

博士論文内容要旨

ヒト単球様細胞におけるニッケルイオン (Ni^{2+}) 流入機構の解析

生活習慣病治療薬学分野 B5YD1021 小野寺 亮

【目的】ニッケル (Ni) アレルギーは IV 型アレルギーに分類され、主にアレルギー性接触性皮膚炎症状を引き起こす。実に各国人口の 10% あるいはそれ以上の人々が Ni アレルギーに罹患していると報告されている。原因となる Ni は耐久性・耐腐食性といった優れた物性を有することから、歯科金属、血管ステント、心臓ペースメーカー、人工関節などの医療機器の医用材料として用いられている。しかしながら、これらは常に組織や体液と接触しているため、材料表面から Ni^{2+} が溶出し、局所での炎症反応を引き起こし、かつ Ni^{2+} が血流に乗り、全身性にも皮膚炎症状を起こすことが報告されている。これまでに当研究室においては、マウスの背部皮下に Ni 線を埋入した際に Ni^{2+} が溶出し、cyclooxygenase-2 (COX-2)、ヒスタミン、macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) の産生など炎症反応が誘導され、また、活性化された好中球が更なる Ni^{2+} の溶出を促進し、その結果、 Ni^{2+} 誘導性炎症の悪循環を形成している可能性があることを報告している。したがって、Ni 含有医療機器から溶出する Ni^{2+} による炎症性細胞の活性化を阻害することは炎症の増悪を抑制する上で非常に重要であるといえる。

一般に Ni^{2+} は自己タンパク質と結合し、抗原性を獲得することでアレルギー反応を引き起こすと考えられている。その他に、 Ni^{2+} は細胞膜上の toll-like receptor 4 (TLR4) に結合し、NF- κ B 経路を活性化することで直接的に炎症反応を誘導することも報告されている。さらに、 Ni^{2+} は細胞内に流入し、prolyl hydroxylases (PHDs) の活性を抑制し、転写因子 hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) の活性化を誘導する。また、当研究室において、細胞内に流入した Ni^{2+} が heat shock protein 90 beta (HSP90 β) に結合し、HSP90 β と HIF-1 α との結合を阻害することを見出した。これらの機構により活性化された HIF-1 α は HIF-1 β とヘテロダイマーを形成し、HIF-1 α , β 複合体は核内に移行し炎症性ケモカイン Interleukin 8 (IL-8, CXCL8) の転写活性化を誘導する。したがって、 Ni^{2+} が細胞内へ流入することも Ni による炎症・アレルギー反応の誘発・増悪化に関して重要な役割を果たしている可能性が十分に考えられる。

金属イオンが細胞内へ流入するためにはイオントランスポーターを介する必要があるが、ヒトの細胞においては Ni^{2+} の輸送に特化した Ni^{2+} トランスポーターの存在は解明されていない。 Ni^{2+} と同様に 2 価の正電荷を有する Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} についてはそれぞれ特異的なトランスポーターが同定されている。ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、 Ni^{2+} が細胞内及び核内に移行することが報告されており、THP-1 細胞を Ni 化合物で刺激した際には IL-8 を産生することも報告されている。このように THP-1 細胞は Ni^{2+} を細胞内に流入させ、かつ IL-8 を産生する特徴を有する。そこで本研究では、THP-1 細胞を用いてヒト細胞における Ni^{2+} 流入機構の解明を行い、 Ni^{2+} による炎症誘発機構の最上流地点を標的とした新薬の開発につなげることを目的とした。

【方法】 ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞を NiCl_2 及び各種試薬で刺激した際の IL-8 (Interleukin 8) 発現量を ELISA 法により、細胞内に流入した Ni^{2+} を ICP-MS 及び Newport Green を用いて解析を行った。*In vivo* 実験として、Ni 線 ($\phi 0.8 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) をマウス背部皮下に埋入した際の、Ni 線埋入周辺皮膚組織における COX-2、MIP-2 発現を qRT-PCR 法により、皮膚組織及び血清中の Ni^{2+} を ICP-MS を用いて解析を行った。

