

氏名	原田 結加
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 5721 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 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	好中球における小胞型ヌクレオチドトランスポーターの局在と生理的役割に関する研究
論文審査委員	教授 上原 孝 (主査) 教授 上田 真史 准教授 児玉 進

## 学位論文内容の要旨

好中球は、自然免疫の主体を担う白血球の一種である。走化性因子を受容した好中球は、走化性因子の濃度勾配に従って感染部へと遊走し、異物を貪食・殺菌し、生体防御の役割を果たす。一方、過剰な好中球の集積や活性化は、炎症性疾患や自己免疫疾患の発症・増悪を引き起こすため、好中球の機能制御メカニズムの解明は重要な課題である。

好中球の免疫応答の第一段階である遊走制御には、ATP などのヌクレオチドを情報伝達物質とするプリン作動性化学伝達が重要である。すなわち、走化性因子を受容した好中球は、その方向へ自ら ATP を放出する。放出された ATP やその分解産物であるアデノシンは ATP 受容体 (P2Y2) やアデノシン受容体 (A3) を介してオートクリン的に遊走を制御している。しかし、受容体に着目した研究は進んでいる一方で、ATP 放出機構に関する研究は少ない。近年、ヘミチャネルを介した好中球からの ATP 放出が報告されているが、複数の ATP 放出経路の存在が示唆されており、その詳細は不明であった。

本研究では、ATP の小胞内蓄積を担い、その後の開口放出に関与する小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) に着目した。開口放出された ATP が遊走を制御していることを実証野生型 (WT) と VNUT 遺伝子欠損 (VNUT KO) マウスから単離した好中球とヒト好中球を用いて VNUT の発現・局在、生理的機能解析を行い、好中球における ATP 放出機構と VNUT の生理的意義の解明を目指した。

RT-PCR 法、ウェスタンブロット法による解析の結果、遺伝子・タンパク質レベルで

VNUT が好中球に発現していた。免疫組織化学法では細胞内に顆粒状の VNUT のシグナルを検出した。VNUT の局在を調べるため、好中球を VNUT と分泌性オルガネラマーカーで二重染色した結果、VNUT は好中球の顆粒の 1 つである三次顆粒に局在していた。

好中球における VNUT の生理的機能を解析するため、マウス好中球からの ATP 放出実験をすると、刺激による ATP 放出が VNUT KO では見られなかった。また、マウス好中球からの ATP 放出は VNUT 阻害剤の添加により低下し、開口放出の特徴である温度依存性やカルシウム依存性を示した。

トランスウェルによる遊走実験では、刺激による遊走能が、VNUT KO や VNUT 阻害剤添加により低下した。また、VNUT の遊走への関与を個体レベルで検証するため、炎症部位へ遊走してきた好中球の数を WT と VNUT KO で比較した結果、WT に比べ VNUT KO で有意に減少していた。

本研究より、VNUT は好中球の三次顆粒に局在し、ATP 放出や遊走に関与していることが明らかとなった。この結果から、ATP が好中球から開口放出されていることが示唆された。本研究の成果により、新たな好中球からの ATP 放出機構の存在を証明し、プリン作動性化学伝達による好中球の機能制御の一端の解明に至った。

## 論文審査結果の要旨

先に提出された初稿の学位論文では、手法、とくに有意差検定に誤りが指摘されており、この点の再検討が必須であることを伝達した。さらには、実験結果に基づく考察の展開、結果がもたらす意義について不明瞭な部分があることを審査委員会で指摘された。

また、一部の実験において適切なコントロールが取られていない点や解析方法に問題があり、明瞭な結論を得るには不十分な箇所も見受けられた。これらの問題点に対して、申請者は訂正・修正を行い、改訂された学位論文を提出したことを認めた。指摘された点はすべて修正されていることを確認した。審査委員会ではこの点を踏まえ、本学位論文は学術的な意義を有していることで意見が一致した。したがって、博士の学位に値すると判断し、最終的に合格とした。