

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

| |
|----------------|
| H23 年度 実績報告 |
|----------------|

成宮 周

京都大学医学研究科・教授

プロスタグランジンを引き金とする炎症慢性化機構の解明

§1. 研究実施体制

(1)「成宮」グループ

① 研究代表者:成宮 周 (京都大学医学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ EP2-cAMP 系による COX-2/NFκB 増幅経路の解析
- ・ EP2/EP4-cAMP 系による IL-12 受容体 β2 遺伝子誘導機構の解析
- ・ EP4-cAMP 系による IL-23 遺伝子誘導機構の解析
- ・ 炎症性大腸がんモデルを用いた PG の働きの解析
- ・ うつ病モデルにおける PG の関与と働きの解析

(2)「牛首」グループ

① 主たる共同研究者:牛首 文隆 (旭川医科大学医学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・ NASH における PG の関与と働きの解析

(3)「小林」グループ

① 主たる共同研究者:小林 拓也 (京都大学医学研究科、講師)

② 研究項目

- ・ 炎症慢性化に関する PG 受容体とシグナル伝達分子の構造解析

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本研究の狙いは、急性炎症が慢性化するメカニズムを、アラキドン酸由来の生理活性脂質プロスタグランジン (PG) とサイトカインとの相互作用に着目して解析することにある(図1)。以下、研究項目ごとに説明する。

1. PG受容体刺激による炎症慢性化遺伝子制御ネットワークの解明

① EP2-cAMP系によるCOX-2/NFκB 増幅経路の解析

我々は、本研究で、血流ストレスにより血管内皮細胞内でCOX-2が誘導され、産生されたPGE₂がEP2受容体を介してNFκB-COX-2と増幅経路を形成し、これが脳血管壁で慢性炎症を起こして脳動脈瘤形成に寄与する事を明らかにしていた(8)(図1)。平成23年度はEP2によるNFκB活性化経路につき検討を行った。その結果、EP2刺激はNFκB p105サブユニットとNFκB p65サブユニットのリン酸化を生じ、これによりNFκBを活性化する事を見出した。さらに、COX-2のプロモーター解析をおこないEP2刺激とTNFαが別々のκB sitesに働き、COX-2プロモーター活性の相乗的な上昇を起こす事、この協調作用が転写因子複合体形成を介しておこる事を明らかとした。また、NFκB活性レポーターマウスを脳動脈瘤モデルに供する事により、脳動脈瘤の形成とともにNFκB活性化が内皮細胞から外膜のマクロファージそして中膜平滑筋細胞を含む血管壁全層に波及し拡大していく事、すなわち炎症に関与する細胞種が病態形成につれ経時的に変化する事を見出した。今後、EP2によるNFκB活性化機構を転写因子複合体形成に注目し検討するとともに、動物モデルを使用した検討によりどの細胞種に発現するEP2が脳動脈瘤形成に重要な事を明らかとする。

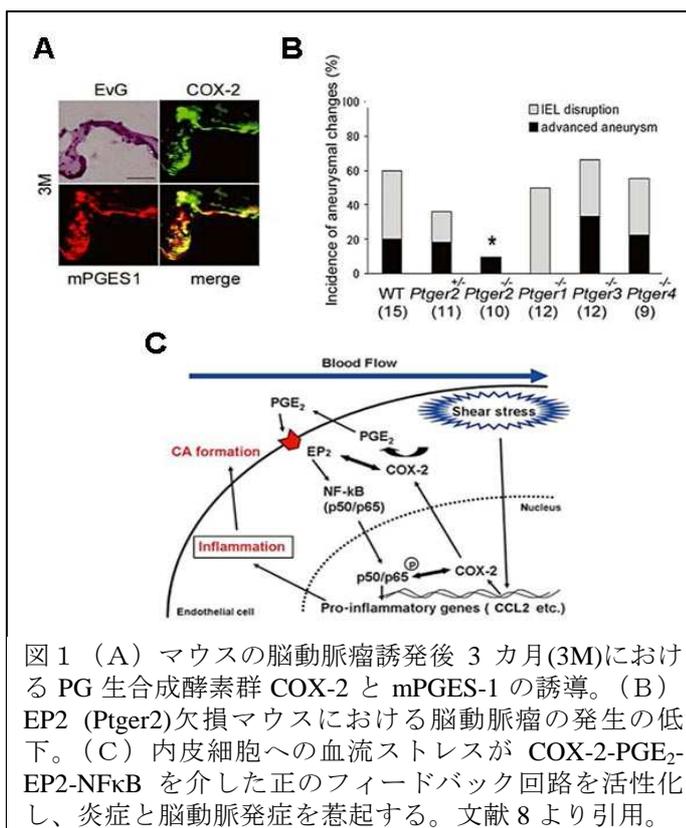


図1 (A) マウスの脳動脈瘤誘発後 3 カ月(3M)における PG 生合成酵素群 COX-2 と mPGES-1 の誘導。(B) EP2 (Pterger2)欠損マウスにおける脳動脈瘤の発生の低下。(C) 内皮細胞への血流ストレスが COX-2-PGE₂-EP2-NFκB を介した正のフィードバック回路を活性化し、炎症と脳動脈発症を惹起する。文献 8 より引用。

