

## 論文の内容の要旨

論文題目     マクロファージ細胞において炎症応答を抑制する  
                  シグナル調節機構の解析

氏    名     伊藤   政明

### 【序論】

炎症反応は、血小板、単球／マクロファージ、リンパ球などが血管内皮細胞と相互に関連し、血管床を舞台として起こる傷害に対する防御機構である。このうちマクロファージはその食作用により殺菌、抗体産生のための抗原提示を行うなど、重要な恒常性維持機構の一角を担っている。一方で、マクロファージ機能の異常は慢性的な炎症の原因となり、動脈硬化の進展、耐糖能異常、腫瘍の形成・転移など多くの病気に関わっている。

炎症巣では、侵害刺激により各種ケミカルメディエーターが遊離するとともに組織より大量のアデノシン三リン酸（ATP）が放出されている。ATP をはじめとする細胞外ヌクレオチドによるプリン作動性シグナルは多様な生理応答に寄与しており、生理機能調節因子として益々注目されている。しかし、マクロファージにおけるプリン作動性シグナルは十分に明らかにされておらず、その解明は慢性炎症の原因究明につながる重要な課題であると考えられる。

一方、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) はシクロオキシゲナーゼの主要な代謝産物の 1 つであり、炎症組織に蓄積し多様な生理応答を示す。近年の臨床における知見から、マクロファージにおける PGE<sub>2</sub> シグナルが虚血性疾患発症の引き金となっていることを示唆している。このように炎症組織等においては細胞外ヌクレオチドとともにプロスタノイドのような種々のケミカルメディエーターも放出され、相互に影響し合い細胞障害の初期応答因子として働くと考えられるが、それらの相互作用については明らかでない。

本研究では、マクロファージを取り巻くプリン作動性シグナル伝達を明らかにし、炎症病態におけるマクロファージ機能制御に関わるプリン作動性シグナルの役割について解析した。またその過程で、プリン作動性シグナルと PGE<sub>2</sub> シグナルの相互作用が認められたことから、細胞内シグナル伝達機構を中心にその調節機構を解析した。

## 【本論】

### 1. マウスマクロファージ由来の J774 細胞株におけるプリン受容体の発現と機能およびプロスタグランジンの影響

マウスマクロファージ由来の J774 細胞株におけるプリン受容体遺伝として、イオンチャネル型の P2X<sub>4</sub> と P2X<sub>7</sub> 受容体、G 蛋白共役型の P2Y<sub>2</sub> と P2Y<sub>6</sub> 受容体の発現が認められ、特に P2Y<sub>6</sub> 受容体の発現が顕著であった。これらのプリン受容体は刺激に応じて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 上昇を引き起こし、いずれも機能的に発現していると考えられた。

一方、主要なケミカルメディエーターであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は、J774 細胞において単独では [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> に影響せず、ATP による P2Y<sub>2</sub>、P2X<sub>4</sub> 受容体刺激および UDP による P2Y<sub>6</sub> 受容体刺激を介する [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇応答を濃度依存的に抑制し、その IC<sub>50</sub> 値は約 30 nM であった。しかし、P2X<sub>7</sub> 受容体選択的アゴニストである Bz-ATP による反応は PGE<sub>2</sub> で抑制されなかった。したがって、PGE<sub>2</sub> はイオンチャネル型 P2X<sub>4</sub> 受容体と G 蛋白共役型 P2Y<sub>2</sub> および P2Y<sub>6</sub> 受容体の機能を共に抑制することが示された。

### 2. プリン受容体のマクロファージ機能への影響と PGE<sub>2</sub> の抑制作用

J774 細胞に発現が確認されたプリン受容体と PGE<sub>2</sub> 受容体の刺激作用がマクロファージ炎症性蛋白質 (MIP)-1 $\alpha$  の産生にどのように影響するか検討した。MIP-1 $\alpha$  は C-C ケモカインの一つであり、T 細胞や B 細胞、好塩基球など種々の免疫細胞の遊走を促進する。

ATP、UDP、あるいは Bz-ATP の刺激により、J774 細胞の MIP-1 $\alpha$  の分泌が亢進した。また、その程度は ATP あるいは UDP による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇作用の程度と関係していると考えられた。細胞外ヌクレオチドによる MIP-1 $\alpha$  の分泌亢進に対して、PGE<sub>2</sub> は抑制作用を示し、それはプリン作動性シグナルによる [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に対する抑制プロファイルと一致していた。

したがって、ATP や UDP をはじめとする細胞外ヌクレオチドは、炎症を促進する作用があると考えられた。一方、炎症反応において主要な働きを担う PGE<sub>2</sub> が、これらの細胞外ヌクレオチドの作用を抑制し、抗炎症作用をもたらす可能性が示唆された。

### 3. J774 細胞における UDP によるイノシトール水解反応に対する PGE<sub>2</sub> の作用

UDP が作用する P2Y<sub>6</sub> 受容体は G<sub>q</sub> 蛋白質を介して PLC を活性化する。UDP は刺激時間と用量に依存的に PLC を活性化した。PGE<sub>2</sub> はこの UDP による PLC 活性化を用量依存的に強く抑制した。UDP と PGE<sub>2</sub> の相互作用は [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化に対する作用とよく一致していた。したがって、PGE<sub>2</sub> による UDP シグナルの抑制の作用点は P2Y<sub>6</sub> 受容体から PLC の間と想定された。