【結果】

1. Ni^{2+} の細胞内流入に対する各金属塩化物及び各阻害薬の影響

THP-1 細胞に対し NiCl_2 で刺激を行った場合、 Ni^{2+} は経時的かつ濃度依存的に細胞内に流入し、これに伴い IL-8 産生も増加した。 NiCl_2 濃度が 0.2 mM の時、IL-8 産生は初めて有意に誘導され、かつ細胞の生存には影響を与えなかった。したがって、今後の実験では 0.2 mM の NiCl_2 を用いることとした。次に同じく 2 価カチオンに電離する各金属塩化物で共刺激した場合、 ZnCl_2 、 MnCl_2 、 CoCl_2 が Ni^{2+} の流入を抑制した。これら金属塩化物の濃度は 0.03 mM であったため、 Ni^{2+} の細胞内流入には Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} に対し高い親和性を有するイオントランスポーターが関与することが示唆され、両イオンが共存する場合にはトランスポーター上で競合し、 Ni^{2+} の流入が抑制されると考えられた。そこで、様々な 2 価カチオンの取り込みに関与する DMT1 (divalent metal transporter 1) の阻害薬の影響を確認したところ、 Ni^{2+} の流入量は減少しなかった。また、 Ni^{2+} が TLR4 を刺激して何らかのイオントランスポーターを誘導する可能性についても解析したが、TLR4 阻害薬により Ni^{2+} の流入量は減少しなかった。したがって、 Ni^{2+} の細胞内流入には DMT1 以外の恒常的に発現しているイオントランスポーターが関与している可能性が示唆された。

2. Ni^{2+} 細胞内流入及び IL-8 発現に対する ZnCl_2 、 MnCl_2 の影響

ZnCl_2 と MnCl_2 による Ni^{2+} 流入抑制により Ni^{2+} 誘導性 IL-8 産生も抑制されるかどうかを確認した。まずこれら金属塩化物の Ni^{2+} 流入抑制作用の濃度依存性を確認したところ、いずれも $0.01\text{-}0.03 \text{ mM}$ において濃度依存的に Ni^{2+} の流入を抑制した。 NiCl_2 と ZnCl_2 で共刺激した場合には NiCl_2 による IL-8 産生も濃度依存的に抑制されていた。一方で、 Mn^{2+} は Ni^{2+} と同様に HIF-1 α を安定化する作用を持つため、単独で IL-8 の産生を誘導する作用を示し、高濃度の MnCl_2 で共刺激した場合には IL-8

産生抑制作用は弱かった。ZnCl₂ と MnCl₂ は LPS (Lipopolysaccharide) 誘導性の IL-8 産生に対しては抑制作用を示さなかったため、Zn²⁺、Mn²⁺ による Ni²⁺ 誘導性 IL-8 産生抑制作用は Ni²⁺ の流入をトランスポーター上で競合的に抑制したことに起因すると考えられた。さらに、同じく金属アレルギーを誘発しやすい Co²⁺ に対する ZnCl₂ の作用を確認したところ、Co²⁺ の細胞内流入及び IL-8 産生は ZnCl₂ により同様に抑制された。

3. マウスにおける低亜鉛状態が Ni²⁺ 炎症応答に及ぼす影響

次に、生理的な濃度の Zn²⁺ が Ni²⁺ の応答性に影響を与えているかを明らかにするために、低亜鉛食で低亜鉛状態マウスを作製し、Ni 線を背部皮下に埋入し、Ni²⁺ による炎症反応への影響を解析した。その結果、正常マウスに比べて Ni 線埋入周辺皮膚組織における COX-2、及び MIP-2 の mRNA 発現量の増加が認められ、さらに、皮膚組織及び血清中の Ni²⁺ 含量もより顕著に増加することを見出した。これは、血中の Zn²⁺ が減少したことで炎症性細胞内への Ni²⁺ 流入量が増加し、細胞の活性化が増強された結果であると考えられた。

