

氏名 西岡弘晶  
 学位(専攻分野) 博士(医学)  
 学位記番号 医博第2223号  
 学位授与の日付 平成12年3月23日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
 研究科・専攻 医学研究科内科系専攻  
 学位論文題目 Lysophosphatidylcholine generates superoxide anions through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in human neutrophils.  
 (リゾホスファチジルコリンによるPI3キナーゼを介した好中球活性酸素産生機構に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 光山正雄 教授 日合弘 教授 北徹

### 論文内容の要旨

好中球やマクロファージは、NADPH オキシダーゼを有し、種々の刺激で活性酸素 (superoxide anion:  $O_2 \cdot -$ ) を産生し、微生物を殺菌する。これは、respiratory burst と呼ばれ、生体防御に必須である。この系に異常を持つ慢性肉芽腫症の患者は、重篤な感染症を繰り返す。

これまで好中球の  $O_2 \cdot -$  産生は、 $O_2 \cdot -$  産生刺激物質として protein kinase C (PKC) 刺激剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) や、細菌の走化性ペプチドである formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 等を用いて解析され、PKC と phosphatidylinositol 3 (PI3) キナーゼが関与するとされてきた。そして、PMA の刺激は PKC インヒビターで抑制されるが PI3 キナーゼインヒビターでは抑制されず、fMLP の刺激は両方のインヒビターで抑制されることより、PI3 キナーゼが PKC の上流にあると考えられてきた。

リゾホスファチジルコリン (LPC) は、様々な生理活性をもつリン脂質である。炎症部位で LPC は、分泌されるホスホリパーゼ A2 の作用によりホスファチジルコリン (PC) から生成され、局所濃度が高くなっている。また LPC は、動脈硬化を引き起こす酸化低比重リポ蛋白質 (LDL) 内で著増している。

本研究では、LPC が好中球を刺激して  $O_2 \cdot -$  を産生させること、その経路は PI3 キナーゼの活性化を介し PKC の活性化を介さないことを明らかにした。PMA や fMLP の刺激は PKC の活性化を介しており、それらとは異なるユニークな情報伝達経路であった。また本研究は、LPC と PI3 キナーゼの活性化を結びつけた初めての知見である。

好中球が産生する  $O_2 \cdot -$  は、チトクローム C 還元法と蛍光物質ルシゲニンを用いた FACS 法により測定した。

LPC による好中球の  $O_2 \cdot -$  産生は、濃度・時間依存的で、LPC 濃度が  $10 \sim 15 \mu M$  で最高値となった。リゾホスファチジン酸や PC では好中球の  $O_2 \cdot -$  産生はなく、リン脂質の中では LPC に特異的と思われた。

LPC による  $O_2 \cdot -$  産生は、PI3 キナーゼインヒビターである wortmannin や LY 294002 で著明に抑制されたが、PKC インヒビターでは抑制されなかった。PMA や fMLP の刺激は PKC インヒビターで抑制されるので、LPC の刺激は PMA や fMLP とは異なる経路を介すると考えられた。

放射性同位元素を用いて、LPC の刺激で実際に好中球の PI3 キナーゼが活性化されることも示した。この活性化の程度も LPC の濃度依存的で、 $10 \mu M$  で最高値となった。

平滑筋細胞では、LPC が細胞膜に小さな穴をあけ Ca イオンが細胞内に流入し、 $O_2 \cdot -$  産生が起こるとされているが、本研究では反応液中に Ca イオンはなく、更に EDTA を加えても影響がなかった。これより、LPC による  $O_2 \cdot -$  産生は、好中球内への Ca イオンの流入によるものではないと考えられた。

炎症部位では LPC の局所濃度が高くなっており、それが好中球を刺激し  $O_2 \cdot -$  を産生させ、生体防御に関与している可

能性が考えられた。また、酸化 LDL がマクロファージの PI3 キナーゼを活性化することが報告されているが、本研究の好中球での結果から推察すると、この現象にも酸化 LDL 中で著増している LPC が関与しているかもしれない。

今後の研究によって、LPC が PI3 キナーゼを活性化する機序、PI3 キナーゼから NADPH オキシダーゼに至る情報伝達経路も明らかにしうると期待している。

### 論文審査の結果の要旨

リン脂質リゾホスファチジルコリン (LPC) は、炎症部位でその局所濃度が高くなっていること、動脈硬化を引き起こす酸化 LDL 内で著増していることが知られている。申請者は、LPC が好中球を刺激して活性酸素 ( $O_2 \cdot -$ ) を産生させ、その経路は phosphatidylinositol 3 (PI3) キナーゼの活性化を介し、protein kinase C (PKC) の活性化を介さないことを明らかにした。

従来より PKC 刺激剤である PMA や細菌の走化性ペプチドである fMLP 等の刺激で好中球の  $O_2 \cdot -$  産生は解析され、PKC と PI3 キナーゼが重要であり、更にインヒビターを用いた解析より情報伝達において、PI3 キナーゼが PKC の上流にあると考えられてきた。

申請者は本研究において、LPC が好中球で PI3 キナーゼを活性化し、 $O_2 \cdot -$  を産生することを見だし、LPC の刺激では PKC の活性化があまり重要ではないことを見いだした。これは、従来より報告されている経路とは異なるユニークな情報伝達経路である。また本研究は、LPC と PI3 キナーゼの活性化を結びつけた初めての知見でもある。

本研究成果から申請者は、炎症部位において増加している LPC が好中球を刺激し、 $O_2 \cdot -$  を産生させ微生物を殺菌し、生体防御に関与している可能性があるかと推測した。

以上の研究は、炎症部位における生体防御機構の解明、及び、動脈硬化の成立機構の解明に貢献し、医学、生物学の進歩に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。