

論文内容の要旨

マスト細胞からの顆粒放出に対する“プロテインキナーゼ阻害薬” SP600125 の抑制作用とその分子機構の解析

種村 修平

〔はじめに〕

マスト細胞は、アレルギーや炎症反応で主要な働きをする細胞として知られている。抗原が細胞表面上の IgE 受容体に結合すると (抗原刺激)、細胞内にシグナルが伝わりマスト細胞は活性化される。活性化されたマスト細胞は、サイトカイン遺伝子の発現とヒスタミン等を含んだ細胞内顆粒の放出の主に 2 種の応答により炎症反応を誘導する (図 1)。最近、プロテインキナーゼの阻害薬である

SP600125 は、気管支喘息のモデルラットにおいて抗原刺激時に気管支への好酸球やリンパ球の浸潤を抑制することが報告された。マスト細胞はアレルギーや炎症時に血球細胞を組織へ誘導する作用をもつことから、SP600125 が抗原刺激時のマスト細胞機能を抑制する可能性を考え、その作用の検討と分子機構の解明が試みられた。その結果、SP600125 はマスト細胞の細胞応答を効果的に抑制すること、さらにその抑制作用は従来考えられていたプロテインキナーゼの阻害ではなく、脂質キナーゼ PI3K の δ アイソフォームを特異的に阻害した結果である可能性を見出した。

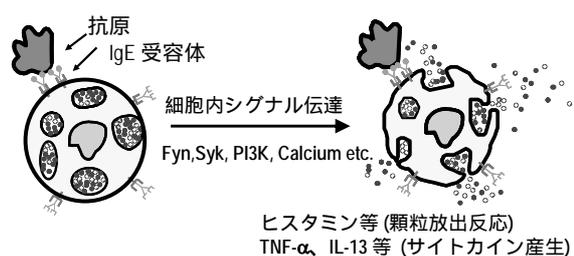


図1 抗原刺激によるマスト細胞の細胞応答

〔結果〕

1. プロテインキナーゼ阻害薬 SP600125 はマスト細胞の機能を抑制する

SP600125 はストレス応答性 MAP キナーゼである JNK を特異的に阻害することが知られている。そこで、マウス骨髄から調製したマスト細胞を用いて、マスト細胞抗原刺激時の顆粒放出に対する諸種の MAP キナーゼ阻害薬の効果を検討した。ERK 阻害薬 PD98059、p38 阻害薬 SB203580 は顕著な抑制作用を示さなかったのに対し、SP600125 はその濃度に依存して、顆粒放出をほぼ完全に抑制した (図 2)。その効果は、抗原刺激のシグナル伝達に必須な分子である脂質キナーゼ PI3K の阻害薬 LY294002 と同程度であった。次に、抗原刺激によるサイトカイン mRNA の発現に対する SP600125 の効果をノーザン法により検討した。刺激後に発現誘導される IL-6、TNF- α 、及び IL-13 は、SP600125 の濃度に依存してほぼ完全に抑制された。これも LY294002 と同程度の効果であった。以上より、SP600125 は LY294002 と同様にマスト細胞機能を効果的に抑制する阻害薬であることが示された。

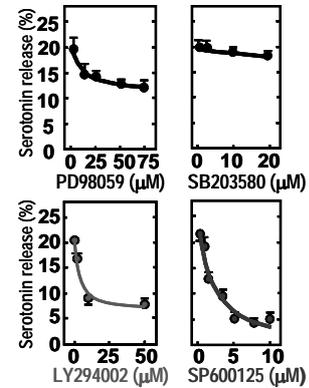


図2 顆粒放出反応に対する各種キナーゼ阻害薬の効果

2. SP600125 の阻害効果は JNK とは異なる標的因子の阻害による

以上の結果から、SP600125 の標的である JNK シグナルがマスト細胞の機能に介在すると考えられた。そこで JNK シグナルの細胞応答への関与を検討するため、抗原刺激時の顆粒放出と JNK 活性化の経時変化を比較検討した。結果、顆粒放出反応は刺激後 5 分以内にほぼ完了したのに対し、JNK の活性化は 8 分以降から観察され、両者に不一致を認めた。そこでより直接的に検討するため、JNK の活性化因子である MKK7 を欠損したマウス胎児からマスト細胞を調製し、細胞応答を検討した。MKK7 欠損マスト細胞では、JNK の活性化が選択的に抑制されていたが、抗原刺激による顆粒放出とサイトカイン産生は共に観察され、野生型との顕著な差は検出されなかった。さらに、野生型と同様に MKK7 欠損マスト細胞でも、SP600125 により顆粒放出が低下した (図 3)。以上の結果から、JNK シグナルはマスト細胞の抗原刺激による細胞応答には介在しないこと、さらに SP600125 は JNK とは別の因子を標的として細胞応答を抑制していることが示された。