今後、EP2によるNFκB活性化機構を転写因子複合体形成に注目し検討するとともに、動物モデルを使用した検討によりどの細胞種に発現するEP2が脳動脈瘤形成に重要な事を明らかとする。

② EP2/EP4-cAMP系によるIL-12受容体β2遺伝子誘導機構の解析

我々は、本研究で、EP2/EP4によるTh1細胞分化の促進が、EP2/4からcAMP-PKAを介し直接にIL-12受容体β2 (IL-12Rβ2) 遺伝子の発現誘導を起こすと同時に、Interferon-γ (IFN-γ)受容体IFNγR1の誘導を起こしIFN-γのIL-12Rβ2誘導作用を増強することによることを明らかにしていた。平成23年度には、これらの経路を解析し、PKAによるIL-12Rβ2 およびIFNγR1の誘導がともにPKAによるCREBのリン酸化とCREBのco-activatorの活性化によることを明らかとした(論文投稿中)。今後、この経路が上記遺伝子でepigeneticな変化を惹起している可能性について検討する。

③ EP4-cAMP系によるIL-23遺伝子誘導機構の解析

我々は、本研究で、CD40刺激とEP4刺激が協調的に樹状細胞(dendritic cell; DC)でのIL-23 p19産生を亢進する事を見出していた。平成23年度には、このCD40刺激とEP4刺激の協調作用によるp19の産生誘導が転写レベルで起こっている事を確認した。また、この協調作用の機構を明らかとするためにbone marrow derived-DCを使用しp19遺伝子のプロモーター解析のためのコンスト

ラクト作製とトランスフェクション条件の検討を行った。今後、プロモーター解析によりCD40とEP4の協調作用の基盤となる機構につき解析を行う。

2. がん、NASH, うつ病モデルにおけるPGの関与と働きの解析

① 炎症性大腸がんモデルを用いたPGの働きの解析

本研究項目では、azoxymethane (AOM)とdextran sodium sulfate (DSS) とを用いた大腸の炎症性発がんモデルを用いて大腸がん発生と進展に関与するPG受容体の同定とその作用メカニズムを解明する事を目的とする。平成23年度には、まず、予備実験を行いAOMとDSSの投与量と投与スケジュールを確定した。さらに、そのプロトコールを各種PG受容体欠損マウスに適用する事により大腸がんの発生と進展を観察した。その結果、特異的に大腸がんの発生を抑制するPG受容体を同定した。今後、当該受容体の条件付き欠損マウスを用い大腸がん発生・進展での役割を検討する。

② NASH における PG の関与と働きの関与

メチオニン・コリン欠乏(MCD)食負荷が、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルとして有効であることを確認した。Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity scoreを用いた組織学的な解析で、MCD 食負荷 IP 欠損マウスは野生型マウスに比し、早期(5週)にNASHを発症した。また、MCD 食負荷 10週の時点では、IP 欠損マウスの肝臓は表面の網状赤色紋理と凹凸を伴う前肝硬変病像を呈し、Sirius red 染色により肝線維化の促進が確認された。血清学的な解析では、MCD 食負荷 IP 欠損マウスは野生型マウスに比し、有意な血清アルブミン値の低下を認めた。また、NASH 発症に係わる酸化ストレスの亢進の原因となる肝臓での鉄の蓄積を解析した。その結果、MCD 食負荷 IP 欠損マウスの肝臓では野生型マウスの肝臓に比し、鉄の蓄積が有意に亢進していた。また、鉄過剰蓄積に伴う酸化ストレスの亢進を生化学的に明らかにするため、肝組織のhydroxynonenal (HNE)染色を行った。

その結果、MCD 食負荷 IP 欠損マウスの肝臓では野生型マウスの肝臓に比し、HNE の著明な増加が確認された。これらの解析により、IP 欠損マウスで認められる NASH 病態の促進の程度や特徴の一端を明らかにすることができた。

