

論文の内容の要旨

論文題目

マクロファージにおける受容体依存的な PAF（血小板活性化因子）の分解

指導教官 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月 進学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 大嶋紀安

序

血小板活性化因子(PAF; 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)は血小板の活性化、白血球の活性化、気管の収縮、化学走化性、血管透過性など多くの生物活性に関与する脂質メディエーターである。PAF は炎症やアレルギー疾患などの病理学的過程において重要な役割を果たしていると考えられている。

PAF を除去する仕組みは重要であると考えられており、PAF 分解酵素の性質やその臨床応用についてこれまで精力的に研究がなされている。しかしながら、PAF が受容体に結合した後、どのような代謝を受けるかなど PAF 受容体が PAF 分解にどのような関与をしているかは十分明らかになっていない。我々の研究室で作成された PAF 受容体欠損マウスを用いてこれらを明らかにするのが本研究の目的である。

PAF 受容体欠損マウスの PAF 分解能

マウスにチオグリコレートを腹腔内注射して 3 日間放置し、腹腔マクロファージを誘導させた後、PBS で腹腔を洗浄して細胞を回収した。このようにして得られた PAF 受容体ノックアウトマウスのマクロファージは野生型マウスに比べて PAF 分解能が大きく減少していた。PAF 受容体アンタゴニスト WEB2086 (10 μ M) を用いると野生型のマクロファージの PAF 分解能はノックアウトマウスと同程度まで減少した。これらの結果はマクロファージによる PAF 分解は PAF 受容体の存在によって促進される事を示唆している。

PAF と PAF 受容体のインターナリゼーション

次に受容体に結合した後の PAF の動態について検討を行った。G-タンパク共役型受容体(GPCRs)や他の種類の受容体はリガンド刺激によってインターナライズすることが知られている。従って、我々は PAF と PAF 受容体のインターナリゼーションを調べた。マクロファージを 2 nM [*alkyl*-³H]PAF と 4°C で 1 時間、でインキュベートした後に 37°C にすることで受容体のインターナリゼーションを起こした。以前にいくつかの G-タンパク質共役受容体で報告されているように、細胞表面の受容体に結合したリガンドは酸性 pH 処理で遊離させることが出来る。従って、リガンドが受容体とともにインターナライズするとそれらは酸性洗浄に耐性の部位に移動する。実際、細胞表面の PAF-PAF 受容体複合体は、1%BSA を含む酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で効果的に洗い落とすことが出来た。0 分では細胞に結合した PAF のうちほとんど(91%)が酸性緩衝液処理で回収できた。ここで、温度を 37°C に変えると細胞に結合した PAF のうち約半分が 1 分以内に酸性の緩衝液で洗えない画分に移動する。この結果から PAF が PAF 受容体とともに素早く細胞内にインターナライズすると考えられた。

細胞を受容体のインターナリゼーションを阻害するためにコンカナバリン A、0.45 M ショ糖による高浸透圧ショック、あるいは phenylarsinoxyde 処理を行ったところ PAF のインターナリゼーションの速度は著明に減少した。特に phenylarsinoxyd あるいは 0.45 M ショ糖の処理によって PAF のインターナリゼーションはほとんど完全に阻害された。0.45 M ショ糖ではクラスリン格子の形成を阻害することによって小胞のエンドサイトーシスを阻害する。PAF 受容体のインターナリゼーションがショ糖処理によってほとんど完全に阻害されたことから、PAF 受容体はマクロファージにおいてクラスリン被覆小胞とともにインターナライズすると思われた。

受容体に結合した後の PAF 代謝

マクロファージによる PAF 受容体を介した PAF のインターナリゼーションが PAF の不活性化に重要であることを検証するために、我々は受容体に結合した後の PAF の代謝を解析した。 [*alkyl*-³H]PAF のマクロファージによる代謝産物を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分離、それぞれの代謝産物を定量した。マクロファージ内における PAF 代謝の時間経過から、一度インターナライズした PAF は最初に分解されて lyso-PAF を生じ、その後再アシル

化されて 1-alkyl-2-acyl-PC に代謝されることがわかった。20 分後以降 60 分までは、lyso-PAF の割合は約 20% で変わらなかった。PAF 分解は PAF のインターナリゼーション（半減期約 1 分）と比べると比較的遅い反応であり、PAF の半減期は約 20 分であったことから細胞内は比較的緩衝な過程と考えられた。PAF 受容体による PAF のインターナリゼーションが PAF 代謝に重要な役割を持っているかどうかを調べるために、PAF 受容体のインターナリゼーションを ConA 処理によって阻害した。このとき PAF は時間が経つと分解されるが、その速度は処理しないものに比べて顕著に減少していた。それ故、受容体に結合した PAF が細胞内に素早く取り込まれることで分解が促進されるという機構の存在が示唆された。

PAF のアセチル基の行方

マクロファージの細胞内へ [alkyl-³H]PAF がインターナライズするとほとんどの PAF は少なくとも 60 分は細胞の中に残っている。しかしながら [acetyl-³H]PAF を用いるとアセチル基由来の放射活性は細胞外の培養液中に放出された。細胞内に取り込まれた放射活性の半分が培養液中に放出されるのに約 40 分かかった。これらの現象から lyso-PAF はマクロファージの外には放出されないが PAF のアセチル基（酢酸など）はマクロファージから放出されることが示された。

PAF 分解酵素活性のマクロファージからの放出

PAF 受容体野生型と欠損型のマクロファージを PAF によって刺激したときの培養液中に放出される PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) 活性を調べた。培養液中の PAF 分解酵素活性は時間依存的に増加し、PAF 刺激によって活性が上昇することか分かった。PAF 受容体野生型のマクロファージを 2 nM または 10 nM の PAF で 30 分刺激すると PAF-AH 活性の放出が顕著に増加したが、それに対して受容体欠損型では PAF による酵素活性の増加は見られなかった。これらの結果は PAF 受容体の活性化によってマクロファージから PAF-AH が放出されることを示している。

PAF 分解酵素の検出

血漿型 PAF-AH および細胞質型 PAF-AH II のマクロファージでの発現をウェスタンブロットで検出した。この 2 つの PAF 分解酵素の発現は受容体野生型と

欠損型の間で違いがないことが示された。このことは野生型のマクロファージの PAF 分解能は WEB2086 存在下で受容体欠損型のものと同程度になることと矛盾しない結果である。それ故、野生型と欠損型のマクロファージの PAF 分解能の差は PAF-AH の発現量の違いが原因ではないと考えられた。

結語

PAF は炎症の部位で合成される。好中球や好塩基球などと同様に PAF 受容体を発現しているマクロファージは炎症性の疾患に関与している。PAF はオータコイドであり拡散しにくく限られた部位で働く。PAF-AH の放出や受容体取り込み依存的な PAF 分解は、細胞表面や細胞外空間から素早く PAF を除去するのに重要な役割を果たしていると考えられた。結論として、PAF 受容体は PAF と結合してインターナライズすることによって、また下流のシグナル伝達を介し PAF-AH の放出を促進することによって、PAF 分解を亢進することに関与していると考えられた。PAF 刺激により受容体がインターナライズし、また PAF-AH を放出する分子メカニズムはまだ明らかでなく、今後の研究課題である。