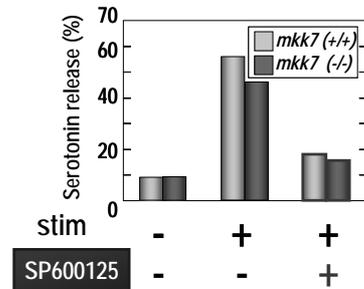


図3 MKK7欠損細胞における顆粒放出反応

3. SP600125 は PI3K シグナル系を抑制する

以上の結果を受けて、細胞応答を抑制する際に SP600125 が標的とする因子を探索した。抗原刺激時の細胞内カルシウム濃度の上昇は顆粒放出に必須であることが知られており、細胞内カルシウムの誘導試薬は、それ単独で顆粒放出を誘導できる。そこで、カルシウム誘導試薬による顆粒放出反応に対する SP600125 効果を検討した結果、SP600125 存在下、非存在下にかかわらずカルシウム誘導試薬により同程度の顆粒放出が検出された。このことから、SP600125 はカルシウムシグナル以降では

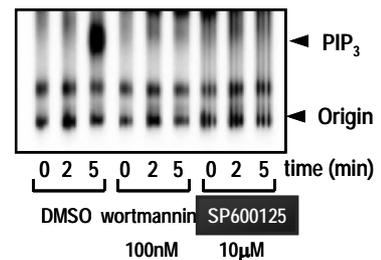


図4 PI3Kシグナルに対する SP600125の効果

なく、IgE 受容体からカルシウムシグナルに至るまでのシグナル経路に作用することが示された。

次にカルシウムシグナルの上流にあり、抗原刺激時のシグナル分子で重要な PI3K の活性化に与える影響について検討した。PI3K が産生する PIP₃ の生成量は、細胞から抽出した脂質を TLC で展開して測定した。その結果、刺激依存的に産生される PIP₃ が、PI3K の阻害薬である wortmannin と同様に、SP600125 の前処理により完全に消失した (図 4)。また、PI3K の下流の分子でもある Akt の活性化も同様に低下した。PI3K に対する阻害薬や遺伝子欠損マスト細胞を用いた研究から、PI3K の活性化はマスト細胞の細胞応答に必須であることが知られている。このため、SP600125 による細胞応答の抑制も PI3K シグナル系の抑制を介していると考えられる。

次に、SP600125 が PI3K に与える効果の刺激依存性について検討した。マスト細胞を、抗原、IL-3、stem cell factor、アデノシンでそれぞれ刺激した時の PI3K の活性化に与える SP600125 の影響について Akt の活性を指標に検討した結果、アデノシン刺激においてのみ、SP600125 による顕著な抑制効果は認められなかった (図 5)。アデノシンは GPCR 系のシグナル伝達経路を用いて下流にシグナルを伝えるのに対して、他の刺激はチロシンキナーゼ系のシグナル伝達経路を用いる。したがって、SP600125 はチロシンキナーゼ系の経路を阻害することにより PI3K シグナルを抑制していると考えられた。

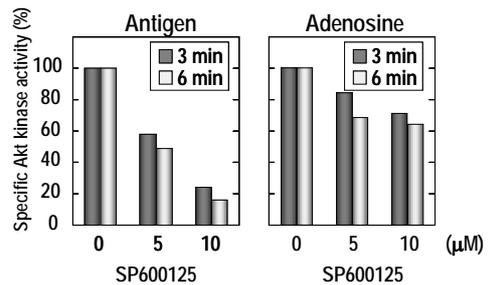


図5 抗原刺激時とアデノシン刺激時の PI3Kシグナルに対するSP600125の効果

4 . SP600125 は PI3Kδアイソフォームを特異的に抑制する

抗原刺激時に、IgE 受容体直下ではたらくチロシンキナーゼとして、Syk と Src 系キナーゼの Fyn や Lyn が知られている。また、マスト細胞の機能を効果的に抑制する阻害薬の多くは、これらの分子を阻害することが知られている。このため、Syk、Fyn、Lyn の活性化に対する SP600125 の効果を検討したが、顕著な抑制効果は見出されなかった。

