

食細胞 NADPH oxidase 活性化を制御する 細胞内シグナル伝達経路の解析

学位論文内容の要旨

好中球は、生体内への病原微生物の侵入に対する初期の免疫応答において欠くことのできない細胞であり、NADPH oxidase に由来する活性酸素がその殺菌作用の主体であることはよく知られるところである。一方、その活性酸素の無秩序な漏出は、その反応性の高さゆえ本来守るべき生体組織をも攻撃してしまう諸刃の剣であることから、活性酸素の生成源である NADPH oxidase の活性化は厳密に制御されている必要がある。現在までの研究により、NADPH oxidase 活性化は $p47^{phox}$ のリン酸化と Rac の活性化という、二つの異なる機構により制御されていることが明かにされてきた。しかしながら、好中球の受容体刺激からこれらの事象に至る細胞内シグナル伝達経路については、さまざまな分子の関与が示唆されているものの、その全容は未だ明かではない。そこで本研究では、好中球 NADPH oxidase 活性化に関与するシグナル伝達経路、特に $p47^{phox}$ のリン酸化と Rac の活性化を導くシグナル伝達経路の詳細を明かにすることを目的として、p38 MAPK と PI3K という二つのキナーゼに着目して検討を行った。

ウシ好中球を OZ 刺激することで引き起こされる NADPH oxidase の活性化は p38 MAPK 阻害剤である SB203580 により濃度依存的に阻害された。 $p47^{phox}$ および Rac の膜移行に対する SB203580 の影響を検討したところ、 $p47^{phox}$ の膜移行は部分的にしか抑制されなかったのに対し、Rac の膜移行は完全に抑制された。このことは p38 MAPK は $p47^{phox}$ よりも Rac の調節に深く関与していることを示唆しているものと考えられた。そこで Rac の膜移行の必要条件であるその活性化に対する SB203580 の効果を検討したところ、OZ 刺激による Rac 活性化は SB203580 により完全に抑制された。また、PI3K 阻害剤もまた OZ 刺激に伴う Rac 活性化を抑制した。そこで、好中球での細胞内シグナル経路における p38 MAPK と PI3K の相互関係について調べてみたところ、PI3K は p38 MAPK の上位の活性化調節分子であることが明らかになった。

つぎに、好中球様に分化した HL-60 細胞 (dHL-60 細胞) を fMLP 刺激した際に観察される NADPH oxidase の活性化に対する PI3K 阻害剤の効果を検討したところ、NADPH oxidase 活性化は PI3K 阻害剤により濃度依存的に抑制された。fMLP 刺激により引き起こされる $p47^{phox}$ の膜移行およびリン酸化もまた PI3K 阻害剤により抑制され、PI3K が Rac 活性化のみならず $p47^{phox}$ のリン酸化のシグナル伝達に関与していることを示した。そこで PI3K から $p47^{phox}$ リン酸化に至るシグナル

伝達経路を明かにするため、Akt が PI3K によって制御され p47^{phox} のリン酸化を調節すると仮定し、その検証を行った。その結果、fMLP 刺激により Akt は活性化しその活性化は PI3K 依存性であったものの、Akt 阻害剤は fMLP 刺激による NADPH oxidase 活性化を抑制することができず、また *in vitro* において Akt は p47^{phox} をリン酸化する能力がないことが示された。したがって、上記の仮説は否定されることとなった。一方、fMLP 刺激により cPKC および PKC δ という複数のアイソタイプの PKC が活性化され、これらの PKC の活性化は PI3K により調節されていることが分かった。さらに、fMLP 刺激により PLC γ 2 が活性化され、その活性化もまた PI3K により調節されることが明かとなった。

以上の結果をまとめると、好中球 NADPH oxidase の活性化を導く細胞内シグナル伝達経路において、Rac の活性化と p47^{phox} リン酸化という二つの重要な細胞内イベントの両方に PI3K が関与していることが明かにされた。しかしながらそのメカニズムはそれぞれ異なるものであり、Rac の活性化は PI3K \sim p38 MAPK \sim Rac という経路によって制御され、また p47^{phox} のリン酸化は PI3K \sim PLC γ 2 \sim cPKC/PKC δ \sim p47^{phox} という経路によって制御されていることが示された。本研究によって得られたこれらの知見は、NADPH oxidase 活性化における新たなシグナル伝達経路の存在を示したばかりでなく、好中球のシグナル伝達経路における PI3K の重要性を強調するものであると考えられる。本研究によって得られた知見は、NADPH oxidase 活性化のメカニズムに対する分子レベルでの理解を深め、好中球のシグナル伝達分子を炎症制御の対象とする分子標的治療といった新たな炎症制御戦略の可能性に対する基礎研究として重要なものであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 稲 葉 睦
副 査 助 教 授 稲 波 修

