

M Tris-HCl (pH 7.6). Positive control sections were examined under a microscope to monitor the efficiency of immunostaining. The sections were washed 3 times with distilled water for 5 min each time. Following dehydration, the sections were cover-slipped using HSR liquid (Sismex, Kobe, Japan). For double-immunostaining, sections were treated at the end of the first incubation cycle with 0.5% H₂O₂ for 30 min to eliminate any residual peroxidase activity. The second cycle was then carried out similarly to the first, except that nickel ammonium sulfate was omitted from the DAB solution.

For immunofluorescence staining, sections were blocked with skim milk. After they were incubated with mixed primary antibodies for 48 hr at 4°C, the following secondary antibodies were used: first, fluorescein isothiocyanate-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (diluted 1: 1000, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) for 2 hr at room temperature, and then biotinylated donkey anti-mouse IgG antibody (diluted 1: 1000, Jackson Immuno Research) for 2 hr at room temperature. The biotinylated secondary antibody treatment was followed by incubation with Texas-Red dye-conjugated streptavidin (diluted 1:1000, Jackson Immuno Research) for 1 hr at room temperature.

In this study, the following antibodies were used for immunostaining: rabbit polyclonal antibodies for mPGES-1 (diluted 1:500, Cayman, Ann Arbor, MI), mPGES-2 (diluted 1:500, Cayman) and cPGES (diluted 1:500, Cayman) and mouse monoclonal antibodies 82E1 (diluted 1:500, IBL, Gunma, Japan) and an antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP) were used to detect A β and astrocytes, respectively.

Results

PGES immunostaining

Anti-mPGES-1 antibody recognizes the amino acid sequences 59-75 of human microsomal PGE synthase-1. mPGES-1-immunoreactive cells were observed in neurons in limited areas of brains of Tg2576 and control mice. In addition, mPGES-1 expression was found around A β plaques in Tg2576 (Fig. 1, A, D). Staining was particularly evident in areas of dense A β plaques. In order to determine the cells with mPGES-1 expression, double-immunostaining was carried out using antibodies specific to each cell marker, and the mPGES-1-stained cells were found to be GFAP-positive astrocytes (Fig. 2).

Anti-mPGES-2 antibody recognizes amino acid sequence 221-235 of human microsomal PGE synthase-2. The mPGES-2-immunoreactive cells were observed in whole brain of Tg2576 and control mice. The mPGES-2 was mainly expressed in neurites, in partial cell bodies in cortex and neurites in the hippocampus. mPGES-2 was found not to be associated with A β plaques (Fig. 1, B, E).

Anti-cPGES antibody recognizes amino acid sequence 58-67 of human cytosolic PGE synthase. The cPGES-immunoreactive cells were observed in whole brain of Tg2567 and control mice. cPGES was found not to be associated with A β plaques (Fig.1 C, F).

A β plaques

Anti-human A β antibody (82E1) recognizes the N-terminal of human A β (1-16), and revealed amyloid plaques in Tg2576 mice aged 16 months. A β plaques were found in the hippocampus and cortex, and concentrations were particularly large in the latter. A β immunostaining was not observed in the age-matched control mice.

Astrocytes

The antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP) reacted with an intermediate filament protein specific to astrocytes. GFAP is up-regulated in reactive astrocytes, and in our study, GFAP-immunoreactive cells were observed in both Tg2576 and controls. In the former, astrocytes that were intensely immunoreactive for GFAP were found surrounding the A β plaques.

Discussion

The results of our experiments indicated that the expression of mPGES-1 was associated with A β plaques in the brains of Tg2576 mice. Although, the other types of PGES were constitutively expressed in the brains of Tg2576 and control mice, their expression in Tg2576 was not associated with A β plaques. IL-6 expression in Tg2576 was observed in astrocytes surrounding these plaques, and the expression of mPGES-1 was similar to that of other inflammatory cytokines [14]. In addition, it was previously reported that the expression of mPGES-1 was induced by A β stimulus in an *in vitro* study [15]. Our results

suggest that the production of PGE₂ through mPGES-1 is increased in the vicinity of A β plaques in the AD brain. The incremental rise in the PGE₂ level noted in the cerebrospinal fluid of AD patients supports our results [11].

