

氏 名	やま がみ しん すけ 山 上 伸 介
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 626 号
学位授与の日付	平 成 12 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	単球遊走性ケモカインおよび受容体に関する分子生物学的研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 河 合 明 彦 教 授 川 崎 敏 祐 教 授 佐 藤 公 道

論 文 内 容 の 要 旨

序 論

ケモカインと総称される互いに相同性のある蛋白性因子群は、白血球に対し遊走活性を示し、構造上の特徴と標的細胞に対する特異性から数種のサブファミリーに分類される。CCケモカインファミリーに属するMonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)は、単球/マクロファージに対して選択性の高い遊走因子である。単球/マクロファージの遊走を制御する新規作用機序の薬剤を創製する目的で、その分子標的としてMCP-1およびその受容体に着目した。その理由として、第一に、*in vitro* 活性においてMCP-1が最も強力に単球選択的であること、第二に、単球/マクロファージ浸潤を伴う炎症性疾患においてMCP-1の発現亢進が認められ病態への関与が示唆されていること、第三に、白血球遊走因子の受容体に関する既報から、7回膜貫通型受容体に属すると推察されるMCP-1受容体を分子標的とした低分子性薬剤を取得する可能性が考えられたことがある。本研究では、まずMCP-1とマクロファージ浸潤の関連性を明確に解析した疾患モデルを確立すること、次に分子標的であるMCP-1受容体を単離し構造および機能を解析し、その成果に基づき創薬研究のための評価系を構築することを試みた。

第1章 脳梗塞モデルにおけるMCP-1蛋白の発現と白血球浸潤における意義

マクロファージ浸潤を伴う炎症性疾患として脳梗塞を一例にとり、その疾患モデル(ラット一過性虚血再灌流モデル)におけるMCP-1とマクロファージ浸潤の関連性を明確にするために、以下の検討を実施した。まず虚血後の脳組織抽出液中のMCP-1および対照として好中球遊走性ケモカインCINC濃度を酵素免疫測定法により定量して、梗塞巣における各蛋白産生の経時変化を解析した。その結果、虚血2日後をピークに、生物活性を示すために十分な局所濃度に達するMCP-1蛋白量を検出した。一方CINC蛋白の産生は明らかにMCP-1より早期(6時間がピーク)にみられた。次に免疫染色法により、当モデルでの梗塞巣への白血球浸潤パターンすなわち初期(1から3日後)に好中球、後期(2から7日後)にマクロファージ浸潤を認めることを確認した。以上の結果から、梗塞巣へのマクロファージ浸潤におけるMCP-1の重要性が示唆された。

第2章 MCP-1受容体cDNAの単離同定および機能的発現

上述の脳梗塞モデルおよびMCP-1の関与が予想される他の疾患モデルにおいて、病態形成に及ぼすMCP-1の真の役割を解明するためには、MCP-1と受容体の相互作用を分子レベルで解明していくことが重要である。その第一歩として、MCP-1の作用を制御する分子標的として最重要と考えたMCP-1受容体の構造と機能を解明する目的で、cDNAのクローニングを試行した。まず既知の白血球遊走因子の受容体と相同性の高いDNA断片を得るために、IL-8とfMLP受容体間で保存性の高い膜貫通領域部分に基づき設計した混合プライマーを用いて、末梢単球由来cDNAをPCR増幅後に部分塩基配列を解析した。その結果、既知のケモカイン受容体と相同性の高いDNA断片を取得した。次にこの断片をプローブとして単球系細胞THP-1由来のcDNAライブラリーをスクリーニングして約2.2 kbのcDNAを単離した。塩基配列を決定したところ、このcDNAは360アミノ酸残基の7回膜貫通型受容体様の新規な蛋白をコードしていた。

この蛋白がMCP-1受容体である可能性を検証するために、遺伝子導入したヒト腎293細胞に対してMCP-1が惹起する

細胞内カルシウムイオン濃度変化を測定した。その結果、添加した MCP-1 濃度依存的に増強する反応を認めた。従ってこの cDNA がコードする蛋白は、MCP-1 受容体として機能することが判明した。また同時期に Charo らがツメガエル卵母細胞を用いた探索法により単離した MCP-1 受容体 (CCR 2 b) とは、アミノ酸配列レベルで完全な一致を認めている。

第3章 MCP-1 受容体のリガンド選択性の解析

MCP-2 および MCP-3 は、MCP-1 と構造および機能共に近似したケモカインである。MCP-3 は MCP-1 受容体 (CCR 2 b) のリガンドになるが、MCP-2 はリガンドとならないとの報告があった。そこで MCP-1 受容体のリガンド選択性を再検証する目的で、MCP-2 の MCP-1 受容体に対するシグナル伝達能を検討した。第2章にて確立した細胞内カルシウムイオン濃度測定系において、低濃度 (4 nM) の MCP-2 は、同濃度の MCP-1 と同等の作用を示した。さらに当受容体は抑制性 G 蛋白と共役していることからアデニル酸シクラーゼ活性を測定した結果、MCP-2 による活性阻害作用を認めた。以上の結果から、MCP-2 も生理的に意義のある濃度において MCP-1 受容体のリガンドとして作用することが判明した。従って、MCP-1 受容体に作用する薬剤により、MCP-2 も含む単球遊走性ケモカインの作用を制御できる可能性が示唆される。

