

「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

H25 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 (京都大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ EP2-cAMP 系による COX-2/NF κ B 増幅経路の解析
- ・ EP2/EP4-cAMP 系による IL-12 受容体 β 2 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 (旭川医科大学大学院医学系研究科、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 (京都大学大学院医学研究科、准教授)

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. 研究実施の概要

プロスタグランジン (PG) は、不飽和脂肪酸であるアラキドン酸の代謝物で、外傷や感染など侵害刺激が生体に加わって生じる腫脹や熱感、痛み、発熱などの急性炎症症状の発現に関わっている。一方、侵害刺激は体に入ると免疫関連細胞を刺激し、これらよりサイトカインと呼ばれるペプチド性の炎症関連分子が生じる。これらは、自身で炎症を惹起する他に、免疫を活性化し、それによって炎症反応を増幅する。炎症は本来刺激が無くなると終息するが、往々に遷延する。がんを含む多くの病気には基礎的病態として炎症の慢性化があり、それが原因疾患を増強すると考えられている。本研究の狙いは、急性炎症が慢性化するメカニズムを、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である。

以下に平成25年度の実績を説明する。

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 本研究の対象疾患の一つが脳動脈瘤である。脳動脈瘤はくも膜下出血の主要な原因で、脳動脈の分岐部に起こる慢性血管炎症である。我々は、この部位で、PGの一種であるPGE₂がその受容体であるEP2に働いて炎症のマスター転写因子であるNF κ Bを活性化して、自身の合成酵素であるCOX-2の誘導を行い、炎症を慢性化することを見出していた。本年度は、脳動脈瘤組織でNF κ B活性化をおこなっている細胞が血管の内皮細胞と血管に浸潤しているマクロファージであることを見出し、マクロファージでのNF κ B活性化を抑制することで、脳動脈瘤の進展を防止出来る可能性を見出した。

② 本研究では、PGによる炎症慢性化の機序の一つとしてPGの免疫炎症への関与を検討している。上述したように、サイトカインは免疫を賦活化するが、この機序の一つが免疫担当細胞の分化と増幅である。免疫炎症に関係する免疫担当細胞としては、Th1細胞とTh17細胞があり、これらは、例えば、多発性硬化症、クローン病、乾癬、リウマチ性関節炎などに関わっている。我々は、マウスで、PGE₂がTh1細胞の分化やTh17細胞の増幅を促進することを見出していたが、本年度は、その機序として、PGE₂がTh1細胞分化を引き起こすIL-12というサイトカインの受容体IL-12受容体 β 2遺伝子の発現誘導を起こしてTh1細胞分化を促進していることを明らかにし、そのメカニズムを同定した。さらに、Th17細胞の増幅過程でもPGE₂がここに関わるIL-23の受容体の遺伝子発現の亢進をおこなっていることを見出した。ついで、これらのメカニズムが、マウスの腸炎、アレルギー性脳脊髄炎、乾癬モデルで働いていることを示した。さらに、上記のIL-23そのものもPGE₂によって発現誘導を受けることを見出し、そのメカニズムを解析した。最後に、炎症に限らず、生物現象が永續するためには、それに関連する遺伝子のゲノム構造が変化することが必要であるが、我々は、免疫担当細胞であるT細胞をPGE₂で刺激することによりヒストンのメチル化が制御されることを見出した。これらの結果は、炎症が免疫機序によって慢性化する過程にPGがサイトカインの作用を増幅して関与していることを示したものであり、免疫病におけるPG受容体作用薬の新規標的の可能性を明らかにしたものである。

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 最近の研究で、さまざまながんが慢性炎症を伴っており、炎症ががんの発症、進展に大きな影響を及ぼしていることが明らかになっている。本研究では、慢性炎症が腫瘍形成を促進する炎症性大腸がんモデルを用い、PGE受容体EP2がこのモデルでの腫瘍形成に必須であること、EP2は腫瘍部位に遊走する好中球に主に発現していることを見出した。本年度は、EP2刺激がサイトカインと協調して好中球での炎症性サイトカインや好中球走化因子の発現を誘導して好中球主体の慢性炎症を自己増幅していることを明らかにした。

