

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 政明

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作用して血管床でおこる炎症反応は、傷害に対する生体防御機構であり、炎症を基盤とした様々な疾患の原因にもなる。炎症巣では、侵害刺激によりアデノシン5'-三リン酸 (ATP) のようなヌクレオチドが細胞外へ大量に放出されるとともに、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産生され、相互に影響し合って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着目した研究は少ない。「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」と題した本論文では、炎症病態において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とPGE₂シグナルの相互作用について、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ている。本研究から、PGE₂シグナルによるGq蛋白質-ホスホリパーゼC (PLC) -Ca²⁺シグナルの抑制が、Gs蛋白質に依存するものの、cAMP/プロテインキナーゼA (PKA) 以外の経路を介して、GqとホスホリパーゼCの相互作用を阻害するという、新しいシグナル伝達経路の存在が提示されている。

1. マウスマクロファージ由来 J774 細胞株におけるプリン受容体の役割とそれに対するプロスタグランジン E₂ の影響

マウスマクロファージ由来の J774 細胞株においては、プリン受容体として、イオンチャネル型の P2X₄ と P2X₇ 受容体、G 蛋白共役型の P2Y₂ と P2Y₆ 受容体の発現が認められる。これらのプリン受容体は刺激に応じて細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇を引き起こすと同時に、炎症性ケモカインの1つであるマクロファージ炎症性蛋白質(MIP)-1 α の産生を亢進した。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 E₂ (PGE₂) は、単独では[Ca²⁺]_i に影響を与えないが、プリン受容体刺激を介する [Ca²⁺]_i 上昇応答及び MIP-1 α の産生を顕著に抑制することを明らかにした。これらの結果より、マクロファージにおいて細胞外ヌクレオチドは炎症応答を促進する作用があり、一方、炎症反応において主要な働きを担う PGE₂ 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を見出している。

2. J774 細胞における UDP/P2Y₆ 受容体シグナルに対する PGE₂ の抑制機構の解析

細胞外ヌクレオチドの作用に対する PGE₂ の抑制作用のメカニズムを解析するために、

マクロファージ J774 細胞株で、UDP を内因性アゴニストとする P2Y₆ 受容体のシグナル伝達に焦点を絞り解析した。PGE₂ が作用する受容体としては、EP2 タイプが責任受容体であることを突き止めている。この EP2 受容体は一般的に G_s 蛋白質を介するシグナルを伝達するが、アデニル酸シクラーゼ (AC) 活性化剤のフォルスコリンや cAMP 誘導体のジブチリル cAMP による PKA シグナル経路の活性化では、PGE₂ の抑制作用を模倣できず、また、PKA 阻害剤 H-89 は PGE₂ の抑制作用を解除しなかった。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 PGE₂ の抑制作用は影響を受けなかった。以上の結果より、PGE₂ の抑制作用には、AC/cAMP/PKA 経路が関与しないものと考えられた。しかしながら、J774 細胞の G_s 蛋白質をノックダウンすると、UDP による PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用が解除されることから、PGE₂ による G_q-PLC の抑制作用には G_s 蛋白質が関与することを見出している。

3. PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用の標的の解析

PGE₂ によって抑制を受ける標的が P2Y₆ 受容体-G_q-PLC 経路のどこにある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 (AlF₄⁻) 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 [Ca²⁺]_i 上昇を介する PLC 活性化に対する PGE₂ の作用を検討した。その結果、PGE₂ は AlF₄⁻ 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 活性化を抑制しなかった。AlF₄⁻ による G 蛋白質の活性化は、GTP アーゼ活性化蛋白質 (GAP) 非依存であるため、PGE₂ の作用には RGS (regulator of G protein signaling) 等の GAP 活性化や PLC の直接的な抑制は関与せず、G_q と PLC の相互作用を抑制している可能性を見出している。

以上を要するに本論文は、1. 炎症巣などの部位において ATP や UDP によるプリン作動性シグナルがマウスマクロファージ機能を正に制御すること、2. PGE₂ がそれらの応答を抑制することを見出している。さらに、薬理学的手法を中心に消去法的展開で論理的にアプローチし、PGE₂ による EP2 受容体を介した広範な G_q-PLC-Ca²⁺シグナルの抑制作用は、G_s 蛋白質に依存するものの、cAMP/PKA シグナル経路を介さずに、G_q 蛋白質と PLC の相互作用を阻害することによるという、新しい経路の存在を提示している。G_q-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。本研究の成果は、G_q-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もつ治療薬の創出につながる重要な手掛かりを与えており、博士 (薬科学) の学位として十分な価値があるものと認められる。