

氏名 (本籍)	いちのわたりがく 一ノ渡学
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	薬博第 309 号
学位授与年月日	平成 14 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	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 医療薬科学専攻
学位論文題目	ラット腹腔マクロファージにおける細胞内血小板 活性化因子の役割解明に関する研究

論文審査委員	(主査)	
	教授 大内和雄	教授 榎本武美
		教授 永沼章

論文内容要旨

血小板活性因子 (PAF) は、細胞膜リン脂質に由来する脂溶性の chemical mediator であり、喘息や糸球体腎炎などの炎症性疾患や生体の恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられている。炎症時には、種々の炎症細胞から様々な刺激により産生され、血小板をはじめ、好中球や好酸球の活性化、血管透過性亢進作用、および白血球浸潤促進作用などの生理活性を発現する。当研究室において、ラットのアレルギー性気管支炎モデルにおける好中球浸潤が種々の PAF 拮抗薬によって抑制されることを明らかにし、炎症性疾患における細胞浸潤に PAF が重要な役割を担っていることを示唆してきた。

炎症性細胞は様々な刺激により PAF を産生するが、その産生は remodeling pathway とよばれる経路により行われ、その経路において、リン脂質から遊離されたアラキドン酸が、cyclooxygenase (COX) あるいは lipoxygenase (Lox) によって各種 eicosanoid に代謝される。したがって、remodeling pathway によって炎症性細胞が PAF を産生する際には、PAF と各種 eicosanoid の二つのタイプの脂溶性 chemical mediator が細胞膜リン脂質から同時に産生され、両タイプの chemical mediator の産生系は、CoA-independent transacylase (CoA-IT) を介する反応によって調節されていると考えられている。

Eicosanoid の中には PAF と同様に強い生理活性を発現するものもあり、刺激により PAF と同時に産生されるそのような eicosanoid が PAF 産生の調節機序に関与していることが考えられる。また、CoA-IT は、PAF と eicosanoid の基質供給に関与する酵素として PLA₂, COX, および LOX と共に炎症に関与する重要な酵素であると考えられる。

PAF が発見されて以来、PAF は細胞外に遊離して作用するという考えのもとに「細胞外遊離型 PAF」に関する薬理学的研究が行われてきた。その後、細胞膜 7 回貫通型の PAF 受容体が同定され、細胞膜受容体を介する PAF の情報伝達に関する研究や、「細胞膜結合型 PAF」としての機能に関する研究あるいは、刺激によって産生される PAF がオートクラインの機序で細胞膜受容体に結合して作用することを示唆する研究が行われてきた。

しかし、好中球やマクロファージの細胞培養系においては、刺激によって産生される PAF は細胞外に放出されず、細胞膜結合型 PAF あるいは細胞内 PAF として細胞内に留まることが報告されている。また近年、COX, cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂), および 5-LOX は核膜あるいはその周囲に存在すること、また prostaglandin (PG) E₂ receptor のサブタイプの一つである EP1 も核膜に存在している可能性を示唆する報告がある。PAF の産生系には、eicosanoid の産生系と同様に PLA₂ の活性が関与しているため、PAF の細胞内産生部位も小胞体膜や核膜である可能性が考えられる。投与された PAF の薬理作用は PAF 受容体を介して発現されるが、細胞内 PAF がそのような細胞膜受容体に結合して作用するかどうかは解明されていない。また、細胞内 PAF が、細胞膜 PAF 受容体に作用せず、小胞体膜や核膜などの細胞内小器官で何らかの機序によって作用する可能性も否定できない。また、当研究室では、tumor necrosis factor- α (TNF- α) の産生に細胞内 PAF が促進的に作用することを報告した。したがって、このような細胞内 PAF の役割について解析することは、細胞膜受容体を介する情報伝達により発現される PAF の作用とは異なる

る PAF の新規作用を解明することになり得る。また、これまでの細胞膜 PAF 受容体拮抗薬とは異なる細胞内 PAF 拮抗薬という新規医薬を構築する上で役立つものと思われる。そこで、本研究では、炎症時に産生されるサイトカインの一つである interleukin-6 (IL-6) の産生に対して細胞内 PAF がどのように関与しているかについて解析した (第一章)。

