

# ハチ毒 PLA2 の機能と免疫応答への影響

高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

## A function of bee venom PLA2 and influence on immunoresponse

Sachiko Akashi-Takamura

Microbiology and Immunology, Aichi Medical University, School of Medicine

### Abstract

The bee venom (BV) is the secretion which is produced by a needle device for protection the bee from an enemy. However, BV has been applied to the folk medicine for various diseases because it is included many enzymes which are containing anti-inflammatory or anti-cancer action. Above all, Phospholipase A2 (PLA2) is a hydrolytic enzyme which cleaves membrane phospholipids, and in bee venom occupying up to 12%. PLA2 has been analyzed in greatest detail. This mini review sets out the latest scientific evidence concerning the therapeutic effects of PLA2 in the context of diseases and provides a detailed description of the mechanisms.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 79~82, 2019

**Key words** : ハチ毒, PLA2 (phospholipase A2), 酵素活性, マイクログリア細胞, リン脂質

### はじめに

ハチ毒はハチが敵から身を守るために針装置から産生される分泌物であるが、多くの酵素を含み抗炎症作用、抗がん作用などがあることからさまざまな病気に対する民間療法に応用されてきた。近年開発された解析方法によればハチ毒には合計 102 ものタンパクやペプチドが含まれていることが示されている。なかでも PLA2 (Phospholipase A2) は最大 12% を占めるハチ毒内の酵素であり、最も詳細に解析されており、アラキドン酸代謝を介して炎症を誘導することも知られている。本稿ではハチ毒 PLA2 の特徴と主な免疫応答や疾患への作用について概説する。

### 1. PLA2 とは

PLA2 とは生体膜主要成分であるグリセリン脂質を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である。前述のハチ毒のみならずわれわれ哺乳類も産生し、30 種類以上の分子種が認められ構造や局在、進化などから細胞質型、細胞外分泌型など複数のグループに大別される。当初は細胞質型 PLA2 が細胞膜リン脂質からアラキドン酸を遊離することによりプロスタ

グランジンやロイコトリエンなどの脂質メディエーター代謝につながるものが明らかにされていた。最近の脂質メタボローム解析技術の向上などから細胞質型 PLA2 以外の PLA2 による免疫制御機構も明らかになりつつある。

最大の PLA2 サブグループである分泌性 PLA2 (sPLA2) には細胞分布や基質リン脂質に対する選択性の違いから 10 種類の活性型アイソザイムが存在する。なかでも III 型 (sPLA2-III) はハチ毒 PLA2 と唯一相同性を持つ分子種であり、ヒトにおいてもアレルギー反応を誘発する分子である。sPLA2-III トランスジェニックマウス (Tg) を動脈硬化自然発症マウスである ApoE 欠失マウスと交配後に高コレステロール食を与えると、血中リゾホスファチジルコリン (LPC) の増加と動脈硬化の促進がみられたり、ヒト動脈硬化巣で内因性の sPLA2-III 発現が著増していたりすることなどから、sPLA2-III が血管壁でリポタンパク質分解・変性を促進して動脈硬化に関与することが推定されている<sup>1)</sup>。また sPLA2-III Tg マウスを長時間飼育すると高頻度で皮膚炎の自然発症がみられるという。

## 2. ハチ毒PLA2の構造と免疫応答や疾患への作用

ハチ毒PLA2は分子量約14~18 KDのタンパクからなる酵素であり、3つの主要な $\alpha$ -ヘリックス部分と、2本鎖の逆並行な $\beta$ シートからなる構造をとっている。また4つの非疎水性のアミノ酸残基 (H34, D35, Y87, D64) により保存された酵素活性をもち、活性中心部はヒスチジンとアスパラギン酸の対となっている<sup>2)</sup>。またカルシウム結合モチーフをもち酵素として機能するにはミリモルレベルの濃度のカルシウムが必要である。ハチ毒PLA2による以下のさまざまな免疫応答や疾患への影響に関する報告がある<sup>3)</sup>。

