

好塩基球性白血細胞株 KU812 における

チアゾリジンジオン化合物の作用

学位論文内容の要旨

thiazolidinedione derivatives (TZDs) はインスリン非依存型糖尿病患者においてインスリン抵抗性を改善する作用を有しており、血中グルコースを減少させると同時に血中トリグリセリドや遊離脂肪酸を減少させ、HDL-コレステロールを増加させる。現在、TZDs の一つであるpioglitazone (PGZ) は糖尿病治療薬として用いられている。TZDs は核内ホルモン受容体スーパーファミリーの一つである peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) の γ サブタイプに結合して活性化し、標的遺伝子の発現を調節する。PPAR γ の標的遺伝子の多くは糖代謝および脂肪合成に関与しており、TZDs の抗糖尿病作用は PPAR γ の活性化を介していると考えられている。PPAR γ は主に脂肪細胞に発現しており、先に述べたように糖代謝や脂肪合成や脂肪細胞分化において非常に重要な役割を果たしている。ところが、最近、PPAR γ は脂肪細胞以外の組織にも発現しており、PPAR γ の活性化は多様な作用を示すことが報告された。そのため、TZDs は糖尿病だけではなくアテローム性動脈硬化症やリウマチ性関節炎などの炎症性疾患や悪性腫瘍などの様々な疾患において新しい治療薬となることが期待される。

好塩基球やマスト細胞は花粉症などのアレルギー性疾患に関与していると考えられており、これらの細胞における TZDs の作用を検討することは非常に興味深く、意義のあることと思われる。しかし、好塩基球やマスト細胞に対する TZDs の作用についての報告は非常に少なく不明な点が多い。筆者は TZDs は好塩基球やマスト細胞によるI型アレルギー反応も抑制するという仮説をたて、TZDs の一つである troglitazone (TGZ) を用いて好塩基球性白血細胞株 KU812 に対する作用を検討したところ、以下の知見が得られた。

1. 細胞増殖に対する TGZ の作用

KU812 細胞の細胞増殖に対する troglitazone (TGZ) 、PGZ および rosiglitazone (RGZ) の3種類の TZDs の作用について検討した。今回用いた全ての TZDs は KU812 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。細胞増殖抑制作用の強さは TGZ > PGZ > RGZ の順となり、TGZ が最も強い細胞増殖抑制作用を示した。FACS 解析の結果から、TGZ は細胞周期の進行を G1 期で停止させることが分かった。細胞周期の G1 期から S 期への移行に重要な役割を果たしている Rb、cyclin D1、cyclin E および転写因子 E2F に対する TGZ の作用を検討した。ウェスタンブロット法によって検討したところ、TGZ はリン酸化型 Rb を減少させ、濃度依存的に cyclin E を減少させた。一方、cyclin D1 は TGZ 処理により増加した。E2F の既知の標的遺伝子である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と B-Myb の mRNA 発現を RT-PCR 法で測定することによって、間接的に E2F の転写活性に対する TGZ の作用を検討したところ、TGZ は E2F 転写活性を抑制することが示唆された。以上の結果から、TGZ による細胞増殖抑制機構として、cyclin E およびリン酸化型 Rb の減少によって E2F 転写活性が低下した結果、細胞周期が G1 期で停止し、細胞増殖が抑

制されることが示された。

2. 好塩基球分化に対する TGZ の作用

KU812 細胞の好塩基球への分化に対する TGZ の作用について検討した。好塩基球分化の指標として高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) の発現、histamine および cytokine の産生を測定した。RT-PCR 法、ウェスタンブロット法および FACS 解析の結果から、TGZ は KU812 細胞内部での Fc ϵ RI α の発現を増加させるが、細胞表面上の発現には全く影響を与えないことが分かった。また、KU812 細胞において Fc ϵ RI α は分泌型として存在している可能性が示された。分泌型 Fc ϵ RI は血液中で遊離の IgE と結合して、血中 IgE 濃度を低下させ、IgE に対する反応を抑制すると考えられている。TGZ は KU812 細胞による histamine 産生を抑制することを見いだしたが、この機構として HDC mRNA 発現レベルでの抑制が起こるためと推定された。TGZ は phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と A23187 との同時刺激によって誘導された cytokine 産生を転写レベルで抑制した。cytokine 産生抑制作用の強さは TGZ > RGZ > PGZ の順であった。

以上の結果を考えあわせると、TGZ は KU812 細胞の好塩基球への分化を負に調節することが推定され、TZDs の抗アレルギー薬としての可能性が示されたものといえるだろう。

3. TGZ の作用機構の検討

TGZ の作用機構を解明するため、KU812 細胞における PPAR の発現、TGZ の作用と vitamin E 骨格との関連、NF κ B および NFAT の活性化に対する TGZ の作用について検討した。RT-PCR 法によって、KU812 細胞における PPAR の発現を検討したところ、KU812 細胞では PPAR γ の発現が検出されなかった。したがって、TGZ は PPAR γ 非依存的に作用していることが推察された。一方、PPAR α や PPAR β の発現が TGZ によって抑制されたことから、TGZ の作用に PPAR α や PPAR β が関与している可能性が示された。TGZ は vitamin E 骨格を有しており、TGZ の作用に vitamin E 骨格の関与が考えられる。そこで、tocopherol と TGZ の細胞増殖抑制作用および cytokine 産生抑制作用の強さを比較検討したところ、TGZ の作用に vitamin E 骨格は直接的には関与していないことが示唆された。TGZ の cytokine 産生抑制機構を EMSA 法によって検討した結果、TGZ は PPAR γ 非依存的に、NF κ B や NFAT を介した情報伝達を阻害していることを見いだした。