③ うつ病モデルにおける PG の関与と働きの解析

うつ病病態における炎症の関与が提唱されてきたが、その詳細は不明であった。我々はマウスうつ病モデルである反復社会挫折ストレスを用い、PGE 受容体 EP1 や PG 合成酵素 COX-1 が反復社会挫折ストレスによる抑うつや不安行動に必須であること、COX-1 がミクログリアに発現し、反復社会挫折ストレスによりミクログリアが活性化することを明らかにしていた。平成23年度には、神経生化学的計測、脳領域特異的損傷、行動実験などを用い、EP1 による前頭前皮質ドパミン系の抑制が反復社会挫折ストレスによる行動変化に必須であることを明らかにした(2) (図2)。さらに、反復社会挫折ストレス後のミクログリアにおける新規炎症関連分子の発現上昇を見出し

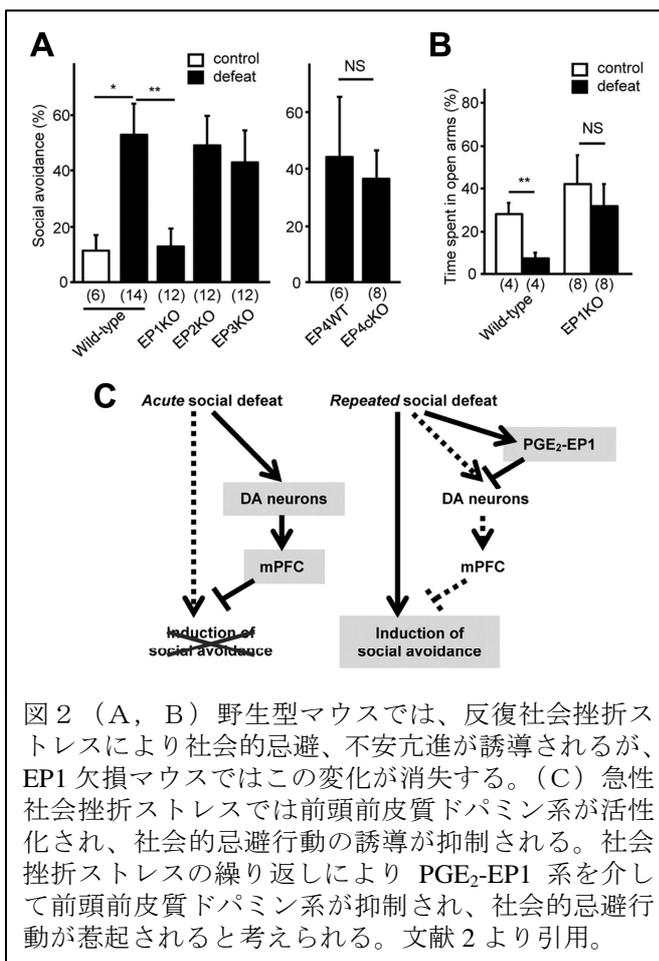


図2 (A, B) 野生型マウスでは、反復社会挫折ストレスにより社会的忌避、不安亢進が誘導されるが、EP1 欠損マウスではこの変化が消失する。(C) 急性社会挫折ストレスでは前頭前皮質ドパミン系が活性化され、社会的忌避行動の誘導が抑制される。社会挫折ストレスの繰り返しの繰り返しにより PGE₂-EP1 系を介して前頭前皮質ドパミン系が抑制され、社会的忌避行動が惹起されると考えられる。文献2より引用。

ている。ドパミン系を制御する他のプロスタノイド受容体の探索から、線条体の血管内皮細胞に発現するトロンボキサン受容体 TP が一酸化窒素 NO を介してドパミン放出を促進することを示した(7)。反復ストレスにより神経細胞形態の長期的変化が誘導されることから、アクチン制御因子である mDia の flox マウスを作出した。まず全身性の mDia 欠損マウスを作出し、脳神経発生における神経上皮の恒常性の維持と抑制性神経前駆細胞の遊走における mDia の働きを明らかにした(3, 6)。

今後、反復社会挫折ストレスにミクログリア活性化に伴う COX-1 依存的な PGE₂ 合成の役割、ミクログリアに誘導される新規炎症関連分子の役割、前頭前皮質ドパミン系の役割について、遺伝子改変マウス作出、光遺伝学的手法、網羅的遺伝子発現解析などにより検討する。また、神経細胞特異的な mDia 欠損マウスを作出し、マウスうつ病モデルにおける神経細胞形態制御の役割を解析する。

