

「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22年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

成宮 周

京都大学大学院医学研究科・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

- ・ 炎症慢性化に関係する 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)

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

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)とサイトカインなどその他の炎症関連分子との相互作用に着目して解析することにある。以下項目毎に平成24年度の実績を説明する。

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ことを明らかにしていた。また、平成23年度にはEP2によるNFκB活性化経路につき検討を行った結果、EP2刺激はNFκB p105サブユニットとp65サブユニット両者をリン酸化しNFκBを活性化することを見出した。平成24年度は、COX-2のプロモーター活性をEP2刺激がTNF-αと協調的に上昇させることを見出した。この機序として、EP2とTNF-αにより活性化されたNFκBは各々プロモーター上の異なるκB結合サイトに結合して、TNF-α刺激で活性化されるSp1と複合体を形成し協調的なCOX-2の発現誘導をもたらすことを明らかとした。また、EP2とTNF-αによる協調的なMCP-1発現上昇では、EP2刺激の下流でRNA結合蛋白質HuRが活性化しTNF-αで誘導されたMCP-1 mRNAの安定化を起こしていることを明らかにした。

また、脳動脈瘤等様々な種々の慢性炎症疾患では、時間経過によって炎症反応を惹き起す細胞集団が変化する事が考えられる。平成23年度には、NFκB活性レポーターマウスの作成を行ない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へ波及し拡大していく事を確認した。この結果を受け平成24年度には、Cre-loxP系の制御下に細胞種特異的にNFκBのsuper-repressorであるIκBリン酸化抵抗性変異体を発現するマウスを作出し、内皮細胞或はマクロファージ特異的NFκB活性化抑制マウスを作出した。平成25年度は、これらマウスを使用し脳動脈瘤形成へ内皮細胞とマクロファージ各々でのNFκB活性化の寄与とそれらの相互作用を検討する。

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ともに、Interferon-γ(IFN-γ)受容体IFNγR1の誘導も起こし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であるCRTC2の活性化によること

を示した。これを基に平成24年度には、この経路がこれまで知られていたcAMPによるT細胞抑制といかに矛盾無く成立しうるかを示し、さらに、この経路がin vivo の免疫反応で働いていることを養子免疫による大腸炎モデルでT細胞特異的EP4欠損マウスを使用して明らかにした。これらをまとめて論文として発表した(21)。ついで、PGE₂-EP4経路がIL-23によるTh17細胞の増幅をも促進することに鑑み、この促進機構の分子メカニズムを解析した。その結果、IL-23受容体の特異的サブユニットIL-23Rの発現誘導にもPGE₂-EP2/EP4-CREB/CRTC2経路が関与することを明らかにした。また、平成24年度には炎症に伴うepigeneticな変化につきPGの関与を解析し、T細胞をEP4作用薬で刺激することで、H3K9 methyltransferaseである G9a が活性化されることを見出した。今後、G9aによるヒストンのメチル化がT細胞のどのような分化過程で起きるのか、どのような遺伝子がepigeneticな制御を受けているのか、実際のin vivoの炎症でこの経路が働いているのかを検討する。

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でのIL-23 p19産生を亢進することを見出していた。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ことを確認した。平成24年度は、p19遺伝子のプロモーター解析によりプロモーター上でのCREBの結合配列を同定しさらにChIP法によりこのサイトへのCREBの結合を確認した。また、CREBのRNAiを行うことでEP4刺激下でのp19発現誘導を抑制出来ることを確認した。今後、この知見に基づきCD40刺激の下流で活性化されるNFκBのp19プロモーター上での結合配列をプロモーターアッセイに同定し、NFκBとCREBによるRe-ChIPアッセイで、CD40とEP4の共刺激下での協調的なp19発現誘導がCREB・NFκB複合体形成によるものかを検討する。

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ことを目的とする。平成23年度には、同モデルでの大腸がん形成に寄与するPG受容体としてEP2を同定した。平成24年度は、平成23年度の結果をもとに本モデルにおけるEP2の作用点を特定することを目的とし検討を行った。骨髄移植や腸上皮細胞特異的にEP2を欠損するマウスを使用して、EP2の作用が主に大腸上皮ではなく骨髄系細胞であることを明らかとした。さらに、大腸がん組織内の浸潤細胞の同定をFACSにて行い、その主要なものが好中球であること、免疫染色によりEP2発現細胞が主にこれら浸潤好中球であることを見出した。さらに、NFκB活性レポーターマウスを使用することにより大腸がん形成過程でのNFκB活性化細胞も主要なものは好中球であること