以上の研究は KU812 細胞に対する TGZ の作用とその作用機構の一部を明らかにしたものである。また、TZDs の抗アレルギー薬としての可能性も示されたといえるだろう。今回用いた3種類の TZDs は全て細胞増殖を抑制したが、NF κ B や NFAT の活性化抑制は TGZ でのみ観察されたことから、KU812 細胞には TZDs 共通の作用部位と NF κ B や NFAT 活性化抑制の原因となる TGZ 特異的な作用部位が存在すると考えられる。TZDs の作用機構の全貌はまだ明らかになっておらず、今後の研究を待たなければならない。

学位論文審査の要旨

主査	教授	原島秀吉
副査	教授	五十嵐靖之
副査	助教授	紙谷浩之
副査	助教授	井ノ口仁一

学位論文題名

好塩基球性白血病細胞株 KU812 における チアゾリジンジオン化合物の作用

thiazolidinedione derivatives (TZDs) はインスリン非依存型糖尿病患者においてインスリン抵抗性を改善する作用を有しており、TZDs の一つである pioglitazone (PGZ) は糖尿病治療薬として用いられている。核内ホルモン受容体スーパーファミリーの一つである peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) の γ サブタイプは TZDs と結合することによって活性化され、標的遺伝子の発現を調節する。PPAR γ の活性化は多様な作用を示すことが報告されており、TZDs は糖尿病だけではなくアテローム性動脈硬化症やリウマチ性関節炎などの炎症性疾患や悪性腫瘍などの様々な疾患において新しい治療薬となることが期待されている。

好塩基球やマスト細胞は花粉症などのアレルギー性疾患に関与していると考えられており、これらの細胞における TZDs の作用を検討することは非常に興味深く、意義のあることと思われる。筆者は TZDs は好塩基球やマスト細胞による I 型アレルギー反応も抑制するという仮説をたて、TZDs の一つである troglitazone (TGZ) を用いて好塩基球性白血病細胞株 KU812 に対する作用を検討したところ、以下の知見が得られた。

細胞増殖に対する TGZ の作用

KU812 細胞の細胞増殖に対する TGZ、PGZ および rosiglitazone (RGZ) の 3 種類の TZDs の作用について検討した。今回用いた全ての TZDs は KU812 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。細胞増殖抑制作用の強さは TGZ > PGZ > RGZ の順であった。FACS 解析の結果から、TGZ は細胞周期の進行を G1 期で停止させることが分かった。TGZ は細胞周期の G1 期から S 期への移行に重要な役割を果たしている cyclin E、リン酸化型 Rb および E2F 転写活性を減少させた。

好塩基球分化に対する TGZ の作用

KU812 細胞の好塩基球への分化に対する TGZ の作用について検討した。好塩基球分

化の指標として高親和性 IgE 受容体 ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) の発現、histamine および cytokine の産生を測定した。TGZ は KU812 細胞内部での $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の α 鎖の発現を増加させるが、細胞表面上の発現には全く影響を与えないことが分かった。TGZ は KU812 細胞による histamine 産生を抑制した。

この機構として histamine 合成酵素である histidine decarboxylase の転写レベルでの抑制が起こるためと推定された。TGZ は phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と A23187 との同時刺激によって誘導された cytokine 産生を転写レベルで抑制した。cytokine 産生抑制作用の強さは $\text{TGZ} > \text{RGZ} > \text{PGZ}$ の順であった。以上の結果を考えあわせると、TGZ は KU812 細胞の好塩基球への分化を負に調節することが推定された。これは TZDs の抗アレルギー薬としての可能性が示しているものといえるだろう。

TGZ の作用機構の検討

TGZ の作用機構を解明するため、KU812 細胞における PPAR の発現、TGZ の作用と vitamin E 骨格との関連、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ および NFAT の活性化に対する TGZ の作用について検討した。KU812 細胞では $\text{PPAR}\gamma$ の発現が検出されなかったことから、TGZ は $\text{PPAR}\gamma$ 非依存的に作用していることが推察された。一方、TGZ の作用に $\text{PPAR}\alpha$ や $\text{PPAR}\beta$ が関与している可能性が示された。TGZ は vitamin E 骨格を有しているが、TGZ の作用に vitamin E 骨格は直接的には関与していないことが示唆された。TGZ は $\text{PPAR}\gamma$ 非依存的に、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ や NFAT を介した情報伝達を阻害していることを見いだした。

以上の研究は KU812 細胞に対する TGZ の作用とその作用機構の一部を明らかにしたものである。また、TZDs の抗アレルギー薬としての可能性も示されたといえるだろう。今回用いた 3 種類の TZDs は全て細胞増殖を抑制したが、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ や NFAT の活性化抑制は TGZ でのみ観察されたことから、KU812 細胞には TZDs 共通の作用部位と $\text{NF}\kappa\text{B}$ や NFAT 活性化抑制の原因となる TGZ 特異的な作用部位が存在すると考えられる。TZDs の作用機構の全貌はまだ明らかになっておらず、今後の研究を待たなければならない。