 | | | | |
| 1. 研究の背景と目的 | | | | |
| アレルギー病態増悪のメカニズムの一つとして、循環血中 IgE の血管外組織への IgE の透過性亢進が重要であると予想されている。本研究では、アレルギー病態形成の主役である肥満細胞に着目し、血管内皮細胞の IgE 透過性への関与を検討し、肥満細胞由来の透過性亢進惹起物質を同定することを目的としている。 | | | | |
| 2. 論文の内容と水準 | | | | |
| 1) ラット胸部大動脈由来の血管内皮細胞の培養及びラット腹腔内由来細胞より肥満細胞を分離し、培養を行っている。 | | | | |

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
- 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
- 3 *印は記入しないこと。

- 2) DNP 特異的ラットモノクローナル IgE 産生ハイブリドーマ細胞 (FE-3) の培養上清より精製した IgE を用いて、血管内皮細胞の IgE 透過性を測定している。すなわち、デュアルチャンバー上槽に IgE を添加し、下槽への移行量を IgE-capture ELISA を用いて測定し、透過係数を算出している。血管内皮細胞の集密性を一定条件下で行うために、上下槽間の電気抵抗を測定している点が評価される。
- 3) 下槽に mastocytoma(P815), RBL-1 細胞株及び primary 肥満細胞を静置すると、高親和性 IgE レセプター (FcεRI) を有する RBL-1 と肥満細胞においてのみ、IgE の透過性が亢進した。また、IgE 刺激後の肥満細胞培養上清は、同様な IgE の透過性亢進性を示した。この結果より、IgE が肥満細胞の FcεRI を介して IgE 透過性亢進物質の分泌を促進することが示唆された。
- 4) 線溶系酵素阻害剤、ヒスタミン受容体拮抗薬、VEGF 受容体拮抗薬を用いた抑制実験より、IgE による肥満細胞刺激後の培養上清中には血管内皮細胞成長因子 (VEGF) の増加が示唆され、ウエスタンブロット法を用いて VEGF の存在を証明した。そして、IgE 刺激後の肥満細胞上清中の VEGF 量に比例して、IgE の透過性が亢進するのを示している。
- 5) IgE 刺激後の肥満細胞培養上清より VEGF を部分精製し、血管内皮細胞の培地に添加して、血管内皮細胞の IgE 透過性を濃度及び時間依存性に亢進することを示している。

3. 研究成果の意義

肥満細胞から分泌される VEGF が強力な血管内皮細胞の IgE 透過性亢進物質であり、IgE は肥満細胞の VEGF の分泌を亢進することを明らかにしている。これらの結果より、血管内皮細胞を透過した IgE が肥満細胞の FcεRI に作用し、肥満細胞の VEGF の産生・放出を亢進すると予想される。増加した VEGF が血管内皮細胞に作用し、IgE の透過性をさらに促進し、反応の増幅が生じる可能性を示している。この増幅反応が、アレルギー炎症の増悪のメカニズムの一つであると同時に、炎症組織のリモデリングの開始であることを示している点は評価される。さらに、IgE の血管透過性を *in vitro* で評価する実験系を確立したことは、I 型アレルギー反応における循環血中 IgE、内皮細胞、肥満細胞、及び抗原との相互作用により惹起されるアレルギー反応の機序、すなわち、アレルギー炎症の成立に関係する血管内、血管壁、血管外組織に存在する細胞・物質の相互反応の機序の解明を可能にするものと期待される。以上の成果は、今後のアレルギー病態における病態生理学的研究に多大に寄与するものであると判断した。

以上の結果から、本研究は学位授与に充分値する内容であると判断する。