

学位論文題名

ウシ好中球および好中球様分化 HL60細胞における
PKC δ による活性酸素生成および貪食の制御

学位論文内容の要旨

好中球に代表される食細胞は、病原性微生物などの感染に対する生体防御に不可欠な殺菌機構を構成している。この殺菌機構には貪食、活性酸素の生成などが含まれる。こうした殺菌の各プロセスの無秩序な活性化は本来守るべき生体を危険に曝す可能性さえあるため、複雑な細胞内情報伝達経路によって厳密に制御されている。好中球機能を活性化に導く情報伝達経路の解明は、感染の際の炎症をコントロールする意味において非常に重要であるが、未だ全容の解明には至っていない。そこで本研究では好中球機能活性化への関与が考えられている PKC ファミリーのアイソフォームである PKC δ に着目し、活性酸素生成を担う酵素である NADPH オキシダーゼの活性化および貪食における役割について検討を行った。

OZ 刺激ウシ好中球および fMLP 刺激 dHL60 細胞の両者において、PKC δ の特異的阻害剤のロツテルリン、cPKC を抑制する GFX は NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素の生成を抑制した。オキシダーゼ活性化の引き金となる p47^{phox} の膜移行について検討を行ったところ、GFX のみが抑制効果を示し、ロツテルリンは膜移行を抑制しなかった。dHL60 細胞において検討を行った p47^{phox} のリン酸化についても同様の結果が得られた。これらの結果から cPKC はこれまで報告されているように p47^{phox} のリン酸化および膜移行を制御することにより NADPH オキシダーゼ活性化を調節するが、PKC δ はこれらとは別の経路を介してオキシダーゼの活性化に関与することが示唆された。

好中球は刺激に応じて細胞骨格をダイナミックに再構築し、細胞運動の推進力を生み出し、貪食に際しては偽足の進展や粒子の取り込みに細胞骨格構成因子のアクチンの重合が必要である。F-アクチンの形成に関しては PKC δ の関与が報告されていたが、貪食に対する関与は不明だったためウシ好中球において検討を行った。5 μ M ロツテルリンは貪食を有意に抑制したが、5 μ M GFX は抑制効果を示さなかった。また、F-アクチンの形成についてもウシ好中球および dHL60 細胞の両方の細胞において検討を行ったが、貪食での結果と同様にロツテルリンのみが両細胞において抑制効果を示した。このことから PKC δ が貪食および F-アクチン形成の制御に関与することが示唆された。

以上の結果をまとめると、異なる受容体を介する OZ および fMLP 両方の刺激において、NADPH オキシダーゼの活性化と貪食を含むアクチン細胞骨格の再構築の制御に PKC δ が関与していることが明らかにされた。また、NADPH オキシダーゼ活性化への関与の形式は cPKC のような p47^{phox}の状態を制御することによるものではないことが明らかになった。これまでに報告されている知見と併せて考えると、PKC δ による NADPH オキシダーゼ活性化の制御は、アクチン細胞骨格の制御を介したものではないかと推察される。本研究によって得られたこれらの知見は、これまでに報告されているアクチン重合だけではなく、活性酸素生成および貪食といった複数の殺菌機構における PKC δ の重要性を示すものであり、好中球機能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 藤 田 正 一
副 査 教 授 永 幡 肇
副 査 助教授 稲 波 修

学 位 論 文 題 名

ウシ好中球および好中球様分化 HL60細胞における PKC δ による活性酸素生成および食食の制御

食細胞好中球は病原性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、食食や NADPH オキシダーゼ由来活性酸素生成が殺菌作用の中核を成している。一方、無秩序な食食や過剰な活性酸素の生成は自らに危害を加える可能性があるため、その機能は複雑な細胞内情報伝達経路によって厳密に調節されている。現在まで、NADPH オキシダーゼの活性化が細胞質コンポーネント p47^{phox} のリン酸化、細胞膜への移行、オキシダーゼ本体との結合により達成されることが明らかになっている。一方、食食に関しては、アクチン骨格の再構築が粒子の取り込みに必要な運動性や形態変化をもたらしていると考えられている。この様な好中球機能の活性化に対しては、プロテインキナーゼ C(PKC)の直接的アクチベーターであるホルボールエステルを用いた研究により PKC ファミリーの関与が示唆されている。しかしながら、好中球の受容体刺激から機能活性化に至る細胞内情報伝達経路については未だ不明な点が多く、特に PKC ファamilyメンバー個々の役割についての解明が望まれている。本研究では nPKC メンバーである PKC δ に着目し、既に NADPH オキシダーゼ活性化への関与が明らかになっている cPKC と比較する形式で NADPH オキシダーゼ活性化、食食および F-アクチン形成への関与について検討を行った。

本研究において、申請者は血清オプソニン化ゼイモザン(OZ)刺激したウシ好中球ならびに走化性因子 fMLP 刺激した好中球様分化ヒト HL60(dHL60)細胞の二つの細胞系において検討を行った。その結果、両細胞において PKC δ 特異的阻害剤ロツテルリンならびに cPKC 阻害剤 GFX により NADPH オキシダーゼの活性化が抑制されることが判明した。しかしながら、p47^{phox} の膜移行については、ロツテルリンは抑制せず、GFX のみ抑制することが観察された。これらの結果から、cPKC はこれまでの報告のように p47^{phox} の活性化と膜移行を制御することにより NADPH オキシダーゼ活性化を調節することが確認された。一方、PKC δ はこれらとは別の経路を介してオキシダーゼ活性化に関与していることが示唆された。

好中球の食食に際しては、偽足の進展と粒子の取り込みに細胞骨格構成因子アクチンの重合が必要である。F-アクチンの形成に関しては PKC δ の関与が報告されているが、食食能に関しては不明である。そのため、まず食食について血清オプソニン化蛍光ビーズを用いウシ好中球にて検討したところ、ロツテルリンは食食を抑制し、GFX は抑制しなかった。次に、F-アクチンの形成について OZ 刺激後のウシ好中球および fMLP 刺激後の dHL60 の両方において検討したところ、食食での結果と同様ロツテルリンは F-アクチン形成を抑制し、GFX は抑制しなかった。以上のことから、PKC δ が食食および F-アクチン形成に関与し、cPKC の関与は無いものと判断された。

以上の結果から、異なる受容体を介する OZ および fMLP の刺激において、PKC δ が NADPH オキシダーゼ活性化と食食を含むアクチン細胞骨格の再構築の制御に関与していることが示唆された。また、PKC δ による NADPH オキシダーゼ活性化経路は、cPKC とは異なり、p47^{phox}の制御を介さないものであることが半明した。それ故、アクチン細胞骨格の制御が NADPH オキシダーゼ活性化経路にも関与している可能性が推察された。本研究で得られたこれらの知見は、アクチン重合だけではなく、食食や活性酸素生成など複数の殺菌作用における PKC δ の重要性を示すものであり、好中球のシグナル伝達分子を分子標的とする新たな炎症制御戦略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。よって、審査員一同は、博士論文提出者脇研二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。