を確認した。今後、これらの知見を踏まえ、好中球のEP2に着目し、好中球特異的EP2欠損マウス作出しその大腸がん形成への寄与を検討する。また、EP2欠損NFκB活性レポーターマウスを使用しEP2欠損によりどの細胞種のNFκB活性化が抑制されるかを確認する。

② NASHにおけるPGの関与と働きの関与

牛首グループは、NASHにおけるPGの関与と働きを解析するために、まずメチオニン・コリン欠乏食負荷モデルにおける野生型マウスでのNASH病態の進展を確認した。ついで、肝臓でのNASH病態の組織学的なスコア化や酸化ストレスの程度を解析することにより、野生型マウスとIP欠損マウスでのNASH病態の進展の差異を明らかにした。また、IPアゴニストがNASH病態の進展を抑制することを確認した。一方、NASH病態進展に関わる炎症慢性化の機構を解析するため、炎症性サイトカインの動態解析と肝構成細胞培養系を用いた解析を開始している。さらに、成宮グループでのConA肝炎モデルにおけるDPの関与に関するデータを基に、DP欠損マウスでのNASH病態の解析とDPアゴニストのNASH発症・進展に対する効果を解析する予定である。なを、予備検討においてDP欠損マウスでのNASH病態の進展の促進が示唆されている。

③ うつ病モデルにおけるPGの関与と働きの解析

うつ病患者の血中サイトカインの上昇や非ステロイド性抗炎症薬の抗うつ作用から、うつ病病態における炎症の関与が提唱されてきた。本研究項目では、うつ病の炎症仮説を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て検証することを目的としている。平成23年度までに、反復ストレスによる抑うつ誘導や不安亢進に、PGE₂-EP1系による前頭前皮質ドパミン系抑制が必須である事を示し、この過程にミクログリア由来のPGE₂が関与する事を示唆した。平成24年度には、これらの結果をもとに、ミクログリアを含む脳内CD11b陽性細胞集団をFACSソートにより単離し、DNAマイクロアレイ解析と定量的RT-PCR解析を行い、反復ストレスによりミクログリアで発現が亢進する分子群を同定した。さらに、その受容体の遺伝子欠損マウスでは、反復ストレスによる抑うつや不安亢進が消失することを示した。並行して、反復ストレスにおけるPGE₂産生細胞を同定するため、PG合成酵素COX-1の条件付け欠損マウス作出を継続しており、COX-1 floxマウスのES細胞を樹立した。RNA干渉法によるドパミン受容体発現抑制を行い、前頭前皮質による抗うつ作用を介達するドパミン受容体サブタイプを同定した。炎症関連分子群の神経回路への作用を調べる基盤技術として、FACSソートを用いた神経細胞種特異的な網羅的遺伝子発現解析法と光遺伝学的手法による特異的な神経回路活性化法を立ち上げた。

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

小林グループは「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」を目的としている。前年度は、我々の開発したシステムを利用して、野生型PG受容体を出芽酵母に発現させ、C末端に融合したGFPの蛍光を指標として、安定性や単分散性を評価した。し