② NASHにおけるPGの関与と働きの解析

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、メタボリック症候群などに認められる脂肪肝を基に発症

する慢性肝炎である。その原因は不明であるが、肝臓での酸化ストレスの亢進などの関与が指摘されている。また、NASHは高率に肝硬変や肝がんを発症し、近年NASH患者が急増していることから、その病態解明や治療法の確立が急務となっている。本研究では、マウスのNASH病態モデルにPG受容体欠損マウスと野生型マウスを供し、NASHの発症におけるプロスタグランジン(PG)の役割を解析している。成果の一つとしてPGの一種、PGI₂がNASH病態の進行を抑制することを見出した。この研究は、NASHの病態解明や治療法の確立に貢献することが期待される。

③ うつ病モデルにおけるPGの関与と働きの解析

うつ病の患者数は我が国だけでも年間100万にも昇り大きな社会問題である。うつ病患者の血中ではサイトカインやPGレベルの上昇が見られ、PG合成を阻害する非ステロイド性抗炎症薬が抗うつ作用を示すことも報告されている。これらのことから、我々は、うつ病が脳内炎症による病気であるという仮説を立てて研究を行っている。本研究では、本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している。前年度までに、反復ストレスによる抑鬱誘導にPGE₂とその受容体EP1による前頭前皮質ドーパミン系の抑制が必須であることを示し、この過程にミクログリア由来のPGE₂が関与することを示唆した。また、網羅的遺伝子発現解析をもとに、反復ストレスによる情動変容に新たな自然免疫分子が必須である可能性を見出している。本年度は、反復ストレスによる前頭前皮質でのミクログリア活性化や神経細胞の機能的・形態的变化における自然免疫分子の役割を解析した。

3. 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

上述したように本研究ではPGの炎症慢性化への関与とそのメカニズムを解析しているが、これらによって明らかにされたPG作用を制御する特異的な薬物の開発には標的であるPG受容体の立体構造の情報が役立つと考えられる。本研究では、そのため、PG受容体のX線結晶構造解析を試みている。本年度は、EP4受容体を対象としその細胞内第3ループをT4リゾチーム(T4L)に置き換えた変異体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を結合させ、アンタゴニストの結合した不活性型受容体・抗体複合体の結晶化を試みた。その結果、~6 Åの結晶が得られた。現在、結晶化条件の最適化を試みている。さらに、アゴニストの結合したEP4受容体(活性型)の立体構造を安定化する抗体を取得するために、アゴニストの結合したEP4受容体発現細胞をEP4受容体欠損マウスに免疫し、立体構造認識抗体の作製を試みている。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報 (国際)

1. 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.* vol.4, pp1685-1698, 2013 (doi: 10.1038/ncomms2684)
2. Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Nishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb MH, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M. “Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A₂-prostaglandin D₂-DP1 receptor paracrine axis”, *Nat Immunol.* vol. 14(6) pp554-563. 2013
3. Aihara K, Handa T, Oga T, Watanabe K, Tanizawa K, Ikezoe K, Taguchi Y, Sato H, Chin K, Nagai S, Narumiya S, Wells AU, Mishima M. “Clinical relevance of plasma prostaglandin F_{2α} metabolite concentrations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis”, *PLoS One.* vol.8(6), e66017, 2013, (doi:10.1371/journal.pone.0066017)
4. Singh N, Ma B, Leonardo CC, Ahmad AS, Narumiya S, Doré S. “, *Neurotox Res.* Vol.24(4), pp549-559, 2013 (doi: 10.1007/s12640-013-9410-7)
5. Toyoda, Y., Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Nishimaru, H., Hioki, H., Kaneko, T., Ishizaki, T., Furuyashiki, T. and Narumiya, S. “EphA4-dependent axon retraction and midline localization of Ephrin-B3 are disrupted in the spinal cord of mice lacking mDia1 and mDia3 in combination.” *Genes Cells*, vol.18(10), pp873-885, 2013. (doi:10.1111/gtc.12081)
6. Ehrlich, A.T., Furuyashiki, T., Kitaoka, S., Kakizuka, A. and Narumiya, S. “Prostaglandin E receptor EP1 forms a complex with dopamine D1 receptor and directs D1-induced cAMP production to adenylyl cyclase 7 through mobilizing Gβγ subunits in human embryonic kidney 293T cells.” *Mol. Pharmacol.* Vol.84(3), pp476-486, 2013. (doi:10.1124/mol.113.087288)