### 2-1. 神経変性における抑制作用

ヒト白血球抗原であるHLA-DRを発現しているマイクログリア細胞とその反応がパーキンソン病やアルツハイマー病、多発性硬化症などの神経変性疾患に関与していることがわかってきている。

パーキンソン病では、マイクログリア細胞は神経障害に対する反応で活性化され、黒質のドーパミンニューロンに対して広範囲に二次的な障害を引き起こす。活性化されたマイクログリア細胞はTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ などの炎症性サイトカインを産生し、これらはinducible nitric oxide synthase (i-NOS) 発現やcaspase3および8の活性化などの神経障害増悪因子産生につながる。NOやスーパーオキシドなどのフリーラジカルは脂質の過酸化と神経のDNA障害を引き起こしミトコンドリア呼吸を停止させ、細胞死につながる。さらに、HLA-DR発現マイクログリア細胞はポジティブシグナルを誘導し、これによりCD4陽性ヘルパーT細胞はTh1やTh17細胞に分化し、炎症性サイトカインを産生する一方で神経生存シグナルとして作用するinsulin-like growth factor (IGF-1)の分泌を抑制するようグリア細胞を刺激し、神経障害に向かうポジティブフィードバックループを誘導する。HLA-DR発現マイクログリア細胞はまたアポトーシス誘導シグナルであるFas/Fas-ligand経路を活性化することでも神経障害を引き起こす。しかし、ハチ毒PLA2はこれら病的徴候に対しネガティブレギュレーターとして作用する。ハチ毒PLA2は樹状細胞上のレクチンタイプのCD206レセプターに結合し、prostaglandin E2 (PGE2)の発現を誘導する。次いでPGE2がナイーブCD4T細胞上のEP2レセプターに結合しこれによりCD4T細胞はFoxp3陽性の制御性T細胞へ分化する。制御性T細胞は、マイクログリアの活性化とT細胞浸潤を減弱させることで炎症を終わらせる<sup>4)</sup>(図1)。

またアルツハイマー病は中枢神経系でのアミロイド $\beta$ ペプチドの形成により生じ、海馬や大脳皮質での細胞外老人斑や細胞内の神経原線維の錯綜や神経縮小などが増

加し、痴呆や行動・認知機能障害などの症状が生じる。ハチ毒PLA2はアルツハイマー病を減弱させる機能をもっている。3種類の痴呆関連遺伝子を発現させたアルツハイマー病モデルマウスにハチ毒PLA2を投与したグループでは、コントロールグループに比べ認知機能の改善がみられ脳での糖代謝が増加し、海馬でのアミロイド $\beta$ 沈着およびT細胞浸潤の減少も認められた。さらにハチ毒PLA2は制御性T細胞によるマイクログリアの活性化制御に対しても増強作用をもたらした。

さらにハチ毒PLA2は、PrPフラグメントというproteinsase K-抵抗性プリオンタンパクによる神経変性障害であるプリオン病で引き起こされる神経細胞死を減弱させる効果がある。プリオン病では、正常細胞内プリオンタンパクがスクレイピープリオンタンパクへ変異し、このスクレイピープリオンタンパクがPI3K/AKT経路を遮断しCaspaseおよびp38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路を活性化して神経細胞死を引き起こす。ヒト神経芽細胞腫にプリオンタンパクを加える前にハチ毒PLA2を添加しておくと、プリオンタンパクによるp38MAPK経路の活性化がブロックされ、Caspaseも減弱しPI3K/AKT経路が復活しプリオンタンパクによる細胞死を免れることがわかった(図1)。

### 2-2. 抗炎症作用

ハチ毒PLA2は解熱鎮痛薬に含まれるアセトアミノフェン誘導性の急性肝障害に対する抑制作用ももっている。アセトアミノフェン投与によるマウスの肝障害モデルでは、ハチ毒PLA2を5日間前投与しておくことで、肝障害の指標であるalanine transaminase (ALT)やaspartate transaminase (AST)などの酵素やIL-6, TNFやNOなどの炎症性サイトカインなどがコントロール群に比べ減少することが報告されている。またハチ毒PLA2は、制御性T細胞や抑制性サイトカインであるIL-10の産生を上昇させてシスプラチン誘発腎毒性に対する防御機能を及ぼす。さらにハチ毒PLA2によるアレルギー性気道炎症制御も報告されている。ハチ毒PLA2投与により、卵白アルブミン投与による気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞浸潤や気道上皮の杯細胞増殖などが減弱する。