IL-6 は、B 細胞、T 細胞、あるいはマクロファージなどの細胞に作用して免疫応答、炎症反応、および造血反応など、いわゆる性体防御に重要な役割を果たしているサイトカインであり、慢性関節リウマチや多発性骨髄腫において、IL-6 の過剰産生が報告されている。ここで、炎症細胞が刺激を受けて速やかに産生する PAF や prostanoid が、その後ひき起こされる TNF- α や IL-6 のようなサイトカインの産生に何らかの機序で関与している可能性が考えられる。

TNF- α mRNA や IL-6 mRNA の promoter 領域には、転写因子 nuclear factor (NF)- κ B の結合部位が存在している。NF- κ B は通常、inhibitory protein of NF- κ B (I κ B) とよばれる蛋白質と結合して不活性型として細胞質に存在している。細胞に刺激が加わると I κ B はリン酸化され、ユビキチン化を受けた後、26S プロテオソームによって分解される。一方、I κ B が分解された後 NF- κ B は核内へ移行し、DNA 上の κ B site と呼ばれる応答配列に結合して標的遺伝子の転写を促進する。近年、この I κ B- α のリン酸化反応を触媒する酵素として I κ B kinase (IKK) が発見され、その上流に存在する MAP kinase kinase kinase による活性化機構が明らかにされつつある。また、NF- κ B や IKK のノックアウトマウスが作製され、NF- κ B が炎症性疾患のみでなく胎児の発生にも関与していることが報告されている。これらの蛋白質因子の誘導は転写因子と呼ばれる一連の蛋白質によって調節されているため、転写因子が炎症性疾患の治療の新たなターゲットになり得るとして注目されている。したがって、転写因子の活性化の調節に対する細胞内 PAF の生理的役割を解明することは、炎症における PAF の意義を解明することにつながると考えられる。そこで本研究の後半では、NF- κ B の活性化において、細胞内 PAF がどのように関与するか解析した (第二章)。

マクロファージを thapsigargin で刺激して 10 分後をピークに産生される細胞内 PAF は、mRNA の誘導を介して IL-6 産生に促進的に作用していることが Co-IT 阻害薬 SK&F 98625 や高濃度の PAF 受容体拮抗薬 E6123 および L-652,731 を用いた薬理的解析により示唆された。また、細胞内 PAF と同時に産生される PGE₂ も IL-6 産生に対して促進的に作用することが示唆された。また、COX 阻害 indomethacin で PGE₂ 産生を抑制すると、細胞内 PAF 産生が増大するため、IL-6 産生は影響されないことが示された。各種の炎症性疾患に indomethacin は使用されているが、それによって PGE₂ 産生が抑制されるものの細胞内 PAF の産生が上昇することにより炎症細胞の機能発現が影響される可能性がある。アスピリン喘息は COX 阻害薬によって誘導され、その発症機序は COX 阻害薬によって COX 代謝物が減少し LOX 代謝物が増加するためであると考えられているが、未だその機序について明確な報告はない。このような COX 阻害薬は細胞内 PAF および PGE₂ による dual-regulation を受ける IL-6 の産生を抑制せず、TNF- α の産生を亢進させるため、これがアスピリン喘息の一つの誘因になる可能性がある。一方、CoA-IT 阻害薬のように、細胞内 PAF 産生および PGE₂ 産生を共に抑制する作用をもつ薬物は、IL-6 産生も抑制する作用があることが明らかになった。したがって CoA-IT 阻害薬、すなわち、細胞内 PAF 生合成阻害薬は、これまで開発されてき

た抗炎症薬とは異なり新規作用機序をもつ抗炎症薬を開発するための理論構築の手がかりとして重要であると考えられた。また、細胞外 PAF によっては IL-6 の産生は誘導されないことから、細胞内 PAF が、細胞膜 PAF 受容体を介するオートクラインのメカニズムによって IL-6 産生を亢進させる可能性はない。このように、細胞内 PAF が細胞膜 PAF 受容体を介さずに IL-6 産生を促進することが示唆され、これは細胞内 PAF の生理的な役割を示唆する新規の知見である。すなわち、細胞内 PAF には細胞外 PAF とは異なる生理的役割があることが示唆された。また、その作用機構も細胞外 PAF の作用機構とは異なることにより、細胞膜 PAF 受容体拮抗薬とは異なる新規の細胞内 PAF 作用拮抗薬を開発するための有効な手がかりを得ることができた。既存の PAF 拮抗薬は細胞内 PAF の作用に対しても拮抗作用を示したが、その有効濃度は 1-10 μ M の高濃度を必要とした。今後は細胞内 PAF に特異的かつ低濃度で有効な抗薬を開発する必要がある。

