



The Phenoxazine Derivative Phx-1 Suppresses IgE-Mediated Degranulation in Rat Basophilic Leukemia RBL-2H3 Cells

榎木, 英介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2877

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002877>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 174 】

氏 名・(本 籍) 榎木 英介 (長崎県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博ろ第1973号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成18年3月20日

【 学位論文題目 】

The Phenoxazine Derivative Phx-1 Suppresses IgE-Mediated
Degranulation in Rat Basophilic Leukemia RBL-2H3 Cells
(新規フェノキサジン誘導体Phx-1は、ラット好塩基性白血病細胞株
RBL-2H3細胞に対し、IgEを介した脱顆粒を抑制する)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一
教 授 横崎 宏
教 授 林 祥剛

<緒 言>

フェノキサジン化合物は、アクチノマイシンDに代表されるように、腫瘍細胞の増殖抑制をはじめとする多彩な薬理学的作用を持つことが知られている。これまでの研究で、友田らは、ヘモグロビンの酸化還元反応と共に作用によって合成される新規水溶性 フエノキサジン化合物 Phx-1 (2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α , 7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one)が、マウスの Meth A carcinoma cell や leukemia cell に対して増殖抑制活性を持つことを示している。さらに Phx-1 は avian B cell に対し IgM の產生と細胞内チロシンリン酸化を抑制することが明らかになっている。また友田らは細菌、Phx-1 が非定型好酸菌や HSV-1 等のウイルスの増殖を抑制することを示した。このように、Phx-1 は多彩な薬理学的作用を持ち、薬剤として高い可能性を持つことを示唆している。本研究では、Phx-1 の新たな薬理学的作用を探るため、ラット好塩基球性白血病細胞株である RBL-2H3 細胞を用い、Phx-1 が脱顆粒、サイトカイン產生に与える影響について検討した。

<方 法>

細胞

ラット好塩基球性白血病細胞株である RBL-2H3 を用いた。この細胞株は、IgE 高親和型レセプターFc ϵ RIを介した肥満細胞のシグナル伝達メカニズムを検討するモデル細胞として広く用いられている。

フェノキサジン誘導体

本研究では、新規水溶性フェノキサジン化合物 Phx-1 (2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α , 7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one)を用いた。なお、脱顆粒の実験では、Phx-1 と同様にヘモグロビンの酸化還元反応と共に作用によって合成される Phx-2 (3-amino-1, 4 α -dihydro-4 α , 8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one)を用いた。

脱顆粒の測定

RBL-2H3 細胞を IgE (anti-DNP IgE clone SPE-7) 存在下で、各種濃度の Phx-1 及び Phx-2 を付加した培養液中、及び対照群として Phx-1 及び Phx-2 と同量の溶媒 (1%エタノール) を付加した培養液中で 12 時間培養し、その後抗原 (DNP-BSA 3, 30, 300ng/ml) もしくはカルシウムイオノフォア A23187 で一時間刺激し、脱顆粒の程度を、 β -hexosaminidase の放出を指標に解析した。なお以下の実験でも対照群として Phx-1 と同量の溶媒 (1%エタノール) を用いた。

サイトカインの転写の測定

RBL-2H3 細胞に対し IgE 存在下で各種濃度の Phx-1 を付加した培養液中で 12 時間培養

し、抗原 (DNP-BSA 30ng/ml) で一時間刺激した後、細胞から RNA を 20 μ g 抽出した。その後 32 P でラベルしたサイトカイン RNA プローブにハイブリダイズさせ、RNase で処理し、電気泳動を行った。

各種細胞内シグナル伝達物質のタンパク質発現及びリン酸化の測定

RBL-2H3 細胞に対し、IgE 存在下で Phx-1 を付加 (50 μ M 及び 100 μ M) した培養液中にて 12 時間培養した後、抗原 (DNP-BSA 30ng/ml) 刺激を与え、刺激後 0 分、3 分、10 分後に細胞溶解液を抽出し、各種タンパク質の発現及びリン酸化についてウエスタンプロット法を用いて調べた。解析したタンパク質は Akt, JNK (c-jun N-terminal kinase)、ERK (extracellular signal-regulated kinase)、p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 及び Fc ϵ RI である。

また、Phx-1 存在下 (50 μ M) で RBL-2H3 細胞を 12 時間培養した後、抗原刺激を与え、細胞溶解液を刺激後 0 分、3 分、10 分後に抽出し、それを用い抗 Gab2 抗体で免疫沈降した後抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンプロットを行った。Syk に関しては、抗リノ酸化チロシン抗体で免疫沈降した後、抗 Syk 抗体でウエスタンプロットを行った。