かし、PG 受容体の場合、全般的に野生型では非常に不安定であることが判明した。そこで、平成 24 年度は、炎症の慢性化に関与している EP4 受容体にターゲットを絞り込み、安定化変異体の作製を試みた。出芽酵母を用いて安定化した受容体は、メタノール資化酵母や昆虫細胞に移すことで、さらに発現量や受容体の熱安定性を向上させることが可能となった。平成 24 年度前半は、EP4 受容体について安定化変異体を作製し、後半はこれらの受容体を用いて脂質キュービック相における結晶化条件のスクリーニングを実施した。その結果、昆虫細胞を用いて EP4 受容体をリッターあたり、蛋白量として 1-2 mg 発現・精製することが可能となった(図 1)。バキュロウイルスの感染率は 80 % を越え、最終精製した EP4 受容体をゲル濾過により分離したところ、高分子側に若干の肩は認められるもののほぼ単分散性が認められた。小野薬品工業株式会社で開発した結合親和性の高い(Kd 1 nM 以下)EP4 受容体選択的アンタゴニスト(ONO-AE3-208)を受容体に結合させて精製するため、市販されている ^3H -PGE₂ を使ったリガンド結合実験が行えず、最終精製タンパクの品質評価には至らなかった。現在は、この精製受容体を使い脂質キュービック相における結晶化を試みている。今後は、アンタゴニストの結合した不活性型構造の結晶化条件を見つけ出し、構造解析を行いたい。また、アゴニストの結合した活性型 EP4 受容体の安定化変異体を作製したいと考えている。

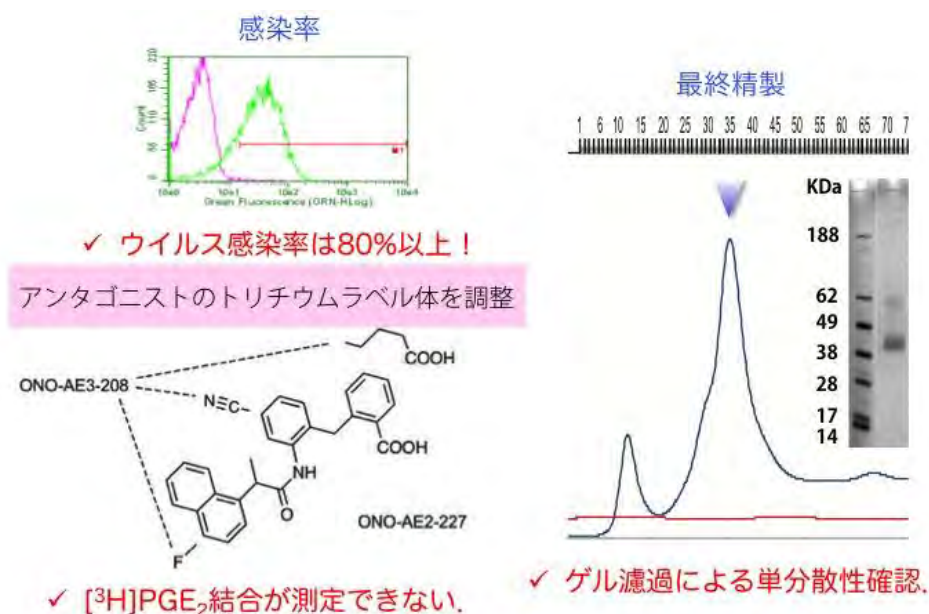


図 1 Prostaglandin E₂ 受容体 EP4 サブタイプの発現・精製状況

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Suzuki T, Ogawa F, Iyoda A, Satoh Y, Kato S, Nakamura M, Kitasato H, Narumiya S, Majima M. Thromboxane A₂ receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. *Cancer Sci.* (2012 Apr), 103(4):700-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02200.x.
2. Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Tashiro K, Kinoshita S. Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes. *J Allergy Clin Immunol.* (2012 May), 129(5):1413-1416.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.069.
3. Shiroishi M, Tsujimoto H, Makyio H, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Murata T, Nomura N, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* (2012 Jun 13), 11:78. doi: 10.1186/1475-2859-11-78.
4. 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.* (2012 Jul), 82(2):158-71. doi: 10.1038/ki.2012.115.
5. Vennemann A, Gerstner A, Kern N, Ferreiros Bouzas N, Narumiya S, Maruyama T, Nüsing RM. PTGS-2-PTGER2/4 signaling pathway partially protects from diabetogenic toxicity of streptozotocin in mice. *Diabetes* (2012 Jul), 61(7):1879-87. doi: 10.2337/db11-1396.
6. Frölich S, Olliges A, Kern N, Schreiber Y, Narumiya S, Nüsing RM. Temporal expression of the PGE₂ synthetic system in the kidney is associated with the time frame of renal developmental vulnerability to cyclooxygenase-2 inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2012 Jul 15), 303(2):F209-19. doi: 10.1152/ajprenal.00418.2011.
7. Guo Y, Tukaye DN, Wu WJ, Zhu X, Book M, Tan W, Jones SP, Rokosh G, Narumiya S, Li Q, Bolli R. The COX-2/PGI₂ receptor axis plays an obligatory role in mediating the cardioprotection conferred by the late phase of ischemic preconditioning. *PLoS One.* (2012), 7(7):e41178. doi: 10.1371/journal.pone.0041178.
8. Imai K, Ueta M, Mori K, Ueno M, Ikeda Y, Oga T, Yokoi N, Shinomiya K, Narumiya S, Kinoshita S. Expression of prostaglandin F receptor in scleral and subconjunctival tissue. *Br J Ophthalmol.* (2012 Aug), 96(8):1148-9. doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-301815.

9. Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T, Narumiya S, Urade Y, Ohinata K. Orally administered rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase in mice. *Mol Nutr Food Res*. (2012 Aug), 56(8):1315-23. doi: 10.1002/mnfr.201200155.
10. Kim YT, Moon SK, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. Prostaglandin FP receptor inhibitor reduces ischemic brain damage and neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. (2012 Oct), 48(1):58-65. doi: 10.1016/j.nbd.2012.06.003.
11. Toda K, Ono M, Yuhki K, Ushikubi F, Saibara T. 17β -Estradiol is critical for the preovulatory induction of prostaglandin E(2) synthesis in mice. *Mol Cell Endocrinol*. (2012 Oct 15), 362(1-2):176-82. doi: 10.1016/j.mce.2012.06.006.
12. Hirata T, Nomachi A, Tohya K, Miyasaka M, Tsukita S, Watanabe T, Narumiya S. Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. *Int Immunol*. (2012 Nov), 24(11):705-17. doi: 10.1093/intimm/dxs077.
13. Pöschke A, Kern N, Maruyama T, Pavenstädt H, Narumiya S, Jensen BL, Nüsing RM. The PGE₂-EP4 receptor is necessary for stimulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in response to low dietary salt intake in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. (2012 Nov15), 303(10):F1435-42. doi: 10.1152/ajprenal.00512.2011.
14. Khan MR, Anisuzzaman AS, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Takano T, Ikeuchi H, Uchino M, Maemoto A, Ushikubi F, Muramatsu I, Taniguchi T. M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. *J Gastroenterol*. (2012 Dec 15), [Epub ahead of print]
15. Kobayashi K, Tsubosaka Y, Hori M, Narumiya S, Ozaki H, Murata T. Prostaglandin D₂-DP signaling promotes endothelial barrier function via the cAMP/PKA/Tiam1/Rac1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2013 Mar), 33(3):565-71. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300993.
16. Ikushima YM, Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Takubo K, Furuyashiki T, Narumiya S, Suda T. Prostaglandin E₂ regulates murine hematopoietic stem/progenitor cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells. *Blood* (2013 Mar 14), 121(11):1995-2007. doi: 10.1182/blood-2012-06-437889.
17. Aburakawa Y, Kawabe J, Okada M, Yamauchi A, Asanome A, Kabara M, Matsuki M, Takehara N, Nakagawa N, Okumura S, Minami Y, Mizukami Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. *Circ J*. (2013 Mar 25), 77(4):1053-62.

18. Ahmad AS, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. PGE₂ EP1 Receptor Deletion Attenuates 6-OHDA-Induced Parkinsonism in Mice: Old Switch, New Target. *Neurotox Res.* (2013 Apr), 23(3):260-6. doi: 10.1007/s12640-013-9381-8.
19. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H. Anti-inflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013 Mar 26), 110(13):5205-10. doi: 10.1073/pnas.1218091110.
20. Higashida C, Kiuchi T, Akiba Y, Mizuno H, Maruoka M, Narumiya S, Mizuno K, Watanabe N. F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nature Cell Biol.* (2013 Apr), 15(4):395-405. doi: 10.1038/ncb2693.
21. Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S. Prostaglandin E₂ promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signaling by cAMP and PI3-kinase. *Nature Commun.* 2013 *in press* (doi: 10.1038/ncomms2684)

(3-2) 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)