

|             |   |
|-------------|---|
| 氏 名         | もりおか やすひで<br><b>森 岡 靖 英</b>                       |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (学 術)   |
| 学 位 記 番 号   | 博 乙 第 107 号                                       |
| 学位授与の日付     | 平成 13 年 11 月 26 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 | <b>X 型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の病態生化学的研究</b><br>(主査) |
| 審 査 委 員     | 教 授 小田耕平<br>教 授 宗川吉汪      教 授 伊倉宏司                |

## 論文内容の要旨

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) は、食物中のリン脂質の消化、あるいは生体膜リン脂質の新生、代謝などに関与すると共に、アラキドン酸カスケードの開始酵素として機能することにより生体の機能維持に深く関与している酵素である。

近年、遺伝子解析技術の向上とゲノム情報の急速な蓄積に伴って新たな PLA<sub>2</sub> 分子種が多数同定され、個々の PLA<sub>2</sub> 分子種の生体における機能分担について高い関心が寄せられているが十分な解析には至っていない。

申請者は、これら新しい PLA<sub>2</sub> のうち X 型分泌性 PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) に着目し、その生化学的性状、発現分布、及びプロスタグランジンなどの脂質メディエーター産生能について解析を行うと共に、疾患への関与について検討を行なった。その結果、X 型 sPLA<sub>2</sub> が炎症や大腸癌の進展に深く関与する酵素であることを初めて明らかにし、X 型 sPLA<sub>2</sub> に対する阻害薬が炎症性疾患や大腸癌に対する有望な治療薬となりうることを示した。

本論文は緒論と 3 つの章より構成されている。

緒論では、研究の背景と位置付け、及び意義について述べた。

第 1 章では、X 型 sPLA<sub>2</sub> を特異的に認識する抗体を作製すると共に、本抗体を用いたアフィニティカラムによりヒトとマウスの X 型 sPLA<sub>2</sub> を調製した。ヒトとマウスの X 型 sPLA<sub>2</sub> はプロ体として分泌された後、そのプロペプチド部分の切除によって活性が制御されることを示した。リン脂質に対する基質特異性では、細胞外膜に豊富に存在するホスファチジルコリンに対して高い選択性が認められ、特に、ヒト X 型 sPLA<sub>2</sub> では他の sPLA<sub>2</sub> 分子種と比べて、アラキドン酸をホスファチジルコリンから選択的に遊離させることが示された。X 型 sPLA<sub>2</sub> が、他の sPLA<sub>2</sub> 分子よりもマクロファージ系の THP-1 細胞から多量のアラキドン酸を遊離させることを明らかにし、X 型 sPLA<sub>2</sub> が生体においてアラキドン酸供給源として機能している可能性を示した。

第 2 章では、X 型 sPLA<sub>2</sub> の生体における発現と機能を明らかにすることを目的に、実験動物であるマウスを用いた解析を行った。その結果、マウス X 型 sPLA<sub>2</sub> が、ヒト X 型 sPLA<sub>2</sub> と同様に広範な発現を示すことを明らかにした。さらに特異抗体を用いた免疫染色により X 型 sPLA<sub>2</sub> 蛋白がマウスの脾臓に発現すること、また発現細胞の一つがマクロファージであることを明らかにした。生体由来の脾臓細胞に対しては、マウス X 型 sPLA<sub>2</sub> がヒト X 型 sPLA<sub>2</sub> と同様に、細胞から

多量のアラキドン酸を遊離させること、また遊離されたアラキドン酸が効率良くプロスタグランジン  $\text{PGE}_2$  に変換されることを認めた。マクロファージは X 型  $\text{sPLA}_2$  の最も良いターゲットであり、シクロオキシゲナーゼ  $\text{COX-2}$  と X 型  $\text{sPLA}_2$  が機能的に結びついて多量の  $\text{PGE}_2$  を産生することを明らかにした。X 型  $\text{sPLA}_2$  の作用によって、エイコサノイドだけでなくリゾリン脂質の産生も惹起されることを認めた。これらの結果は、X 型  $\text{sPLA}_2$  阻害薬が  $\text{COX}$  阻害薬より多種類の脂質メディエーターの産生を阻害できる点において、 $\text{COX}$  阻害薬よりも炎症治療に対して有効性が期待できることを示唆する。