またハチ毒PLA2は、放射線治療による急性肺炎に対する制御性T細胞を介した防御作用も持っている。マウスに放射線照射後3週間後にハチ毒を合計6回腹腔投与することで、コントロールグループに比べ明らかな炎症反応の減弱を認め、この減弱作用は制御性T細胞が除去されたマウスでは認められなかった。

### 2-3. 抗がん作用

さまざまながん細胞株において、ハチ毒PLA2は細胞溶解作用や抗増殖作用を有している。産生された腫瘍溶解物はmonocyte-derived dendritic cellへの分化と成熟

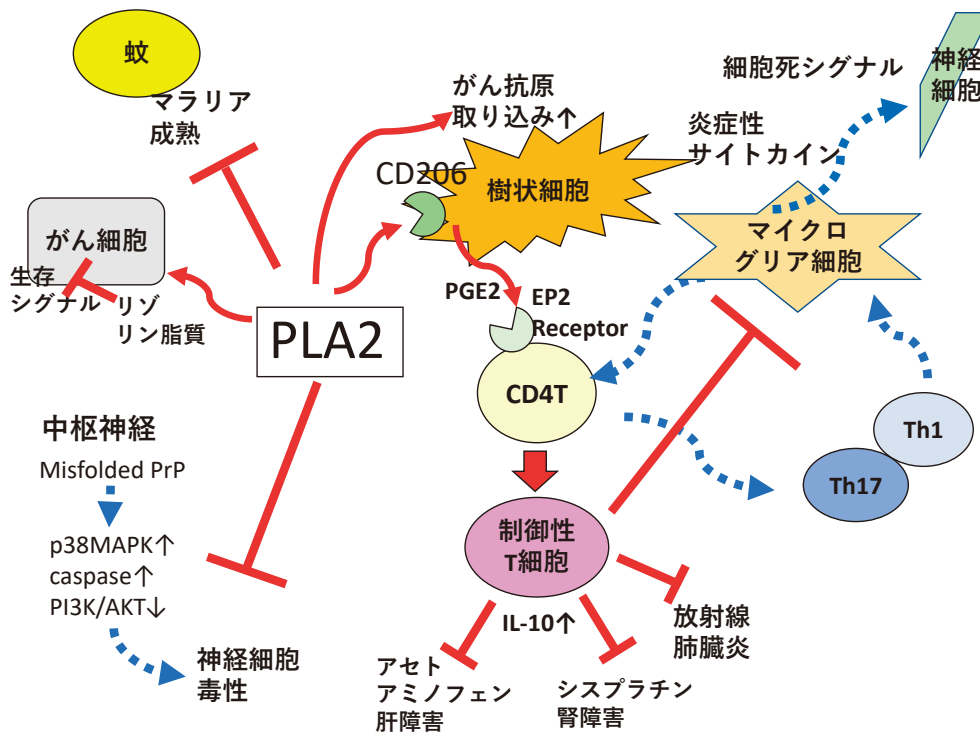


図 1 ハチ毒 PLA2 による神経変性疾患抑制作用, 抗炎症作用, 抗がん作用, 寄生虫感染に対する制御作用の概要  
 実線は PLA2 による作用, 点線は細胞傷害に向かうシグナルを示す。

