

## 審査結果の要旨

氏名 種村 修平

マスト細胞は、アレルギーや炎症反応において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という、主に 2 種の応答により炎症反応を誘導する。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による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が考えられた。「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」と題する本論文において、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  $\delta$  アイソフォームを特異的に阻害した結果であるという知見を得ている。

### 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

マスト細胞からの抗原刺激による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。この抑制効果は、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- $\alpha$ 、及び IL-13 は、SP600125 の濃度に依存してほぼ完全に抑制された。この抑制効果も LY294002 と同程度であった。以上より、SP600125 は LY294002 と同様にマスト細胞の機能を効果的に抑制する阻害薬であることが示された。

### 2. SP600125 は JNK とは異なる標的に作用してマスト細胞の機能を抑制する

SP600125 の標的として知られている 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。その結果、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。さらに、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見出されなかった。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。

### 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 SP600125 の新しい標的因子を探索した。抗原刺激による顆粒放出に細胞内カルシウム濃度の上昇は必須であり、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。その結果、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認められた。このことから、SP600125 はカルシウムシグナル以降ではなく、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唆された。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。その結果、刺激に依存して PI3K により産生される PIP<sub>3</sub> が、PI3K の阻害剤である wortmannin と同様に、SP600125 の前処理により完全に消失した。また、PI3K の下流の分子である Akt の活性化も同様に低下した。PI3K に対する阻害剤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すると考えられた。

#### 4. SP600125 は PI3K $\delta$ アイソフォームを特異的に抑制する

抗原刺激時に、IgE 受容体の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剤の多くは、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。上流の Src ファミリーの阻害剤である 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 IgE 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。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  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  の 3 種が知られている。p110  $\alpha$ 、 $\beta$  は多くの組織に共通して存在するが、p110  $\delta$  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指摘されている。そこで、SP600125 が p110  $\alpha$  と p110  $\delta$  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、p110  $\alpha$  を阻害することなく、p110  $\delta$  のキナーゼ活性を顕著に阻害した。以上の結果から、SP600125 は p110  $\delta$  のアイソフォームを特異的に阻害することにより、抗原刺激によるマスト細胞の活性化を抑制することが示された。

本研究から、マスト細胞における SP600125 の作用機序について、次のような結果が得られた。1) SP600125 はマスト細胞での抗原刺激による細胞応答を顕著に抑制する。2) この抑制効果は従来考えられたプロテインキナーゼ JNK 経路の抑制とは独立した機序による。3) SP600125 の抑制効果は LY294002 と同様に PI3K 経路の抑制にある。4) SP600125 は PI3K の  $\delta$  アイソフォームを特異的に阻害する。本論文の結果は、JNK 阻害薬として汎用されている SP600125 の抑制作用の解釈には注意が必要であること、さらに SP600125 及びその改変体が PI3K の各種アイソフォームに対して特異的な阻害薬となり得る可能性を提示している。以上を要するに、本論文はマスト細胞における抗原刺激後のシグナル伝達機構について有用な情報を提供しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。