

「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

H26 年度 実績報告書

成宮 周

京都大学大学院医学研究科
特任教授

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、特任教授)
- ② 研究項目
 - ・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

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 26 年度の研究実施概要を説明する。

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 EP2-cAMP 系による COX-2/NFκB 増幅経路の解析

前年度までに、EP2 刺激による NFκB 活性化機構や mRNA 安定化作用など EP2 経路が炎症反応を制御する機構を明らかとするとともに、脳血管の慢性炎症疾患である脳動脈瘤において病態形成を担う炎症の主体となる NFκB 活性化細胞がマクロファージであることを明らかとした。本年度は、モデル動物を使用しマクロファージでの EP2-NFκB 経路が慢性炎症反応を制御し脳動脈瘤形成を担うことを明らかとした。また、EP2 阻害薬の脳動脈瘤治療薬としての可能性をモデル動物を使用し確認した。

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

前年度までに、PGE₂-EP2/EP4 経路が、IL-12 受容体の発現誘導を介して Th1 細胞分化を促進すること、IL-23 受容体の発現誘導を介して TGFβ/IL-6 により誘導した Th17 細胞増殖に関わること、この両者の作用が cAMP 産生の下流で形成される CREB/CRTC2 転写因子複合体により介達されることを示した。本年度は、PGE₂-EP2/EP4 経路による IL-23 受容体の発現誘導に必要な新規蛋白質の同定のための検討を進めた。また、IL-23 依存的なマウス皮膚炎モデルでの PGE₂-EP2/EP4 経路の重要性も確認した。さらに、炎症慢性化機構として PG によるエピゲノム制御の可能性を検討し、PG 刺激によりヒストンのメチル化が制御されることを確認するとともにこの経路の標的遺伝子の同定を行った。

③ EP4-cAMP 系による IL-23 遺伝子誘導機構の解析

前年度までに、樹状細胞から分泌される主要なサイトカイン IL-23 の発現誘導機構を解析し、CD40 経路と EP4-cAMP-PKA 経路の協調作用により IL-23 p19 サブユニットの遺伝子発現が誘導されることを明らかとした。本年度は、この二つの経路の協調作用の分子機序を解析し、CD40 の下流では刺激初期では canonical NFκB 経路がそして刺激が持続した段階では non-canonical NFκB 経路が寄与するという刺激の時間経過に伴い情報伝達経路の変換が生じることを明らかとした。

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

前年度までに、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、PG 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 が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。また、EP2 刺激が他の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発

現を誘導すること、好中球走化因子 CXCL-1 の誘導を介し自己増幅的に好中球の遊走を促進することを明らかにした。本年度は、さらに EP2 の発現細胞として大腸がん細胞周囲に存在する筋線維芽細胞 (Tumor-associated fibroblast, TAF) を同定し、この細胞種でも好中球同様に EP2 刺激と他のサイトカインとの協調作用が存在することを見出した。さらに、選択的 EP2 阻害薬がこのモデルでの腫瘍形成を抑制できることを確認し EP2 の薬物治療の標的因子としての可能性を見出した。

② NASH における PG の関与と働きの解析

NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) の病態モデルであるメチオニン・コリン欠乏食 (MCD) 負荷動物を使用し、IP 欠損マウスでの NASH 病態の進展、それに伴う酸化ストレスの亢進や肝臓での鉄の過剰蓄積を確認した。また、IP 欠損マウスでの MCP-1 や TNF- α の発現亢進を見出した。一方、IP アゴニストが MCP-1 や TNF- α の発現抑制を介して炎症性細胞の浸潤を著明に抑え、結果 NASH 病態の進展を抑制することを確認した。また、IP 以外の PG 受容体欠損マウスおよび PG 受容体選択的薬物を投与したマウスに、MCD 負荷を与えることにより IP 以外の PG 受容体の NASH 病態への関与の検討を開始した。この研究成果は、炎症慢性化機構の解明という目標に貢献するのみならず、急増しつつある NASH 患者の治療戦略という見地から社会的なインパクトも大きいと考えられる。

③ うつ病モデルにおける PG の関与と働きの解析

うつ病患者の血中サイトカインや PG の上昇、非ステロイド性抗炎症薬の抗うつ作用から、うつ病における炎症の関与が提唱されてきた。本研究項目では、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て、うつ病の脳内炎症仮説を検証している。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パミン系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。EP1 受容体による G $\beta\gamma$ サブユニットを介したドパミン D1 受容体制御機構も示し、さらに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ことを見出している。本年度は、反復ストレスによる前頭前皮質の神経細胞やミクログリアの機能変化に自然免疫分子が必須であることを示し、自然免疫分子の作用する脳領域や細胞種の同定するための実験系を準備した。

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。昨年度に引き続き、既に得られている EP4 受容体/抗体複合体結晶の分解能を向上させることを目指した。既に得られた結晶化条件の最適化を行いながら、結晶化に使用する EP4 受容体の新しいコンストラクトも設計した。これまでに第 3 細胞内ループを T4 リゾチーム (T4L) に置き換えた変異体に EP4 受容体の細胞外領域にある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 EP4 受容体 (不活性型) / 抗体複合体の結晶化を行ってきた。今年度は、これ以外に第 3 細胞内ループから T4 リゾチームを除去し、野生型と比較してループの長さを全体的に短くした。その結果、新たな結晶を獲得することができ、分解能も ~ 6 Å から ~ 4.5 Å に向上した。