

## 別記様式第 6 号 (第 16 条第 3 項, 第 25 条第 3 項関係)

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	松尾 佳美
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①, 2 項該当		
論文題目			
Neuromedin-U directly induces degranulation of skin mast cells, presumably via MRGPRX2 (ニューロメジン U は MRGPRX2 を介して皮膚マスト細胞の脱顆粒を誘導する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	菅野 雅元	印
審査委員	教授	竹野 幸夫	
審査委員	准教授	鎌田 英明	
<p>[論文審査の結果の要旨]</p> <p>マスト細胞は即時型アレルギーや蕁麻疹、自己免疫性疾患の発症・増悪において中心的な役割を果たすと考えられているが、その生理的機能については不明な点が多く残されている。マスト細胞は、細胞表面の IgE 受容体が、IgE 抗体とそれに対する抗原により架橋されることで活性化されるが、補体、Toll 様受容体リガンドや神経ペプチドに代表される IgE 抗体に依存しないマスト細胞活性化物質も多く報告されている。申請者らが着目したニューロメジン U (NMU) は、食欲低下、血圧上昇等の幅広い生理機能を持つ神経ペプチドの一種であるが、アレルギー疾患への関与はほとんど明らかでない。最近、マウスの消化管や肺において、神経末端から分泌される NMU が 2 型自然リンパ球 (ILC-2) を活性化し炎症の誘発に密接に関与することが報じられた。また、NMU は、<i>in vivo</i> でマウス皮膚マスト細胞を活性化することが報告されているものの、NMU 反応性のマスト細胞の実験系が確立されておらず、<i>in vitro</i> での研究は進んでいない。NMU の受容体は、末梢組織に発現している NMUR1 と中枢神経で発現している NMUR2 が存在する。しかし、皮膚マスト細胞に NMUR1 が発現しているという報告はなく、またマウスにおいては NMUR1 と NMUR2 をノックダウンしても NMU による炎症は消失しないという報告があり、皮膚マスト細胞には別の NMU の受容体が存在すると考えられる。</p> <p>本研究では、NMU 反応性のマウス骨髄由来皮膚型マスト細胞 (CTMCs) 及びヒト皮膚由来マスト細胞 (hsMCs) を作成し、NMU によるマスト細胞の活性化機序と、皮膚組織における NMU の局在と発現について検討した。その結果、NMU は <i>in vitro</i> で CTMCs と hsMCs を直接活性化して脱顆粒を誘導することが示された。また、これらの反応は百日咳毒素処理によって抑制されることから、G<math>\alpha</math>i を介している可能性が示された。マスト細胞における NMU の受容体については、CTMCs と hsMCs には NMU の受容体として知られている NMUR1、NMUR2 はほとんど発現がなく、サブスタンス P 等の神経ペプチドの新</p>			

規受容体として最近同定された Mas-related G-protein coupled receptor X2 (MRGPRX2) (マウスの場合 *Mrgprb2*) が発現していた。そこで、NMU が MRGPRX2 を介してマスト細胞を活性化することを検証するため、リガンドの種類を問わず G タンパク共役型受容体 (GPCR) の活性化を評価できる TGF- $\alpha$  shedding assay を行った。この測定系では、Gaq、Ga<sub>11</sub>、Ga<sub>12</sub>、Ga<sub>13</sub> を欠損させた HEK293 細胞に、GPCR として MRGPRX2 を、G タンパク質として Gaq/i<sub>1</sub> (Gaq と Gai<sub>1</sub> とのキメラ蛋白) を導入し、NMU 刺激を行った際の TGF- $\alpha$  遊離量を比色法により確認した。その結果、NMU は直接 MRGPRX2 に結合し、Gai を経由して細胞内に活性化シグナルを伝達することが明らかとなった。次に、皮膚組織で NMU 濃度の上昇が起こり得ることを確認するため、皮膚における NMU の局在と発現量を免疫染色法、および ELISA 法により検討した。その結果、NMU はヒト皮膚において角化細胞に選択的、かつ大量に発現していることが示された (2.32±0.4 fg/cell)。さらに、Toll like receptor (TLR)1 と TLR2 のアゴニストである Pam3CSK4 と角化細胞に発現する温度感受性チャネル、TRPV (the transient receptor potential vanilloid) 3 のアゴニストであるカルバクロールの刺激により角化細胞から速やかに NMU が放出された。

今回得られた結果は、様々な刺激によって角化細胞から放出された NMU が、MRGPRX2 を介してマスト細胞を活性化し、皮膚アレルギーの発症・増悪に関与する経路の存在を強く示唆している。今後、皮膚における NMU の合成・放出とそれに次ぐマスト細胞の詳細な活性化制御機構を解明することで、IgE 抗体に依存しないアレルギー疾患の病因解明につながると考えられる。また、角化細胞からの NMU 放出を制御する物質や、MRGPRX2 の特異的アンタゴニストの開発は、従来のアレルギー治療薬では効果が限定的であった難治性アレルギー疾患に対する有効な治療薬になると期待される。以上より、本研究は、今後のアレルギー疾患の研究・診療に資すること大である。よって、審査委員会全員は、本論文が申請者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	松尾 佳美
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Neuromedin-U directly induces degranulation of skin mast cells, presumably via MRGPRX2 (ニューロメジンUはMRGPRX2を介して皮膚マスト細胞の脱顆粒を誘導する)			
最終試験担当者			
主査	教授	菅野 雅元	印
審査委員	教授	竹野 幸夫	
審査委員	准教授	鎌田 英明	
<p>〔最終試験の結果の要旨〕</p> <p style="text-align: center;">判定 合格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年8月2日の第75回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年8月7日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 マスト細胞の種類と反応性の違い</li> <li>2 個体におけるMRGPRX2の発現細胞とその発現を規定・制御する因子</li> <li>3 角化細胞が発現するTLRの種類と活性化機序</li> <li>4 MRGPRX2とIgE受容体により活性化されるマスト細胞内シグナル伝達系の相違点</li> <li>5 NMUおよびMRGPRX2のバリエーションとマスト細胞に対する活性の違い</li> <li>6 皮膚に常在するブドウ球菌によるNMU遊離とマスト細胞活性化の有無</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			