4. Ni²⁺ 細胞内流入阻害薬のスクリーニング

Ni²⁺ の細胞内流入機構には何らかの金属イオントランスポーターが関与している可能性が示唆されたため、次に Ni²⁺ 流入阻害薬の簡易スクリーニング系の構築を行った。細胞内 Ni²⁺ 含量の変化は Ni²⁺ に対し特異性の高い金属蛍光プローブ Newport Green を用いて解析を行った。また、候補化合物が直接的に蛍光を減弱させる偽陽性の場合を明確にするために、細胞を破碎した後の蛍光強度も合わせて測定した。本スクリーニング系を用いて探索を行ったところ、数個の化合物に蛍光強度増強抑制作用が認められた。一方、これら化合物により抑制された蛍光強度は細胞破碎操作によって回復が認められなかったことから、得られた候補化合物はキレート作用、あるいは消光作用を有していることが考えられた。

5. Ni²⁺ 細胞内流入及び IL-8 発現に対するヒスチジンの影響

Ni²⁺ 細胞内流入阻害薬スクリーニングの結果、Ni²⁺ キレート剤候補化合物として必須アミノ酸である L-ヒスチジンを見出し、Ni²⁺ 細胞内流入及び Ni²⁺ 誘導性 IL-8 産生

に及ぼす影響について解析した。その結果、THP-1 細胞において L-ヒスチジンは Ni^{2+} 流入及び IL-8 産生を濃度依存的に抑制した。鏡像異性体である D-ヒスチジンについても同様に解析を行ったところ、D-ヒスチジンも Ni^{2+} 流入及び IL-8 産生を濃度依存的に抑制した。一方で、LPS 誘導性の IL-8 産生に対しては L、D-ヒスチジンとも強力な抑制作用を示さなかった。最後に、D-ヒスチジンについて、実際に細胞内への Ni^{2+} 流入を抑制しているかを ICP-MS を用いて精密に解析したところ、細胞内 Ni^{2+} 濃度の増加は D-ヒスチジンにより抑制されることが確認された。一方で、 Zn^{2+} の細胞内流入には影響を及ぼさなかった。

【考察】ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞において、 Ni^{2+} の細胞内流入には Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} に対し高い親和性を有する金属イオントランスポーターが関与していることが示唆され、 Ni^{2+} の細胞内流入を抑制することが IL-8 産生抑制につながることを見出した。また、生体内においては生理的濃度の Zn^{2+} は Ni^{2+} 炎症応答を減弱させる役割を担っていることが示唆された。

金属含有医療機器から溶出した Ni^{2+} は単球などの炎症性細胞内に流入し、 Ni^{2+} 溶出増加サイクル形成を促進している可能性があり、その最上流地点である Ni^{2+} の細胞内流入機構は新規創薬標的となりうる (図 1)。本研究で構築したスクリーニング系を用いて新規抗金属炎症・アレルギー作用を有する種化合物の発見、医薬品としての開発が行われることが今後期待される。

