

氏名(本籍)：伊藤 あゆみ

学位の種類：博士(歯学) 学位記番号：歯博第544号

学位授与年月日：平成23年3月25日 学位授与の要件：学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻：東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目：細胞外ATPによるP2X7受容体を介する唾液腺上皮細胞からのMHC class II分子の表出と遊離

論文審査委員：(主査) 教授 笹野 高嗣
教授 越後 成志 教授 島内 英俊

論文内容要旨

【背景】異所性のMHC class II分子の発現は、末梢性トレランスの破綻を誘導し、組織特異的な自己免疫疾患の発症に大きく関与している。唾液腺や涙腺の破壊を特徴とする自己免疫疾患であるシェーグレン症候群においても、唾液腺上皮細胞における異所性のMHC class IIの発現がみられる。また、近年MHC class II分子による最適な抗原提示には、オートファジーが関与していることが報告されている。一方、細胞膜の破壊により組織中に放出された細胞外ATPは、細胞間伝達物質として働きサイトカイン産生や細胞死などを引き起こし、その受容体の一つであるP2X7受容体は、炎症および免疫反応においての役割が注目されている。そこで、本研究では細胞外ATPが唾液腺上皮細胞におけるMHC class II分子の発現に及ぼす影響について解析し、細胞外ATPと唾液腺上皮細胞の免疫応答との関わりについて検討を行った。

【対象と方法】ヒト唾液腺由来培養細胞株(HSG, HSY, AZA3)を対象に、ATPによるP2X7受容体を介したMHC class II分子発現誘導について免疫染色法、フローサイトメトリー、リアルタイムPCRにより検討し、さらに、ATPによるオートファジーの誘導およびexosomeについて免疫染色、ウエスタンブロット法により解析を行った。

【結果】ヒト唾液腺上皮細胞株をATPで刺激すると、細胞膜表面にMHC class IIの発現が認められた。細胞質内の解析では、無刺激の状態でも細胞質内に恒常的にMHC class IIが発現していることが確認されたが、ATP刺激による発現量に変化はなかった。また、MHC class II転写調節因子CIITAの発現量についてもATP刺激による増加は認められなかった。HSGではP2X7受容体が存在しており、P2X7受容体アゴニストであるBzATP刺激により、細胞膜表面でのMHC class IIの発現が誘導され、アンタゴニストであるoATP刺激により、ATPによるMHC class IIの発現が抑制された。さらに、ATP刺激により、細胞内でのオートファゴソームの形成の促進がみられ、MHC class II分子を内包したexosomeの放出が認められた。このexosomeはオートファ

ジ-のマーカーである LC3-II を発現していた。

【結論】以上の結果から、ヒト唾液腺上皮細胞株は細胞内に MHC class II 分子を恒常的に発現しており、細胞外 ATP 刺激により P2X7 受容体を介して、MHC class II 分子を細胞膜表面へ表出させると同時に、オートファゴソームに関連した exosome に内包された形で細胞外に放出する可能性が示された。これより、細胞外 ATP は末梢性トレランスの破綻を誘導し、シェーグレン症候群発症に関与するという新たな可能性が示唆された。

審 査 結 果 要 旨

異所性の MHC class II 分子の発現は、末梢性トレランスの破綻を誘導し、組織特異的な自己免疫疾患の発症に大きく関与している。唾液腺や涙腺の破壊を特徴とする自己免疫疾患であるシェーグレン症候群においても、唾液腺上皮細胞における異所性の MHC class II の発現がみられることが報告され、近年 MHC class II 分子による最適な抗原提示には、オートファジーが関与していることが報告されている。一方、細胞膜の破壊により組織中に放出された細胞外 ATP は、細胞間伝達物質として働きサイトカイン産生や細胞死などを引き起こし、その受容体の一つである P2X7 受容体は、炎症および免疫反応における役割が注目されている。本研究では細胞外 ATP が唾液腺上皮細胞における MHC class II 分子の発現に及ぼす影響について解析し、細胞外 ATP と唾液腺上皮細胞の免疫応答との関わりについて検討を行っている。

実験はヒト唾液腺由来培養細胞株 (HSG, HSY, AZA3) を対象に、ATP による P2X7 受容体を介した MHC class II 分子発現誘導について免疫染色法、フローサイトメトリー、リアルタイム PCR により検討し、さらに、ATP によるオートファジーの誘導および培養上清中の exosome について免疫染色、ウエスタンブロット法により解析を行っている。

その結果以下のことを明らかにしている。①ヒト唾液腺上皮細胞株を ATP で刺激すると、細胞膜表面に MHC class II の発現が認められた。②細胞質内の解析では、無刺激の状態でも細胞質内には恒常的に MHC class II が発現しており、ATP 刺激による発現量に変化はなかった。また、MHC class II 転写調節因子 CIITA の発現量についても ATP 刺激による増加は認められなかった。③ HSG では P2X7 受容体が存在しており、P2X7 受容体アゴニストである BzATP 刺激により、細胞膜表面での MHC class II の発現が誘導され、アンタゴニストである oATP 刺激により、ATP による MHC class II の発現が抑制された。④ ATP 刺激により、細胞内でのオートファゴソームの形成の促進がみられ、MHC Class II 分子を内包した exosome の放出が認められた。この exosome はオートファジーのマーカーである LC3-II を発現していた。

以上の結果から、ヒト唾液腺上皮細胞株は細胞内に MHC class II 分子を恒常的に発現しており、細胞外 ATP 刺激により P2X7 受容体を介して、MHC class II 分子を細胞膜表面へ表出させると同時に、オートファゴソームに関連した exosome に内包された形で細胞外に放出する可能性が示された。

本研究成果は、細胞外 ATP による末梢性トレランス破綻の誘導について明らかにし、今後の研究および臨床に寄与することが多岐である。よって、本研究は、博士(歯学)の学位授与に値するものと認める。