7. Shiraishi N, Nomura T, Tanizaki H, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K. "Prostaglandin E₂-EP3 axis in fine-tuning excessive skin inflammation by restricting dendritic cell functions." *PLoS One*. vol.8(7), e69599, 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0069599)

8. Ueta M, Mizushima K, Naito Y, Narumiya S, Shinomiya K, Kinoshita S. "Suppression of polyI:C-inducible gene expression by EP3 in murine conjunctival epithelium." *Immunol Lett*. 2013(doi:pil: S0165-2478(13)00121-1. 10.1016/j.imlet.2013.08.010.)(in press)

9. Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, Nakajima S, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K. "Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression." *J Allergy Clin Immunol*. vol.133(1), pp139-146, 2013 (doi:pil: S0091-6749(13)01152-4. 10.1016/j.jaci.2013.07.027.)

10. Sarashina H, Tsubosaka Y, Omori K, Aritake K, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H, Murata T. "Opposing Immunomodulatory Roles of Prostaglandin D₂ during the Progression of Skin Inflammation." *J Immunol*. vol.22014 ,pp459-65,2013 (doi: 10.4049/jimmunol.1302080.)

11. Watanabe S, De Zan T, Ishizaki T, Yasuda S, Kamiyo H, Yamada D, Aoki T, Kiyonari H, Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M, Goshima G, Narumiya S. "Loss of a Rho-Regulated Actin Nucleator, mDia2, Impairs Cytokinesis during Mouse Fetal Erythropoiesis." *Cell Rep*. vol. 5(4) pp926-932, 2013 (doi:10.1016/j.celrep.2013.10.021.)

12. Glushakov AV, Robbins SW, Bracy CL, Narumiya S, Doré S. "Prostaglandin F_{2α} FP receptor antagonist improves outcomes after experimental traumatic brain injury." *J Neuroinflammation*. Vol.10, p132, 2013 (doi: 10.1186/1742-2094-10-132.)

13. Sugita K, Ikenouchi-Sugita A, Nakayama Y, Yoshioka H, Nomura T, Sakabe J, Nakahigashi K, Kuroda E, Uematsu S, Nakamura J, Akira S, Nakamura M, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K. "Prostaglandin E₂ is critical for the development of niacin-deficiency-induced photosensitivity via ROS production." *Sci Rep*. vol. 3, p2973, 2013 (doi: 10.1038/srep02973. PMID: 24131900)

14. Mohan S, Glushakov AV, Decurnou A, Narumiya S, Doré S. “Contribution of PGE2 EP1 receptor in hemin-induced neurotoxicity.” *Front Mol Neurosci*. Vol.6:31, 2013 (doi: 10.3389/fnmol.2013.00031.)
15. Kawakami Y, Hirano S, Kinoshita M, Otsuki A, Suzuki-Yamamoto T, Suzuki M, Kimoto M, Sasabe S, Fukushima M, Kishimoto K, Izumi T, Oga T, Narumiya S, Sugahara M, Miyano M, Yamamoto S, Takahashi Y. “Neutralization of leukotriene C₄ and D₄ activity by monoclonal and single-chain antibodies.” *Biochim Biophys Acta*. Vol.1840(6), pp1625-1633. (doi: 10.1016/j.bbagen.2013.12.016.)
16. Nomachi A, Yoshinaga M, Liu J, Kanchanawong P, Tohyama K, Thumkeo D, Watanabe T, Narumiya S, Hirata T. “Moesin Controls Clathrin-Mediated S1PR1 Internalization in T Cells.” *PLoS One*. vol. 8(12), e82590, 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0082590. eCollection 2013.)
17. Morimoto K, Shirata N, Taketomi Y, Tsuchiya S, Segi-Nishida E, Inazumi T, Kabashima K, Tanaka S, Murakami M, Narumiya S, Sugimoto Y. “Prostaglandin E2-EP3 Signaling Induces Inflammatory Swelling by Mast Cell Activation” vol. 192(3), pp1130-1137, 2014 (doi: 10.4049/jimmunol.1300290. Epub 2013 Dec 16.PMID:24342806)