<結 果>

1. Phx-1 及び Phx-2 の脱顆粒に与える影響

Phx-1 50 μ M, 100 μ M を付加して培養した RBL-2H3 細胞に抗原刺激を与えたところ、対照群と比較し β -hexosaminidase の放出が有意に抑制された。この現象は抗原刺激の代わりにカルシウムイオノフォア A23187 を用いても同様に認められた。一方 Phx-2 には濃度による β -hexosaminidase の放出抑制は見られなかった。以上により、Phx-1 が RBL-2H3 細胞の脱顆粒を抑制する効果を持つことを示した。以下の実験では Phx-1 のみを用いた。

2. Phx-1 のサイトカイン產生に与える影響

RNase protection assay を用い、RBL-2H3 細胞を Phx-1 存在下 (50 μ M) で培養した後、抗原刺激を与えたが、サイトカイン遺伝子 (IL-3 及び IL-4) の発現は対照群と同様であり、発現の抑制効果は認められなかった。この結果は、Phx-1 が脱顆粒のみに影響を与え、サイトカインの產生には影響を与えないことを示している。

3. Phx-1 の Fc ϵ RI レセプターから脱顆粒、サイトカイン產生に至るシグナル伝達へ与える影響

肥満細胞や好塩基球の脱顆粒やサイトカイン產生は、肥満細胞表面の高親和型 IgE 受容体 Fc ϵ RI が抗原刺激により凝聚し、その結果細胞膜直下の非受容体型チロシンキナーゼ Lyn, Syk, Btk が活性化することによって開始されることが明らかになっている。Fc ϵ RI を介して脱顆粒に至るシグナル伝達には複数の経路が存在することが示唆されてお

り、代表的なものには Src 型チロシンキナーゼ Lyn, Syk の活性化を経て LAT を経由する conventional pathway と、Src 型チロシンキナーゼ Fyn がアダプター分子である Gab2 をリン酸化することにより、PI3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase)、Akt の活性化を経由する complementary pathway がある。また、Syk から JNK、ERK、p38 MAPK 等を介しサイトカインの産生に至る経路、ERK 等を介しロイコトリエン産生に至る経路も知られている。

そこで、Phx-1 による脱颗粒の抑制が、これらのシグナル伝達経路のどの部分に対し影響を与えるか、ウエスタンプロット法を用い検討した。結果は、対照群では抗原刺激による Akt, JNK, ERK, p38 MAPK のリン酸化が見られたが、Phx-1 处理群では、JNK, ERK, p38 MAPK のリン酸化は対象群と比べて変化なかったが、Akt のリン酸化は抑制された。なお、Fc ε RI の発現量に影響はなかった。また免疫沈降により、Phx-1 存在下では抗原刺激による Gab2 のリン酸化は抑制されたが、Syk のリン酸化は抑制されなかった。

〈考 索〉

友田らによって見出された新規フェノキサジン化合物である Phx-1 は、抗腫瘍増殖効果を持つことが知られているが、ラット RBL-2H3 細胞を用いた本研究によって、Phx-1 が抗原刺激による好塩基球や肥満細胞の脱颗粒を抑制する効果を持つことが示された。また、結果に示したとおり、Phx-1 は Gab2 及び Akt のリン酸化を抑制し、Syk のリン酸化に影響を与えたかった。この結果は、Phx-1 の脱颗粒抑制が、アダプター分子 Gab2 のリン酸化を介したいわゆる complementary pathway を選択的に抑制することによってもたらされることを示唆していることを示唆している。

一方 Phx-1 が JNK, ERK, p38 MAPK のリン酸化に影響を与えたかったのは、前述のサイトカイン遺伝子の転写に Phx-1 が影響を与えないことと矛盾しない結果である。Phx-1 は Lyn や Syk を介するシグナル伝達経路には影響を与えないことを示唆している。

Phx-1 が影響を与えるターゲットが Gab2 のリン酸化、すなわち complementary pathway を介したシグナル伝達であることが本研究で明らかになった。現在細胞内シグナル伝達の知見をもとにした抗アレルギー薬の開発が試みられているが、Syk や Lyn を経由する conventional pathway を標的分子にすると、他の免疫系にとって不可欠な役割も阻害してしまう可能性がある。この点を考えると、Phx-1 は、複数ある脱颗粒に至る相補的なシグナル伝達を抑制するという点において、副作用の少ない抗アレルギー薬を見出す上で示唆的な所見である。今後の研究により、Phx-1 の構造を変化させた物質を作成し、肥満細胞に特異的なシグナル伝達過程を抑制することができれば、新しい機序による抗アレルギー薬が開発される可能性があると考えている。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1975号	氏名	榎木 英介
論文題目 Title of Dissertation	The phenoxazine derivative Phx-1 suppresses IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells 新規フェノキサジン誘導体 Phx-1 は、ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞に対し、IgE を介した脱颗粒を抑制する		
審査委員 Examiner	主査 中村俊一 Chief Examiner 副査 横崎宏 Vice-examiner 副査 林祥剛 Vice-examiner		
審査終了日	平成18年 3月13日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