学 位 論 文 題 名

食細胞 NADPH oxidase 活性化を制御する 細胞内シグナル伝達経路の解析

食細胞好中球は病原微生物の生体内侵入に対する初期の免疫応答細胞であり、NADPH oxidase が生成する活性酸素が殺菌作用の主役と考えられている。一方、その活性酸素は自らの組織を攻撃することもある得ることから、NADPH oxidase の活性化は厳密に調節されている。現在まで、NADPH oxidase の活性化は細胞質にあるp47^{phox}とRacがそれぞれリン酸化および活性化された後、細胞膜に移行し、NADPH oxidase の主成分と複合体を形成することにより達成されると考えられている。しかしながら、好中球の受容体刺激からp47^{phox}のリン酸化とRacの活性化に至る細胞内シグナル伝達経路については未だ不明な点が多い。本研究では好中球 NADPH oxidase 活性化に関与するp47^{phox}のリン酸化とRacの活性化を導くシグナル伝達経路を明らかにするため、受容体とこれら分子の中間に介在すると考えられているキナーゼ、PI3K(phosphoinositide-3-kinase)とp38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase)、に着目して実験を行った。

まず、単離したウシ好中球をオプソニン化ザイモザン(OZ)で刺激すると NADPH oxidase が活性化され、活性酸素が生成されること、さらにこの活性酸素生成はp38MAPKの阻害剤SB203580により抑制されることを観察した。次いで、OZ刺激によるp47^{phox}およびRacの膜移行に対するSB203580の影響を検討したところ、Racの膜移行は完全に抑制され、p47^{phox}のそれは部分的にしか抑制されなかった。この結果はp38MAPKがp47^{phox}よりもRacの膜移行に強く関与していることを示唆した。そこで、Racの膜移行の必要条件となるその活性化に対するSB203580の効果を検討したところ、Racの活性化はSB203580により完全に抑制されることが判明した。すなわち、OZ刺激を受けたウシ好中球では、Racの活性化がおり、その結果Racが膜移行し、NADPH oxidase を活性化したものと結論された。さらに、p38MAPKともう一つのキナーゼPI3Kとの関係を調べたところ、PI3K阻害剤wortmanninおよびLY294002がRacの活性化を抑制したのに対し、p38MAPK阻害剤SB203580はPI3Kを阻害しなかった。このことからPI3Kの方がp38MAPKの上位に位置する活性化調節分子であることが判明した。

一方、p47^{phox}のリン酸化については、申請者はPI3KがAktと呼ばれるセリン/トレオニンキナーゼの活性化を調節していること、p47^{phox}のリン酸化はセリン残基で起こることなどからAktがPI3Kにより調節されるp47^{phox}のキナーゼと推察し、それを証明するための実験を行った。この実験に際して、申請者は細胞として好中球様分化HL-60細胞(dHL-60)を、刺激剤として好中球走化性因子fMLPを使用した。その理由として、この細胞ではfMLP受容体からAkt活性化に至る情報伝達経路がより明確になっていたからである。一連の実験の結果から、fMLP刺激後のp47^{phox}のリン酸化および膜移行がPI3K阻害剤により抑制され、PI3KがRac活性化のみならずp47^{phox}のリン酸化のシグナル伝達にも関与していること、さらにAktの活性化もPI3K依存性であることを明らかにした。しかしながら、Akt阻害剤によりAktを阻害しても NADPH oxidase の活性化には

何ら影響は見られず、さらに セルフリー実験で活性化Aktはp47^{phox}をリン酸化しないことを見つけた。Aktに代わるp47^{phox}のキナーゼとして、申請者はPKCのアイソフォームであるcPKCおよびPKC δ が関与することを見つけ、これらもまたPI3Kにより調節されていることを証明した。

以上の結果から、好中球 NADPH oxidase 活性化の細胞内シグナル伝達において、PI3KがRac活性化とp47^{phox}リン酸化の両方を調節していることが明かにされた。しかしながら、そのメカニズムはそれぞれ異なり、Rac活性化はPI3K～p38 MAPK～Rac経路によって調節され、p47^{phox}のリン酸化はPI3K～cPKC/PKC δ ～p47^{phox}経路によって調節されていることが示された。この様に、本研究は NADPH oxidase 活性化におけるPI3Kの重要性を明らかにしたものであり、好中球のシグナル伝達分子を炎症制御の対象とする新たな分子標的治療法の可能性を示唆する貴重な知見を与えた。よって、審査員一同は、博士論文提出者山盛徹氏の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条により行う博士論文の審査に合格と認めた。