次に、チロシンキナーゼ系のシグナル伝達系で PI3K と直接結合して活性化を調節する Gab2 について検討した。Gab2 は刺激時に、上流のチロシンキナーゼによってリン酸化されて PI3K と結合することが知られている。そこで、PI3K と Gab2 の結合量で活性化状態を検討したところ、上流の Src ファミリーの阻害薬である PP2 では Gab2 の活性化が完全に消失したのに対して、SP600125 処理では抑制されなかった。すなわち、SP600125 は受容体から Gab2 の活性化に至るシグナル系には作用していないことが示唆された。

さらに、SP600125 が直接 PI3K のキナーゼ活性に対して与える影響について検討した。PI3K は制御サブユニットと触媒サブユニットのヘテロダイマー構造をとることが知られている。キナーゼ活性を担う触媒サブユニット p110 の中で、チロシンキナーゼ系のシグナルを伝えるアイソフォームとして α, β, δ の 3 種類が知られている。p110α, β は多くの組織に共通して存在するが、p110δ の発現は血球系細胞に特異的で、マスト細胞の細胞応答に重要な働きをすることが最近報告されている。そこで、SP600125 が p110α と p110δ の脂質キナーゼ活性に直接与える影響を in vitro で検討した結果、p110α を阻害することな

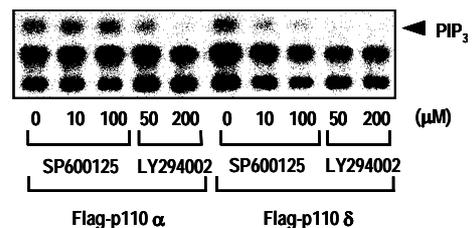


図6 PI3Kの各アイソフォームの脂質キナーゼ活性に直接与える SP600125の効果

く、p110 δ のキナーゼ活性を顕著に阻害した (図 6)。この結果から、SP600125 は p110 δ をアイソフォーム特異的に阻害することにより、抗原刺激時のマスト細胞の機能を抑制していると考えられる。

〔まとめ〕

本研究から、1) SP600125 がマスト細胞での抗原刺激時の細胞応答を顕著に抑制し、2) SP600125 の効果が従来考えられた JNK 経路の抑制とは独立した効果であることが見出された。さらに、3) SP600125 の抑制効果は LY294002 と同様に PI3K 経路の抑制にあり、4) その効果は PI3K の δ アイソフォームを特異的に阻害した結果であることが示された (図 7)。

SP600125 は JNK の阻害剤として幅広く用いられており、現在までに 500 報以上の論文で使用されている。しかしながら、今回の結果から JNK の阻害を目的として SP600125 を用いる際には、過剰発現やノックダウンなどの実験系も併せて JNK の関与を判断すべきであると考えられる。特に PI3K δ アイソフォームを特異的に発現している血球系細胞においては JNK の阻害薬としての SP600125 の使用は慎重に判断すべきである。また、PI3K の各種アイソフォーム間における使い分けに関しては不明な点が多いのが現状である。最近の報告で p110 δ の遺伝子に変異を入れたマウスでは、マスト細胞において PI3K シグナルと細胞機能が顕著に低下することが示されており、今回の結果はこれを支持するものである。また、SP600125 を改変することにより PI3K δ アイソフォームのみに働く阻害薬が得られ、アイソフォーム間の使い分けに関して新たな知見が得られる可能性がある。

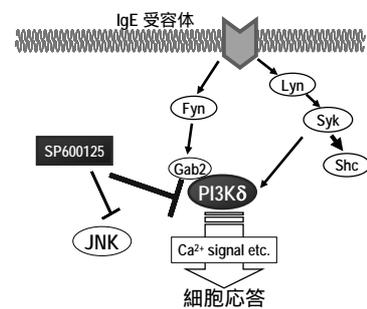


図7 SP600125の作用機序