を促し、腫瘍細胞に対する免疫療法でのアジュバント作用をもたらす。ハチ毒 PLA2 は細胞膜のリン脂質に作用しリゾリン脂質を産生するがこれらはミセルとなり細胞膜の構造に影響を及ぼし、細胞表面の高分子や受容体的確な機能や発現を損なうため、細胞生存シグナル伝達経路は最初から途絶えてしまう。これらの作用はまた細胞生存に必要な PI3/AKT や extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) シグナル伝達経路も途絶えさせる。またハチ毒 PLA2 により産生されたリゾリン脂質の一つである LPC は、カルシウムチャネルおよびフリーラジカルを産生する細胞質内シグナル伝達経路を活性化させ細胞膜障害を誘導する。以上の細胞傷害作用は急速に増殖している腫瘍細胞に大きく影響を及ぼし殺傷する。

さらにはこの抗がん作用に関して、樹状細胞は T 細胞に抗原提示するという点で大きな役割を果たしている。ハチ毒 PLA2 は細胞の種類を問わず不可逆的に細胞膜の疎水基に結合でき、かつ細胞膜リン脂質の陰イオンに静電的に結合できるため、PLA2 の C 末端領域に候補のがん抗原ペプチドを結合させると、そこを起点に PLA2+抗原ペプチド複合タンパクを取り込むようなアンカーの役割を果たすようになる。樹状細胞でのがん抗原ワクチン準備として、MHC クラス I ペプチドによるクロスプレゼンテーションと MHC クラス II ペプチド抗原提示を強化するために、ハチ毒 PLA2 の 34 番目のヒスチジンをグルタミンに変異させると、PLA2 の酵素作

用自体は消失し樹状細胞を用いたがん抗原ワクチンにおける細胞膜結合ベクターとして効果的なものになる<sup>5)</sup>。

#### 2-4. 細菌・寄生虫感染に対する制御作用

ハチ毒 PLA2 が明らかな抗細菌作用や抗寄生虫作用を持つことも報告されている。ハチ毒 PLA2 はトリパノソーマに対する抗原生動物作用やエンテロバクター、大腸菌などに対する抗細菌活性を持つことも示されている。ハチ毒 PLA2 遺伝子配列を腸上皮特異的に発現させた蚊では、腸でのマラリア原虫の成熟に影響しマウスへのマラリア感染を防ぐことが報告されている<sup>6)</sup>。このハチ毒 PLA2 の抗マラリア作用はマラリア原虫と蚊の中腸細胞との結合を防ぐことが考えられている。

#### おわりに

PLA2 の臨床応用に関しては、まだ大きな可能性を秘めていると思われる。われわれはヒト皮膚細胞においてハチ毒 PLA2 が病原体成分による活性化を増強させることを見出し、ハチ毒 PLA2 のヒト皮膚細胞膜への作用がその増強作用に関与していると推察した(論文リバイス中)。将来的には病原体成分を用いた抗がん作用増強に PLA2 を併用したり、やけどや褥瘡などで皮膚の増殖速度を高めたい場合に併用したりするなどの臨床応用の可能性を考えている。

## 文 献

- 1) 山本圭, 村上誠: ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>. 生化学 83 : 449-461, 2011
- 2) Perez-Riverol A, Lasa AM, Dos Santos-Pinto JRA, et al. : Insect venom phospholipases A1 and A2 : Roles in the envenoming process and allergy. *Insect Biochem Mol Biol* 105 : 10-24, 2019
- 3) Hossen MS, Shapla UM, Gan SH, et al. : Impact of Bee Venom Enzymes on Diseases and Immune Responses. *Molecules* 22 : E25, 2016
- 4) Chung ES, Lee G, Lee C, et al. : Bee Venom Phospholipase A2, a Novel Foxp3+ Regulatory T Cell Inducer, Protects Dopaminergic Neurons by Modulating Neuroinflammatory Responses in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Immunol* 195 : 4853-4860, 2015
- 5) Almunia C, Bretaudeau M, Held G, et al. : Bee Venom Phospholipase A2, a Good "Chauffeur" for Delivering Tumor Antigen to the MHC I and MHC II Peptide-Loading Compartments of the Dendritic Cells : The Case of NY-ESO-1. *PLoS One* 8 : e67645, 2013
- 6) Moreira LA, Ito J, Ghosh A, et al. : Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem* 277 : 40839-40843, 2002