3. 炎症慢性化に関係する PG 受容体とシグナル伝達分子の構造解析

これまで、小林はアデノシン A2a 受容体、ヒスタミン H1 受容体、アセチルコリン M2 受容体の各受容体の結晶化に成功している(4, 5, 9)。その技術を用い、PG 受容体の結晶化による X 線構造解析を行う。平成23年度は、酵母及び昆虫細胞で各 PG 受容体の高発現系及び高純度精製系を確立することを目指した。これには、出芽酵母での PCR fragment を用いた組み替えによる変異体作製や GFP 融合受容体蛋白質を用いた安定性や単分散性の評価法を用いた。上記で選択した変異体を、出芽酵母、メタノール資化酵母、または昆虫細胞で高発現(1L 培養液あたり 0.5 mg 以上)させることにより、PG 受容体の高純度精製品(2 mg 以上)を取得する。出芽酵母を用いてトロンボキサン受容体 TP と PGE 受容体 EP2 の安定化を試みた。その結果、トロンボキサン受容体については、安定化を終了したが、EP2 に関しては安定化が難しく、来年度も引き続き検討を行いたい。安定化の完了した TP は、昆虫細胞とメタノール資化酵母を用いて大量発現を試みた。TP の発現は、酵母よりも昆虫細胞の方が高いことが明らかとなった。今後、精製した受容体は、脂質キュービック相の中で結晶化を試みたい。さらに、親水性表面の立体構造を認識するモノクローナル抗体作製(1つのPG受容体に対して10種類以上作製)し、「結晶化リガンド」として膜蛋白質/抗体複合体を結晶化する方法も同時に検討したい。また、EP2 に関しては親和性の高いアンタゴニストが存在していないが、EP4 に関しては親和性の高いアンタゴニストが存在している。そこで、EP2 に相同性の高い EP4 に対してもターゲットを広げていく必要があると考えている。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Nakagawa, N., Yuhki, K., Kawabe, J., Fujino, T., Takahata, O., Kabara, M., Abe, K., Kojima, F., Kashiwagi, H., Hasebe, N., Kikuchi, K., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Ushikubi, F. The intrinsic prostaglandin E₂-EP₄ system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice. *Kidney. Int.* in press.
2. Tanaka, K., Furuyashiki, T., Kitaoka, S., Senzai, Y., Imoto, Y., Segi-Nishida, E., Deguchi, Y., Breyer, R.M., Breyer, M.D. and Narumiya, S. Prostaglandin E₂-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *J. Neurosci.* 32, 4319-4329, 2012. (doi: 10.1523/JNEUROSCI.5952-11.2012)
3. Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Kaneko, N., Sawamoto, K., Watanabe, K., Takebayashi, H., Kiyonari, H., Ishizaki, T., Furuyashiki, T. and Narumiya, S. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat. Neurosci.* 15, 373-380, 2012. (doi: 10.1038/nn3020)
4. Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., *Kobilka, B.K., *Haga, T. and *Kobayashi, T. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482, 547-51, 2012. (doi: 10.1038/nature10753)
5. Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., Cameron, A.D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., *Iwata, S. and *Murata, T. G protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* 482, 237-40, 2012. (doi: 10.1038/nature10750)
6. Thumkeo, D., Shinohara, R., Watanabe, K., Takebayashi, H., Toyoda, Y., Tohyama, K., Ishizaki, T., Furuyashiki, T. and Narumiya, S. Deficiency of mDia, an actin nucleator, disrupts integrity of neuroepithelium and causes periventricular dysplasia. *PLoS One* 6, e25465, 2011. (doi: 10.1371/journal.pone.0025465)
7. Mitsumori, T., Furuyashiki, T., Momiyama, T., Nishi, A., Shuto, T., Hayakawa, T., Ushikubi, F., Kitaoka, S., Aoki, T., Inoue, H., Matsuoka, T. and Narumiya, S. Thromboxane receptor activation enhances striatal dopamine release, leading to suppression of GABAergic transmission and enhanced sugar intake. *Eur. J. Neurosci.* 34, 594-604, 2011. (doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07774.x)
8. Aoki, T., Nishimura, M., Matsuoka, T., Yamamoto, K., Furuyashiki, T., Kataoka, H., Kitaoka, S., Ishibashi, R., Ishibazawa, A., Miyamoto, S., Morishita, R., Ando, J., Hashimoto, N., Nozaki, K. and Narumiya, S. PGE₂-EP₂ signaling in endothelium is activated by haemodynamic stress and

induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF- κ B. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1237-1249, 2011. (doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01358.x)

9. Shimamura, T., Shiroishi, M, Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G, Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., *Kobayashi, T., *Stevens, R.C. and *Iwata, S. Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. *Nature* 475,65-70, 2011. (doi: 10.1038/nature10236)