フェノキサジン化合物は、アクチノマイシンDに代表されるように、腫瘍細胞の増殖抑制をはじめとする多彩な薬理的作用を持つことが知られている。これまでの研究で、ヘモグロビンの酸化還元反応と共に役することによって生成される新規水溶性フェノキサジン化合物 Phx-1 (2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α , 7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one) が、マウスの Meth A carcinoma cell や leukemia cell に対して増殖抑制活性を持つこと、ニワトリ B 細胞に対し IgM の産生と細胞内チロシンリン酸化を抑制すること、非定型好酸菌やHSV-1 等のウイルスの増殖を抑制すること等が知られている。申請者は、Phx-1 の新たな薬理学的作用を探るため、肥満細胞のモデル系としてラット好塩基球性白血病細胞株である RBL-2H3 細胞を用い、Phx-1 が脱顆粒、サイトカイン産生に与える影響について検討した。

申請者は、まず Phx-1 が脱顆粒に与える影響を検討した。すなわち RBL-2H3 細胞を IgE 存在下で、各種濃度の Phx-1 を付加した培養液中で 12 時間培養し、その後抗原またはカルシウムイオノフォア A23187 で一時間刺激したのち、脱顆粒の程度を、 β -hexosaminidase の放出を指標に測定した。すると、抗原刺激及び A23187 による刺激により、対照群と比較し β -hexosaminidase の放出が有意に抑制された。以上により、Phx-1 が RBL-2H3 細胞の脱顆粒を抑制する効果を持つことを示した。

次に申請者は、Phx-1 がサイトカイン mRNA の転写に与える影響を検討した。RBL-2H3 細胞を Phx-1 存在下 (50 μ M) で培養した後、抗原刺激を与えた後、サイトカイン遺伝子 (IL-3 及び IL-4) の発現を RNase protection assay 法を用いて測定したが、対照群比較して、転写抑制効果は認められなかった。この実験により、Phx-1 が RBL-2H3 細胞の抗原刺激によるサイトカインの産生には影響を与えないことを示した。

最後に申請者は、脱顆粒やサイトカイン産生に至るシグナル伝達に対し Phx-1 が与える影響について検討した。RBL-2H3 細胞に対し、IgE 存在下で Phx-1 を付加した培養液中で 12 時間培養した後、抗原刺激を与え、蛋白質リン酸化酵素 Akt、JNK、ERK、p38 MAPK の発現及びリン酸化をウエスタンプロット法にて検討した。結果は、対照群では抗原刺激による Akt、JNK、ERK、p38 MAPK のリン酸化が見られたが、Phx-1 处理群では Akt のリン酸化のみが抑制された。また、免疫沈降法により検討したところ、シグナル伝達カスケード上 Akt の上流にある Gab2 のリン酸化は抑制されるが、JNK、ERK、p38 MAPK の上流にある Syk のリン酸化は抑制されなかった。この結果は、Phx-1 による RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制が、アダプター分子 Gab2 のリン酸化を介する、いわゆる complementary pathway を選択的に抑制することによってもたらされることを示唆している。この知見を抗アレルギー薬の開発という観点から評価する。たとえば Syk をターゲットにした薬剤を開発しても、Syk は肥満細胞における脱顆粒やサイトカイン産生以外にも、免疫系の細胞において重要な役割を果たしており、Syk の阻害は重篤な副作用を引き起こす可能性がある。一方、Gab2 を介する相補的なシグナル伝達を抑制する薬剤は、副作用の少ない抗アレルギー薬となりうる可能性がある。本研究の結果に基づき、Phx-1 の構造を改変することによって、肥満細胞に特異的なシグナル伝達過程を抑制することができれば、新しい機序による抗アレルギー薬が開発される可能性がある。

本研究は、新規水溶性フェノキサジン化合物 Phx-1 が、肥満細胞に対し脱顆粒を抑制することを見いだしたものである。そしてそのメカニズムがこれまであまり解明されていなかつた complementary pathway を介したシグナル伝達系を抑制するものであることを初めて証明したものであり、抗アレルギー薬開発につながる重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、申請者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。