第 3 章では、 $\text{PGE}_2$  と  $\text{COX-2}$  が関与する疾患として大腸癌に着目して解析を行い、X 型  $\text{sPLA}_2$  が大腸癌由来株化細胞から多くのアラキドン酸を遊離させ、 $\text{COX-2}$  と連関して多量のエイコサノイドを産生させることを示した。さらにヒトの大腸癌病変部位において、正常組織を上回る X 型  $\text{sPLA}_2$  の顕著な発現を明らかにし、X 型  $\text{sPLA}_2$  が  $\text{PGE}_2$  産生を介して大腸癌の進展に深く関与していることを示唆する結果を示した。

以上、本研究はホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  の中で X 型  $\text{sPLA}_2$  に着目し検討を加えた結果、本酵素が新しいアラキドン酸供給源として機能し、炎症時に発現誘導される  $\text{COX-2}$  と連関してマクロファージや大腸癌細胞から多量のエイコサノイドを産生させることを明らかにした。これらの成果は、X 型  $\text{sPLA}_2$  に対する阻害薬が大腸癌や炎症性疾患に対する治療薬として有望な候補であるとの新たな知見を提供するものである。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  のうち X 型  $\text{sPLA}_2$  に注目し、その生理機能と疾患との関係について解析を行ったものである。解析は、X 型  $\text{sPLA}_2$  に特異的な抗体、及びヒトと実験動物であるマウスの X 型  $\text{sPLA}_2$  を作製することにより行なった。その結果、X 型  $\text{sPLA}_2$  が、従来型のサブタイプである IB 型や IIA 型の  $\text{sPLA}_2$  と比較して脾臓細胞やマクロファージ、大腸癌由来細胞からアラキドン酸を多量に遊離させること、そして遊離されたアラキドン酸が炎症等に伴って発現誘導される  $\text{COX-2}$  と機能的に結びついて炎症や大腸癌の進展に関与する  $\text{PGE}_2$  に効率良く変換されることを明らかにした。さらに、大腸癌組織において  $\text{COX-2}$  と一致した X 型  $\text{sPLA}_2$  の高い発現が認められることを明らかにした。これらの成果は、X 型  $\text{sPLA}_2$  が新しいアラキドン酸供給源として機能し、大腸癌や炎症の発症に深く関与する酵素であることを示すものである。換言するとこの X 型  $\text{sPLA}_2$  の阻害剤は、炎症性疾患や大腸癌の有望な新規治療薬となり得ることを示唆したものであり、学術的な貢献のみならず医療分野に貢献すること大である。

本学位論文作成の基礎となった学術論文

- 1) Hanasaki K, Ono T, Saiga A, Morioka Y, Ikeda M, Kawamoto K, Higashino K, Nakano K, Yamada K, Ishizaki J, Arita H: Purified group X secretory phospholipase  $\text{A}_2$  induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J.Biol.Chem.* 274: 34203-34211, 1999

- 2) Morioka Y, Saiga A, Yokota Y, Suzuki N, Ikeda M, Ono T, Nakano K, Fujii N, Ishizaki J, Arita H, Hanasaki K: Mouse group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A<sub>2</sub> receptor. *Arch.Biochem.Biophys.* 381: 31-42, 2000
- 3) Morioka Y, Ikeda M, Saiga A, Fujii N, Ishimoto Y, Arita H, Hanasaki K: Potential role of group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> in cyclooxygenase-2-dependent PGE<sub>2</sub> formation during colon tumorigenesis. *FEBS Lett.* 487: 262-266, 2000
- 4) Saiga A, Morioka Y, Ono T, Nakano K, Ishimoto Y, Arita H, Hanasaki K: Group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> induces potent productions of various lipid mediators in mouse peritoneal macrophages. *Biochim.Biophys.Acta* 1530: 67-76, 2001