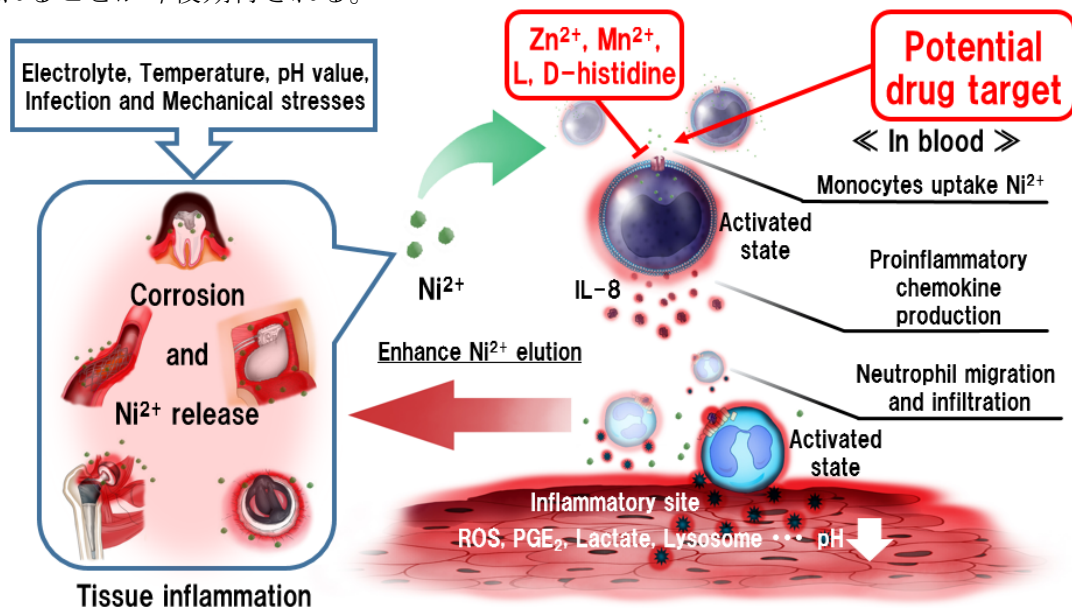


図 1. Ni^{2+} による炎症増悪化サイクル形成と新規創薬標的

論文審査結果の要旨

論文提出者： 小野寺 亮

論文審査委員（主査）： 佐藤 博

論文題目： ヒト単球様細胞におけるニッケルイオン (Ni^{2+}) 流入機構の解析

ニッケル (Ni) は耐久性・耐腐食性等の優れた物性を有することから血管ステントなどの医療機器に広く用いられている反面、組織炎症・金属アレルギーを誘発する危険性がある。本論文は、溶出した Ni^{2+} は細胞内に流入して炎症性細胞を活性化するが、その細胞内流入機構を解明する一環として、 Ni^{2+} の細胞内への流入を抑制する金属並びに化合物を探索し、 Ni^{2+} の流入を阻害する化合物が Ni^{2+} により誘発される炎症反応を抑制することを明らかにした。

まず、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞において Ni^{2+} は経時的かつ濃度依存的に細胞内へ流入することを ICP-MS により精密に Ni^{2+} 濃度を測定することにより明らかにした。本実験系において、 Ni^{2+} と同じ 2 価のカチオンに電離する各金属塩化物で共刺激した場合、 ZnCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 が Ni^{2+} の細胞内への流入を抑制することから、 Ni^{2+} は Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} に対し親和性を有するイオン輸送体を介して細胞内へ流入することを示した。さらに、細胞内 Ni^{2+} 含量の増加に伴い IL-8 産生も誘導されること、そして Ni^{2+} の細胞内への流入を抑制する ZnCl_2 と MnCl_2 は Ni^{2+} 誘導性の IL-8 産生も抑制すること、しかし LPS (Lipopolysaccharide) 誘導性の IL-8 産生に対しては抑制作用を示さなかったことから、 Zn^{2+} , Mn^{2+} は Ni^{2+} の細胞内流入を抑制することにより、IL-8 の産生を抑制していることが示唆された。この結果はまた Ni^{2+} の細胞内流入を抑制すれば炎症細胞の活性化を抑制されることを示している。次に、生理的な濃度の Zn^{2+} が Ni^{2+} の応答性に影響を与えているかを明らかにするために、低亜鉛食で 2 週間飼育し、低亜鉛状態のマウスを作製し、背部皮下に Ni 線を埋入する Ni 線誘発炎症モデルを用いて、 Ni^{2+} 炎症に対する生理的濃度の Zn^{2+} の影響を検討した。その結果、低亜鉛状態のマウスでは正常マウスに比べて Ni 線埋入周辺皮膚組織における COX-2, MIP-2 の mRNA 発現量の増加が認められたことから、低亜鉛血症の状態においては Ni^{2+} に対する応答性が増大することを明らかにした。

筆者はさらに Ni^{2+} の細胞内流入を抑制する化合物のスクリーニング系を構築し、L-histidine が Ni^{2+} の細胞内流入を抑制し、IL-8 の産生も抑制することを見出した。また D-Histidine も同様の作用を示すことを明らかにした。

以上の知見は、低亜鉛血症の患者では金属アレルギーが増悪しやすい可能性を示唆するとともに、 Ni^{2+} による炎症・金属アレルギーの治療や予防につながる重要な発見であると考えられる。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。