総括

選択的に単球 / マクロファージの浸潤を調節する薬剤の創製を目標として、その分子標的として着目した単球遊走性ケモカインの受容体を単離して構造と機能を詳細に解析した。今後、この研究の過程において構築した評価系により探索される薬剤について、疾患モデル等での薬効を検証し開発研究につなげていきたい。

論文審査の結果の要旨

著者は、ケモカインと総称される互いに相同性のある蛋白質性の白血球遊走因子のうち、単球・マクロファージに対する遊走因子として知られる Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) およびその受容体について解析した。MCP-1 については、in vitro 活性において MCP-1 が最も強力に単球選択的であること、単球・マクロファージ浸潤を伴ういくつかの炎症性疾患において MCP-1 の発現亢進が認められ病態への関与が示唆されていること、さらに、白血球遊走因子間の構造的類似性の観点から、MCP-1 受容体が他の白血球遊走因子の受容体と同様に 7 回膜貫通型受容体に属すると推察された。以上の理由から、本研究では、特に MCP-1 受容体に関する詳細な解析を行うことにより MCP-1 受容体を分子標的とした低分子性薬剤の開発や、単球・マクロファージの働きの制御を目的として、まず MCP-1 とマクロファージ浸潤の関連性を明らかにした疾患モデルを確立すること、および分子標的である MCP-1 受容体の cDNA を単離し創薬研究のための評価系を構築することを試みた。

第1章では、マクロファージ浸潤を伴う炎症性疾患の一つとして脳梗塞を例にとり、一過性虚血再灌流ラットを疾患モデルとして、虚血後の脳組織を詳細に調べた。すなわち、免疫染色法により調べた梗塞巣への白血球浸潤パターンから、初期 (1 から 3 日後) には好中球、後期 (2 から 7 日後) にはマクロファージの浸潤を認め、また、抽出液中の MCP-1 および対照として好中球遊走性ケモカイン CINC の濃度を酵素免疫法により経時的に測定し、虚血 2 日後をピークとして、生物活性を示すために十分な局所濃度の MCP-1 を検出し、一方 MCP-1 より早期 (6 時間がピーク) に CINC の産生がみられ、脳梗塞巣における MCP-1 の発現とマクロファージ浸潤の関連性が明確となった。

前章の脳梗塞モデルのように、マクロファージの関与が予想される病態形成における MCP-1 の真の役割を解明するためには、MCP-1 とその受容体の相互作用を分子レベルで詳細に解析することが必要である。第2章では、その第一歩として、MCP-1 受容体 cDNA の単離、および機能的発現を試みた。MCP-1 受容体の cDNA のクローニングには、既知の他の白血球遊走因子の受容体間で保存性の高い膜貫通領域部分を PCR 増幅して得た DNA 断片をプローブとして、単球系細胞 THP-1 由来の cDNA ライブラリーから約 2.2 kb の cDNA を得た。塩基配列から 360 アミノ酸残基から成る 7 回膜貫通型受容体様の新規な蛋白をコードすることが推測されたので、この cDNA をヒト腎 293 細胞に導入したところ、MCP-1 の添加濃度に依存して細胞内カルシウムイオン濃度の変化が認められ、cDNA がコードする蛋白が MCP-1 受容体として働くことが分かった。なお、同時期に Charo らがツメガエル卵母細胞を用いた探索により得た MCP-1 受容体 (CCR 2 b) とはアミノ酸レベルで完全に一致した。

第3章では、さらに MCP-1 受容体 cDNA の発現系を用いて、MCP-1 受容体のリガンド選択性を解析した。まず、MCP-1 と構造・機能の類似するケモカイン MCP-2 および MCP-3 のうち、MCP-3 は MCP-1 受容体のリガンドになるが、

MCP-2 はリガンドとならないという報告があり、著者は前章で確立した細胞内カルシウムイオン濃度測定系を用いて、MCP-1 受容体のリガンド選択性を再検証した。その結果、MCP-2 は低濃度（4 nM）でも MCP-1 と同等の作用を示し、またアデニル酸シクラーゼに対する MCP-2 の阻害活性が認められて抑制性 G 蛋白との共役が示唆され、MCP-2 が生理的に意義のある濃度で MCP-1 受容体のリガンドとして作用することを明らかにした。

以上のように、著者は単球・マクロファージ遊走性ケモカイン MCP-1 の受容体 cDNA を単離し、その発現系を用いたケモカイン評価系を作成して、リガンドー受容体の作用特異性を明らかにした。今後この評価系を用いることにより、MCP-1 受容体に作用する薬剤の評価や、単球遊走性ケモカインの作用の制御の試みが可能となり、単球・マクロファージの浸潤を選択的に調節する薬剤の創製を目標とした開発研究に役立つことが期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。さらに、平成 12 年 1 月 7 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。