また、このような細胞内 PAF は、I κ B- α 分解および NF- κ B の核内移行に対しても促進的に作用することが示唆された (第二章)。すなわち、細胞内 PAF による NF- κ B 活性化亢進作用は、PAF 生合成阻害薬や細胞膜 PAF 受容体拮抗薬を高濃度で使用するにより抑制され、indomethacin で細胞内 PAF 産生を亢進すると NF- κ B 活性化もさらに亢進することが明らかになった。また、細胞外 PAF によって NF- κ B 活性化は誘導されなかったことより、NF- κ B の活性化においても細胞内 PAF には独立した生理的役割があることが示唆された。また、NF- κ B の活性化においても PAF 生合成阻害薬の有効性を示すことができたことより、細胞内 PAF の作用拮抗薬を開発することの重要性がさらに示されたものと思われる。

本研究により、細胞内 PAF には、細胞膜 PAF 受容体を介する細胞外 PAF の作用とは独立した新規の生理的役割があることが示唆された。すなわち、刺激直後に産生される細胞内 PAF は、細胞内情報調節因子として転写因子 NF- κ B を活性化し、mRNA 誘導を経て IL-6 産生を促進させることが示唆された。したがって、細胞内 PAF に特異的な作用拮抗薬を開発することができれば、種々の炎症疾患における細胞内 PAF の関与やその生理的役割を詳細に解析することが可能になり、新規作用機序をもった抗炎症薬として活用できることが期待される。今後、細胞内 PAF 作用拮抗薬を開発するため、細胞内 PAF の標的分子についての解析が必要である。

審査結果の要旨

本研究は、細胞膜受容体に結合して各種生理活性を発現すると考えられている血小板活性化因子 (PAF) に関し、細胞膜受容体を介さずに細胞内で情報伝達分子として作用するという新しい機序について解析を行い、細胞内 PAF の作用に対して拮抗する物質が新しい作用機序をもつ医薬になる可能性について考察したものである。

はじめに、種々の刺激に応答し細胞内 PAF の産生が亢進するラット腹腔マクロファージの培養系を用いて、炎症時に産生されるサイトカインである interleukin-6 (IL-6) の産生に対する細胞内 PAF の役割について解析した。その結果、Ca²⁺-ATPase 阻害薬 (thapsigargin) 刺激による IL-6 産生は、PAF 生合成に関与している酵素 CoA-independent transacylase 阻害薬 (SK&F98625) や高濃度の PAF 受容体拮抗薬 (E6123 及び L-652, 731) により抑制されることを示し、細胞内 PAF は IL-6 mRNA の発現誘導を介して IL-6 産生を亢進させることを示唆した。また、培養液中に PAF を添加しても IL-6 産生は亢進しないことから、細胞内 PAF の作用は、細胞膜受容体を介するオートクライン機構で発現するのではないことを示した。さらに、細胞内 PAF と同時に産生される prostaglandin E₂ (PGE₂) も IL-6 産生を亢進させることを示した。しかし、cyclooxygenase 阻害薬 (indomethacin) で PGE₂ 産生を抑制すると、細胞内 PAF 産生が増大することを示し、結果的には IL-6 の産生は影響されないことを明らかにした。

次に、IL-6 産生に関与している転写因子 nuclear factor (NF)- κ B の活性化に細胞内 PAF がどのように関与するか解析した。その結果、thapsigargin 刺激による NF- κ B の活性化は、PAF 生合成阻害薬 (SK&F98625) や高濃度の PAF 受容体拮抗薬 (E6123, E5880 及び L-652, 731) により抑制されること、及び cyclooxygenase 阻害薬 (indomethacin) で細胞内 PAF 産生を亢進させると NF- κ B の活性化がさらに亢進することを明らかにした。また、PAF を培養液中に添加しても NF- κ B の活性化は誘導されなかったことより、NF- κ B の活性化には細胞外の PAF は関与しないで細胞内の PAF が関与していることを示し、細胞内 PAF の作用拮抗薬を開発することの重要性を示唆した。

本研究は、細胞膜 PAF 受容体を介する細胞外 PAF の作用とは独立した新規の生理的役割が細胞内 PAF にあることを示し、細胞内 PAF の作用に拮抗する物質が新規作用機序をもつ抗炎症薬になり得ることを示唆した。

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。