

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 嶋中 雄太

近年、先進国においてアレルギー患者数は急増しており大きな社会問題となっている。アレルギー患者の特徴として血中 IgE の上昇とマスト細胞の過度の活性化が挙げられ、マスト細胞の活性化制御機構の解明がアレルギー治療のための急務である。マスト細胞は皮膚などの結合組織や腸などの粘膜組織に常在する免疫細胞であり、抗原特異的な IgE が、IgE 受容体である FcεRI を介して結合し、抗原に暴露されると、顆粒小胞中のヒスタミンなどの生理活性物質の放出、いわゆる脱顆粒が生じる。さらに抗原刺激依存的にプロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) などの脂質メディエーターや TNFα などの炎症性サイトカインの産生が起き、他の免疫細胞や血管内皮細胞などに作用してアレルギー疾患を引き起こす。一方で近年、マスト細胞が産生する脂質メディエーターが、マスト細胞自身にも作用することが明らかとなってきた。しかしながら脂質によるマスト細胞活性化への関与の詳細は全く明らかとなっていない。嶋中は本研究においてまず、これら既知の脂質メディエーターの他に、マスト細胞がどのような酸化脂肪酸を産生するのか、LC-MS によるメタボロミクスを利用し網羅的に調べた。

まず野生型マウスから単離した骨髓細胞を IL-3 存在下で培養することにより、骨髓由来培養マスト細胞(BMMC)を作成し、この BMMC を無刺激状態で4日間培養した際の培養上清から脂肪酸画分の一斉定量を行った。その結果、驚くべきことにマスト細胞は従来のアラキドン酸由来の酸化脂肪酸よりも、EPA や DHA 由来の酸化 ω3 脂肪酸を構成的に産生していることが明らかとなった。次にこれら酸化 ω3 脂肪酸がどのような酵素によって産生されているのか解析すべく、BMMC における各種ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)の発現を定量 PCR により解析した。その結果、酸化リン脂質選択的ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>である細胞内 II 型 PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH (II)) がマスト細胞において高発現していた。そこで PAF-AH (II) 欠損マウス由来 BMMC の培養上清中の酸化 ω3 脂肪酸量を測定した結果、WT BMMC と比べて顕著に減少しており、これら酸化 ω3 脂肪酸の産生に PAF-AH (II)が関与していることが強く示唆された。

次に皮膚に常在するマスト細胞における PAF-AH (II)の機能を調べるために、PAF-AH (II) KO マウスに対し受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応を行い、IgE/抗原依存的なマスト細胞の脱顆粒反応を評価した結果、KO マウスではアナフィラキシーの大きな減弱が見られた。さらに KO BMMC においては抗原刺激依存的な脱顆粒が WT に比べ脱顆粒が減少していた。以上の結果から、PAF-AH (II)がマスト細胞の IgE/抗原依存的な活性化に、個体レベル及び細胞レベルで必要であることを明らかとした。

次に PAF-AH (II) KO BMMC で減少していた酸化 ω3 脂肪酸のうちどの脂肪酸が表現型に関わるのか調べた。KO BMMC に各種酸化 ω3 脂肪酸を添加し、抗原刺激したところ、エポキシ化 ω3 脂肪酸である 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid (EpETE)や 19,20-epoxydocosapentaenoic acid (EpDPE)を添加した時のみ、KO BMMC の脱顆粒が WT と同程度にまで回復した。この現象は、個体レベルのアナフィラキシーにおいても見られた。以上から、17,18-EpETE 及び 19-20-EpDPE は IgE/抗原依存的なマスト細胞

の活性化に重要な、PAF-AH (II)により産生される脂肪酸メディエーターであることが強く示唆された。

PAF-AH (II)は酸化リン脂質に選択的な  $PLA_2$  であることから、嶋中はマスト細胞内に 17,18-EpETE や 19-20-EpDPE を含有するエポキシ化リン脂質が存在すると考えた。しかしながら、これまでにそのようなリン脂質の報告はない。そこでエポキシ化リン脂質の構造を予想した仮想 MRM を組み、LC-MS/MS により内在のエポキシ化リン脂質の検出を試みたところ、マスト細胞内には 17,18-EpETE 含有リン脂質が存在することが明らかとなった。次に PAF-AH (II)が実際に 17,18-EpETE 含有リン脂質を基質とするのか検討したところ、リコンビナント PAF-AH (II)は酵素活性依存的にリポソーム中の 17,18-EpETE 含有リン脂質を分解し、17,18-EpETE を放出した。以上から PAF-AH (II)がエポキシ化リン脂質を基質とし、エポキシ化脂肪酸を切り出す酵素であることを明らかとした。

次に、エポキシ化  $\omega 3$  脂肪酸がマスト細胞の活性化を制御する作用機序を調べた。脂質をリガンドとする転写因子である核内受容体に着目した結果、PPAR $\gamma$  阻害剤 GW9662 が KO BMMC の脱顆粒を WT と同程度まで回復させた。また、GW9662 を KO マウスの耳介に投与し、PCA 反応を行ったところ、PCA 反応が WT と同程度まで回復した。以上から、エポキシ化  $\omega 3$  脂肪酸は PPAR $\gamma$  の活性を抑制することにより、マスト細胞の IgE/抗原刺激依存的な脱顆粒反応を促進している可能性が示された。

これまでの結果から PAF-AH (II)が酵素活性依存的にエポキシ化リン脂質から切り出すエポキシ化  $\omega 3$  脂肪酸がマスト細胞の IgE/抗原刺激依存的な脱顆粒反応を細胞レベル、及び個体レベルで制御していることを明らかとした。そこで近年報告された PAF-AH (II)選択的阻害剤 AA39-2 を WT BMMC や WT マウス耳介に処理し、マスト細胞の脱顆粒に対する影響を細胞及び個体レベルで調べたところ、AA39-2 処理により、BMMC の脱顆粒及び耳介の浮腫が PAF-AH (II) KO と同程度まで抑制された。以上のことから、AA39-2 は PAF-AH (II)を標的として、即時型アレルギー反応を抑制することが示唆され、創薬標的としての PAF-AH (II)の可能性が示された。

最後に今回明らかとなったマスト細胞における PAF-AH (II)の機能がヒトにも保存されているか検討した。ヒト滑膜由来のマスト細胞に対し、PAF-AH (II)阻害剤 AA39-2 を添加したところ、マスト細胞の抗原刺激依存的な脱顆粒が抑制された。さらに、AA39-2 処理したマスト細胞に対しエポキシ化  $\omega 3$  脂肪酸を添加したところ、脱顆粒が回復致した。以上から、ヒトマスト細胞においても、PAF-AH (II)がエポキシ化  $\omega 3$  脂肪酸を介して活性化を制御していることが明らかになった。

本研究において嶋中は、膜リン脂質から PAF-AH (II)によって切出されたエポキシ化  $\omega 3$  脂肪酸が PPAR $\gamma$  の活性化を抑制し、マスト細胞の IgE 抗原依存的な脱顆粒シグナルを促進していることを明らかとした。本研究は、PAF-AH (II)がエポキシ化された酸化リン脂質を加水分解し、生理活性を有するエポキシ化脂肪酸を直接遊離するという全く新しい生理活性脂肪酸の産生経路の存在を示すものであり、非常に意義深い。さらに嶋中は、この新規産生経路が人においても保存されていることが示しており、新規作用機序によるアレルギー治療の可能性を示した点で今後の発展が大いに期待できる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。