

審査の結果の要旨

氏名 垂井 愛

本研究は、喘息やアナフィラキシーショック、急性呼吸窮迫症候群、敗血症など様々な疾患に関与することが知られている生理活性脂質、血小板活性化因子 (platelet-activating factor : PAF) の生合成酵素 (LPCAT2) に対する阻害剤を探索することで、これらの疾患に対する治療薬開発を考えたものである。約17万4千化合物をスクリーニング (1次~9次) し、下記の結果を得ている。

1. ヒト型 (h) LPCAT2を、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-S細胞に強制発現させて得られた膜画分を用い、ハイスループットスクリーニング法にて、約17万4千の化合物から、hLPCAT2のPAF生合成活性を阻害する1,796化合物を得た。1次スクリーニング
2. CHO-S細胞にhLPCAT2または恒常的にPAFおよびdipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) を生合成する類似酵素 (hLPCAT1) を強制発現させて得られた膜画分を用いたプレートアッセイおよびLC-MS/MSによる測定を行い、1,796化合物から、hLPCAT1の生合成活性は阻害せず、hLPCAT2によるPAF生合成活性を阻害する、32化合物を得た。2-5次スクリーニング
3. そのうちの13化合物は、BSA添加アッセイにて、0.4% BSA存在下でもhLPCAT2によるPAF生合成活性を阻害可能であったため、血中においても作用できる可能性が示された。6次スクリーニング
4. マウスのマクロファージ系の培養細胞であるRAW264.7細胞を用いて、細胞毒性試験を行った。13化合物のうち10化合物には細胞毒性が認められなかった。7次スクリーニング
5. CHO-S細胞にhLPCAT1、hLPCAT2とマウス型 (m) LPCAT1およびmLPCAT2を強制発現させて得られた膜画分を用いた試験管アッセイにて、10化合物は全て、マウス型酵素 (mLPCAT1およびmLPCAT2) による生合成活性も、ヒト型酵素 (hLPCAT1とhLPCAT2) の生合成活性とほぼ同様に阻害することが示された。8次スクリーニング
6. mLPCAT2を過剰発現させたRAW264.7細胞を用い、カルシウムイオノフォア (A23187) 刺激にて生合成されるPAFおよびその基質であるlyso-PAFを測定したところ、PAF生合成を阻害し、lyso-PAF濃度を上昇させる化合物、MMI-12を発見した。このMMI-12は、mLPCAT2によるPAF生合成を阻害した結果、PAF濃度を低下させ、その基質であるlyso-PAF濃度を上昇させた。また、MMI-12は、LPCAT1の酵素活性およびLPCAT2の

alkyl-PC生合成活性の阻害効果は弱く、LPCAT2のPAF生合成活性を強く阻害する化合物であることが、CHO-S細胞に酵素を強制発現させて得られた膜画分を用いた試験管アッセイにて示された。9次スクリーニング

以上、本論文は約17万4千の化合物ライブラリーを用いて、炎症時に働くPAF生合成酵素であるLPCAT2によるPAF生合成活性のみを選択的に阻害する化合物、MMI-12を同定した。本研究は、PAF関連疾患の治療薬開発だけでなく、LPCAT1によるPAF生合成の生体内における意義や、炎症時のLPCAT2によるPC生合成活性化の役割の解明にも重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。