

論文の内容の要旨

論文題目 REGULATION AND PHARMACEUTICAL POTENTIAL OF THE NF- κ B PATHWAY
 活性制御並びに薬理的応用における NF- κ B 経路の研究

氏名 山 本 友 美

【序論】

NF- κ B (nuclear factor- κ B) は 広く発現の認められる転写調節因子であり、特に免疫・炎症反応との関わりが知られている。また、NF- κ B は DNA 損傷やサイトカインに誘導されるアポトーシスの抑制に関与していることが報告されている。実際、急性炎症性疾患や悪性腫瘍において NF- κ B の活性異常が観察され、NF- κ B 経路の阻害剤が新規治療薬として注目されている。通常、NF- κ B は細胞質内で I κ B (inhibitor of NF- κ B) と結合し、不活性な状態で存在する。TNF α 、MEKK (mitogen-activated protein kinase / extra cellular signal-regulated kinase 1) または NIK (NF- κ B inducing kinase)等の様々な刺激が加わると、I κ B がリン酸化され、ユビキチン化、蛋白分解し、NF- κ B から遊離する。フリーになった NF- κ B は、核内に移行し、支配下遺伝子の発現を誘導する。この過程で、I κ B をリン酸化する酵素 IKK には、IKK α と IKK β が存在し、細胞質内で蛋白複合体を形成している。

本研究に於いて、(1) NF- κ B の活性を制御する IKK について解析し、IKK 内にて、IKK α から IKK β のカスケードの存在を示唆した、(2) NF- κ B の転写活性に影響を与えることの知られている非ステロイド系抗炎症薬が、IKK β をターゲットとしていることを発見し、その作用機序を明らかにした。

【本論】

(1) NF- κ B 経路制御における IKK α の役割

IKK には 2 種類のキナーゼ IKK α 、IKK β が存在する。IKK β は IKK α に比べ約 20~50 倍高い活性を有し、NF- κ B 経路の活性化を直接制御していると考えられている。しかしながら、IKK α の NF- κ B 経路における役割にはいまだ不明な点が多い。今回 IKK α の NF- κ B 経路制御機構について検討した。

1. TNF α 刺激による IKK α および IKK β のリン酸化

TNF α は IKK を介して NF- κ B を活性化すること、また、IKK β の活性化にはそれ自身のリン酸化が必須であることが知られている。そこで、TNF α 刺激による IKK のリン酸化について考察した。TNF α は IKK α および IKK β の両方をリン酸化した。IKK β のリン酸化は不活性型 IKK α 変異体によって抑制されたが、IKK α のリン酸化は不活性型 IKK β 変異体によって影響を受けなかった。これより TNF α 刺激は IKK α を介して IKK β をリン酸化していることが示唆された。

2. IKK α は IKK β のリン酸化を増強させる

培養細胞を用いた強制発現系で、IKK α と IKK β の相互作用について検討した。IKK β のリン酸化は IKK α によって増強したが、IKK α のリン酸化は IKK β によって変化しなかった。さらに、生化学的方法を用い、培養細胞中にて IKK α と IKK β が同一蛋白複合体内に存在することを確認し、この複合体においても、IKK α が IKK β のリン酸化を増強させることを示した。

IKK α が IKK β を基質とするか調べるため、バキュロウィルスで発現させた不活性型変異体 (IKK β (K/M)) または非リン酸化変異体 (IKK β (SS/AA)) を基質として、IKK α の活性を測定した。IKK α および活性型 IKK α (SS/EE) は IKK β (K/M)をリン酸化したが、IKK β (SS/AA) のリン酸化は観察されなかったことから、IKK α は IKK β を直接リン酸化している可能性が考えられた。

3. IKK α は IKK β 活性を増強する

IKK α による IKK β のリン酸化制御が明らかになり、それに伴い IKK β 活性が変化する可能性が考えられた。これに検討を加えるため、GST- I κ B α を基質として TNF α 刺激による IKK β の活性化を調べた。IKK β の活性化は不活性型 IKK α によって阻害されたが、IKK α の活性化は不活性型 IKK β によって影響を受けなかった。さらに、2).で示した IKK α による IKK β のリン酸化が、同酵素活性化を伴うものであることを確かめた。これらの結果より、TNF α 刺激による IKK β の活性化が IKK α を介している可能性が示された。