### 4. J774 細胞における PGE<sub>2</sub> 受容体の発現とその機能

PGE<sub>2</sub> の受容体には EP1 から EP4 の 4 つのサブタイプが知られているが、J774 細胞には EP2 および EP4 受容体の発現が認められ、特に EP2 受容体が豊富であった。EP2 および EP4 受容体は G<sub>s</sub> 蛋白質と共役することから cyclicAMP (cAMP) 産生能を測定した。その結果、EP2

および EP4 受容体の選択的アゴニストは濃度依存的に cAMP レベルを上昇させたが、その作用は EP2 選択的アゴニストでより強力であった。さらに、各種 EP 受容体に選択的なアゴニストを用いて細胞外ヌクレオチドによる  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する作用を検討した結果、EP2 および EP4 受容体の選択的アゴニストが  $PGE_2$  の作用を模倣した。以上の結果より、受容体遺伝子発現レベル、cAMP 産生能などを勘案し、 $PGE_2$  は主に EP2 受容体を介して作用することが示唆され、既報より  $G_s$  蛋白質/cAMP 経路の関与が示唆された。

#### **5. UDP による $G_q$ -PLC 活性化に対する AC/cAMP/PKA 経路修飾薬の影響**

UDP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇や PLC 活性化に対して、アデニル酸シクラーゼ (AC) 活性化剤のフォルスコリン (FK) や cAMP 誘導体のジブチリル cAMP (dbcAMP) による PKA シグナル経路の活性化では、 $PGE_2$  の抑制が模倣できなかった。また、PKA 阻害剤の H-89 は  $PGE_2$  の作用を解除できなかった。さらに J774 細胞の AC ノックダウンによっても、UDP シグナルに対する  $PGE_2$  の抑制作用は影響を受けなかった。したがって、UDP による  $G_q$ -PLC 活性化に対する  $PGE_2$  の抑制作用における AC/cAMP/PKA 経路の関与が否定された。

#### **6. UDP による $G_q$ -PLC 活性化に対する $PGE_2$ の抑制作用における PKC の関与**

近年、 $PGE_2$  が PKC の活性化を介して  $P2Y_6$  受容体刺激を抑制する可能性が報告された。そこで PKC の活性化剤であるホルボールエステル (PMA) の作用について検討した。J774 細胞において、PMA は  $PGE_2$  と同様に UDP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇や PLC 活性化を強く抑制した。また、PMA 長時間処理によりプロテインキナーゼ C (PKC) を脱感作させると、PMA の作用は完全に消失したが、 $PGE_2$  の作用は影響を受けなかった。したがって、UDP によるシグナルに対する  $PGE_2$  の抑制は PKC 活性に依存しないと考えられた。

#### **7. UDP による $G_q$ -PLC 活性化に対する $PGE_2$ の抑制作用における $G_s$ 蛋白質の関与**

本実験では、 $PGE_2$ /EP2 シグナルにおいて AC のさらに上流の  $G_s$  蛋白質の関与について検討した。J774 細胞の  $G_s$  蛋白質をノックダウンした結果、UDP による PLC 活性化に対する  $PGE_2$  の抑制作用が解除された。したがって、 $PGE_2$  による  $G_q$ -PLC の抑制作用に  $G_s$  蛋白質は関与すると考えられた。

#### **8. 受容体刺激に依存しない PLC 活性化に対する $PGE_2$ の作用**

$PGE_2$  により抑制を受ける標的が  $P2Y_6$  受容体- $G_q$ -PLC の間のどこかをさらに絞るために、受容体刺激に依存しない PLC 活性化、すなわちフッ化アルミニウム ( $AlF_4^-$ ) による直接的な G 蛋白質活性化あるいは、カルシウムイオノフォアによる  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を介する PLC 活性化に対する  $PGE_2$  の作用を検討した。その結果、 $PGE_2$  は  $AlF_4^-$  による PLC 活性化を有意に抑制したが、カルシウムイオノフォア誘発 PLC 活性化は抑制しなかった。フッ化アルミニウムによる G 蛋白質の活性化は、GTP アーゼ活性化蛋白質 (GAP) 非依存的であることが知られている

ため、PGE<sub>2</sub>の作用には RGS 等の GAP 活性化や PLC の直接的な抑制は関与せず、Gq と PLC の相互作用を抑制している可能性が考えられた。

#### 【結語】

本研究では、炎症巣などの部位においてプリン作動性シグナルおよび PGE<sub>2</sub> シグナルは相互にマクロファージ機能を制御している可能性が示唆された。すなわち、マウスマクロファージ由来細胞株である J774 細胞において、ATP や UDP によるプリン作動性シグナルが活性化に機能している事、PGE<sub>2</sub> がそれらの応答を抑制する事を見出した。また、PGE<sub>2</sub> による EP2 受容体を介した広範な Gq-ホスホリパーゼ C-Ca<sup>2+</sup>シグナルの抑制作用は、Gs 蛋白質に依存のだが cAMP/PKA シグナル以外の機構で Gq 蛋白質とホスホリパーゼ C の相互作用を抑制する、新しい経路である可能性を明らかにした。

Gq-PLC シグナルは種々のホルモンや神経伝達物質からの多くの情報が収束される経路である。本研究成果は Gq-PLC シグナルの抑制を標的にすることで、興奮性の生理機能応答を背景とする血圧上昇、気管支狭窄、免疫細胞のサイトカイン産生亢進、血栓形成などの様々な病態に対して、受容体遮断薬よりも広いスペクトルを持つ治療薬の創出につながるものと期待される。