

[論文の内容の要旨]

論文題目 **Lipid mediators in neuroimmune functions**

和訳 脂質メディエーターの神経免疫機能

指導教員 清水孝雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

木原泰行

脂質メディエーターは血小板活性化因子（PAF）やプロスタグランジンなどの総称で、刺激に応じて産生され細胞間・細胞内シグナル伝達に重要な役割を担う。これらの脂質メディエーターが生理現象のみならず種々の疾患に機能していることが最近では次々と明らかとなってきた。しかしながら、脂質メディエーターの神経免疫機能に関する知見はまだ非常に少ない。多発性硬化症（MS）は中枢神経系を侵す炎症性脱髄疾患である。欧米諸国における有病率が高いが、日本では稀な疾患のため特定疾患に指定されている。四肢の麻痺や視力障害などを主徴とし、再発と寛解を繰り返す。多発性硬化症の発症原因には不明な点が残されており、現時点では根治療法はない。現在、治療に用いられているインターフェロン β は長期予後を改善するものの、副作用などの問題点も残されており、新たな治療法の開発は発症原因の解明とともに重要な課題である。MSの病態は動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）を用いて詳細に解析され、CD4 陽性 T 細胞の Th1 反応が病態に深く関わっていると考えられてきた。しかしながら、近年、インターロイキン 17 産生 CD4 陽性 T 細胞（Th17）が発見され、両者の機能連関が病態に深く関与して

いると考えられるようになってきた。本研究では、神経免疫疾患の一つである MS の病態解明及び新規治療法の開発を目的とし、C57BL/6 の遺伝的背景を有する野生型マウスと脂質メディエーター受容体欠損マウスにミエリン特異的タンパク質抗原 (MOG) のペプチド断片を用いて EAE を誘導し、脂質メディエーターの役割を解析した。本研究は 1) PAF 受容体欠損マウスを用いた解析、2) EAE 病巣部における PAF 産生と分解機構の解明、3) EAE 病巣部におけるアラキドン酸カスケードの役割解析、の 3 つに大別される。

1) EAE における PAF/PAFR の役割解析 ～PAF 受容体欠損マウスを用いて～

MS 患者の脳脊髄液中における PAF 量の上昇、病巣部での PAF 受容体発現量の亢進などが報告されていたことから、PAF の MS における関与が示唆されたため、EAE を用いて PAF の役割解析を試みた。その結果、MS と同様に、野生型 C57BL/6 マウス脊髄病巣部における PAF 量と PAF 受容体発現量が EAE の臨床症状と相関して推移していることを明らかにした。また、EAE を誘導した PAF 受容体欠損マウスは野生型マウスに比べて臨床スコアの上昇と体重低下が有意に抑制されていること、組織学的観察により脱髄・炎症の程度も軽減していることを明らかにした。また、PAF 受容体欠損マウスは発症率が有意に低く、脊髄中のサイトカイン・ケモカイン類の mRNA 発現量も低いことが、マイクロアレイ解析により明らかとなった。EAE に密接に関係する炎症細胞である T 細胞及びマクロファージの機能を解析した結果、PAF は T 細胞の Th1 反応に影響を与えなかったが、マクロファージに対しては貪食能及びそれに伴う TNF- α の産生量を増進させることを見出した。以上の結果から、PAF が EAE の発症と症状の両方に大きな影響を与えることが示唆され、PAF は (i) 発症直前において脊髄病変局所におけるサイトカイン・ケモカイン類の産生を亢進することで発症のスイッチを on に傾ける方向に作用すること、(ii) 発症後においては、マクロファージの貪食能を亢進させることによって脱髄の亢進及び緩解の阻止を行うこと、の 2 つの役割を持つことが考えられた。

Kihara, Y., Ishii, S., Kita, Y., Toda, A., Shimada, A., and Shimizu, T.

Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor

Journal of Experimental Medicine (2005) 202; 853-863

2) EAE における細胞質型ホスホリパーゼ A2 α と PAF 合成酵素の関与

1) の研究により、EAE の脊髄病巣部における PAF 上昇が明らかとなった。炎症時における PAF 産生は PAF の前駆物質である LysoPAF を供給する細胞質型ホスホリパーゼ A2 α (cPLA2 α) と LysoPAF にアセチル基を転移する PAF 合成酵素が関与していることが知られており、PAF 合成酵素は最近当研究室でクローニングされた (J.B.C., 282, 6532, Shindou et al.)。そこで、EAE 病巣部におけるこれらの酵素の関与を解析した。脊髄中における cPLA2 α の発現量と酵素活性が、EAE の臨床症状と相関して推移していることを明らかとした。PAF 合成酵素の発現と酵素活性もまた EAE の臨床症状と相関して推移した。さらに、cPLA2 α 活性と PAF 合成酵素活性も強く相関していることを示した。しかしながら、PAF 分解酵素活性は EAE の臨床症状に関わらず一定の値を示した。PAF 合成酵素はミクログリアとアストロサイトに発現が認められたことから、これらの細胞及び浸潤したマクロファージに存在する細胞質型ホスホリパーゼ A2 α と LysoPAFAT が、EAE の病巣部における PAF 産生の本態であることが示唆された。

Kihara, Y., Yanagida, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, S., Ishii, S., and Shimizu, T.

Platelet-Activating Factor Production in the Spinal Cord of Experimental Allergic Encephalomyelitis Mice via the Group IVA Cytosolic PLA₂-LysoPAFAT Axis

投稿中

3) EAE におけるエイコサノイドの役割解析

当研究室では、アラキドン酸カスケードにおいて重要な酵素である cPLA2 α が EAE において重要な働きをしていることを報告した (J.E.M., 202, 841, Marusic et al.)。この報告から、cPLA2 α によって主に産生されるプロスタグランジン類、ロイコトリエン類 (エイコサノイド) などがこの疾患に深く関与していることが考えられるが、これらのエイコサノイドがどのように関与しているかを解析した研究はほとんどない。そこで、各エイコサノイドを脊髄病巣部において一斉定量し、エイコサノイドの関与を解析した。ナীবマウスの脊髄中には測定したエイコサノイドの全てが検出され、脊髄で恒常的にアラキドン酸カスケードが機能していることが明らかとなった。また、ナীবマウスの脊髄中には PGD₂ が豊富に存在していた。EAE 誘導後、脊髄では発症直前から慢性期まで継続して 5-リポキシゲナーゼ (5-LO) 代謝産物含量の低下が認められた。シクロオキシゲナーゼ (COX) 代謝産物については、急性期に PGD₂ 及び PGI₂ 含量が減少する一方で、

PGE₂が脊髄でもっとも豊富に存在するエイコサノイドとなることが示された。また、これらの脂質を産生する酵素群の発現量は、おおむね代謝産物量と同様の変動を示したが、5-LO 代謝経路の酵素と受容体の遺伝子発現は代謝産物量の低下と相反して急性期に劇的に上昇していた。もっとも発現変動が劇的であったロイコトリエン B4 第一受容体に着目し、同受容体欠損マウスに EAE を誘導すると、発症が遅延し、症状が軽減していることが明らかとなった。エイコサノイドを産生するアラキドン酸カスケードは EAE 病巣部において代謝産物レベルでも、遺伝子レベルでも歪みを生じており、包括的なアラキドン酸カスケードのコントロールが病態の軽減につながる可能性を見出した。

Kihara, Y. et al.

投稿準備中