4. 活性化型 IKK 蛋白を用いた *in vivo* 分析

上記 IKK α による IKK β のリン酸化が最終的に NF- κ B の転写活性を制御しているか、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。活性化型 IKK α (SS/EE) および IKK β (SS/EE) は、おのおの、NF- κ B に誘起される遺伝子発現を上昇させた。不活性化型 IKK β は IKK α (SS/EE)の NF- κ B の活性化を抑制した。これは IKK α (SS/EE)が不活性化型 IKK β とヘテロダイマーを形成し、内因性 IKK β もしくは内因性 I κ B α をリン酸化できなくなったことに起因すると考えられた。これに反し、不活性化型 IKK α は IKK β (SS/EE)の活性を抑制しなかった。活性化型 IKK β (SS/EE)は IKK α によるリン酸化を必要としないため、不活性化型 IKK α によって影響を受けなかったと考えられた。

5. 結果

IKK α は IKK β のリン酸化を介してその活性を上昇させることにより、NF- κ B 経路を制御していることを示した。

(2)非ステロイド系抗炎症薬の細胞内ターゲットとしての NF- κ B 経路

アスピリン、サリチル酸、スリダク、インドメタシンなどの非ステロイド系抗炎症薬の効果は、主にシクロオキシゲナーゼ阻害に由来するプロスタグランジン合成阻害によると考えられていた。一方で、抗炎症作用のある血中濃度のアスピリンが、NF- κ B の核内移行を妨げることが報告された。そこで、NF- κ B を介したアスピリン類の抗炎症作用について検討した。

1. アスピリンおよびスリダクは NF- κ B の転写活性化を抑制する

NF- κ B の転写活性化におけるアスピリンおよびスリダク的作用を、以下の観点から検討した。アスピリン (1~5 mM)、サリチル酸 (1~5 mM)、インドメタシン (25 μ M) およびイブプロフェン (25 μ M) は臨床使用時に観察される血中濃度で使用し、スリダク (1mM) は大腸癌細胞株のアポトーシス誘導に必要な濃度で用いた。その結果、アスピリン、サリチル酸およびスリダクは TNF α 、NIK、MEKK1 または Tax 刺激によって誘導される NF- κ B の転写活性化を抑制し、さらに、NF- κ B の DNA 結合、内因性 I κ B α の蛋白分解および内因性 IKK の I κ B α に対するリン酸化活性も同様に抑制した。一方、プロスタグランジン合成阻害剤であるインドメタシンおよびイブプロフェンでは、その作用は観察されなかった。以上のことから、アスピリンおよびスリダクによる NF- κ B の転写活性化の抑制に、プロスタグランジン合成阻害以外の経路が関与すること、アスピリン、スリダクによる NF- κ B の転写活性化の抑制は IKK の活性阻害に起因することが明らかになった。

2. アスピリンおよびスリダクは大腸癌細胞株の IKK の活性を阻害する

アスピリンおよびスリダクは、抗炎症作用以外に大腸癌の進行抑制作用があることが報告されている。そこで、2種類の大腸癌細胞株（HCT-15、HT-29）を用いて、TNF α 刺激による IKK の活性化を測定したところ、アスピリンおよびスリダクは両細胞株の IKK の活性を抑制した。また、HCT-15 細胞株のアポトーシスは、アスピリンの 48 時間処理およびスリダクの 24 時間処理によって誘導された。インドメタシンは IKK の活性およびアポトーシスのいずれにも効果を示さなかった。さらに、HCT-15 細胞株はプロスタグランジンを合成しないことから、NF- κ B 経路の阻害によって導かれる大腸癌細胞株のアポトーシスは、プロスタグランジン合成に依存しないことが示唆された。

3. アスピリンおよびスリダクは IKK β の活性を特異的に阻害する

次に IKK α 、IKK β およびその活性型変異体を用いて、アスピリンおよびスリダクの IKK における特異性を検討した。アスピリン、スリダクは IKK β および IKK β 活性型変異体の活性を抑制したが、IKK α の活性は変化しなかった。また、バキューロウィルスで発現させた IKK を用いた場合でも同様の結果が得られた。これらの結果より、アスピリンおよびスリダクが IKK β の活性を特異的にかつ直接阻害していることが示された。

4. アスピリンは IKK β と結合する

アスピリンのプロスタグランジン合成阻害は、アスピリンとシクロオキシゲナーゼの共有結合に起因することが報告されている。そこで、アスピリンの IKK β との結合能を 14 C-アスピリンを用いて検討した。その結果、IKK β のみ 14 C-アスピリンに結合した。また、この結合および IKK β の IKK α に対するリン酸化活性は ATP の濃度依存的に阻害された。一方、TCA 処理した IKK β はアスピリンと結合しなかったことから、アスピリンと IKK β の結合は共有結合ではないと考えられる。

5. 結果

アスピリンは IKK β と ATP の結合を競合阻害し IKK β の活性を阻害していることを明らかにした。

【結論】

- (1) NF- κ B 活性化において IKK α が IKK β の上流に位置する可能性を示した。
- (2) NF- κ B を介した経路が、アスピリンおよびスリダクの抗炎症作用機序の一つであることを示した。