Brains of aged Tg2576 mice mimic aspects of the human AD brain, including synaptic loss, dystrophic neurites, gliosis associated with A β plaques and memory impairment. PGE₂ can induce inflammatory cytokines [16] which may cause local injury of neurons. Some reports have demonstrated that PGE₂ induces caspase-dependent apoptosis *in vitro* [17-19], while others have shown that PGE₂ has a protective effect against A β toxicity [20]. Although the effects of PGE₂ have been controversial, a recent study has shown that mPGES-1 knockout mice undergo attenuated ischemia-induced production of PGE₂ and the formation of brain infarctions [21]. PGE₂ is sequentially synthesized from arachidonic acid by COX and PGES, the latter of which consists of three types: mPGES-1, mPGES-2 and cPGES. In several inflammatory conditions, mPGES-1 is functionally coupled with inducible COX-2 resulting in PGE₂ production. mPGES-2 is coupled with both COX-1 and -2 to produce PGE₂. cPGES coupled with COX-1 contributes to the rapid production of PGE₂. We have shown that the expression of mPGES-1 in Tg2576 mice is associated with neuropathological hallmarks of AD. Inhibition of COX activity aborts the production of prostaglandins and therefore long-term use of NSAIDs can cause gastrointestinal disturbances and other adverse effects. In contrast, inhibition of mPGES-1 would have the advantage of not interfering with the production of other prostaglandins.

Conclusion

In an animal disease model, targeting mPGES-1 reduced the severity of rheumatoid arthritis and the formation of inflammatory granulation tissue [22]. Therefore inhibiting mPGES-1 could be a good approach for combatting chronic inflammatory disorders. Targeting mPGES-1 in AD patients may also bring about beneficial states without inducing any of the obvious adverse effects which are observed with the use of NSAIDs.

Acknowledgements

We thank Dr. William & Catherine Campbell for English editing of the manuscript.

References

- [1] Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1982; **57**: 239-242.
- [2] Ishii T, Haga S. Immuno-electron-microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol (Berl)* 1984; **63**: 296-300.
- [3] McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; **21**: 195-218.
- [4] in t' Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2001; **345**: 1515-1521.
- [5] Landi F, Cesari M, Onder G, Russo A, Torre S, Bernabei R. Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) use and Alzheimer disease in community-dwelling elderly patients. *Am J Geriatr Psychiatry* 2003; **11**: 179-185.
- [6] Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 1997; **48**: 626-632.
- [7] Zandi PP, Anthony JC, Hayden KM, Mehta K, Mayer L, Breitner JC. Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study. *Neurology* 2002; **59**: 880-886.
- [8] Yermakova AV, Rollins J, Callahan LM, Rogers J, O'Banion MK.

- Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: 1135-1146.
- [9] Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res* 1999; **830**: 226-236.
- [10] Fujimi K, Noda K, Sasaki K, Wakisaka Y, Tanizaki Y, Iida M *et al.* Altered expression of COX-2 in subdivisions of the hippocampus during aging and in Alzheimer's disease: the Hisayama study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007; **23**: 423-431.
- [11] Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, Markesbery WR, Marnett LJ, Roberts LJ, 2nd *et al.* Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. *Neurology* 1999; **53**: 1495-1498.
- [12] Kudo I, Murakami M. Prostaglandin synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 2005; **38**: 633-638.
- [13] Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; **21**: 372-381.
- [14] Benzing WC, Wujek JR, Ward EK, Shaffer D, Ashe KH, Younkin SG *et al.*

Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice.

Neurobiol Aging 1999; **20**: 581-589.

- [15] Satoh K, Nagano Y, Shimomura C, Suzuki N, Saeki Y, Yokota H. Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci Lett* 2000; **283**: 221-223.
- [16] Utsunomiya I, Nagai S, Oh-ishi S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. *Eur J Pharmacol* 1994; **252**: 213-218.
- [17] Takadera T, Yumoto H, Tozuka Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett* 2002; **317**: 61-64.
- [18] Takadera T, Ohyashiki T. Prevention of rat cortical neurons from prostaglandin E2-induced apoptosis by glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Neurosci Lett* 2006; **400**: 105-109.
- [19] Takadera T, Ohyashiki T. Prostaglandin E2 deteriorates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated cytotoxicity possibly by activating EP2 receptors in cultured cortical neurons. *Life Sci* 2006; **78**: 1878-1883.
- [20] Yagami T, Nakazato H, Ueda K, Asakura K, Kuroda T, Hata S *et al.* Prostaglandin E2 rescues cortical neurons from amyloid beta protein-induced apoptosis. *Brain Res* 2003; **959**: 328-335.
- [21] Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal

prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 11790-11795.

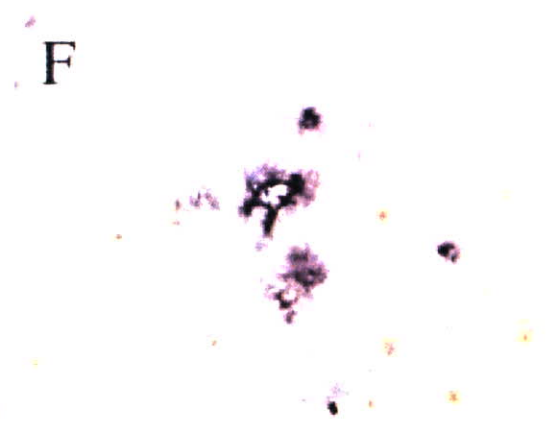
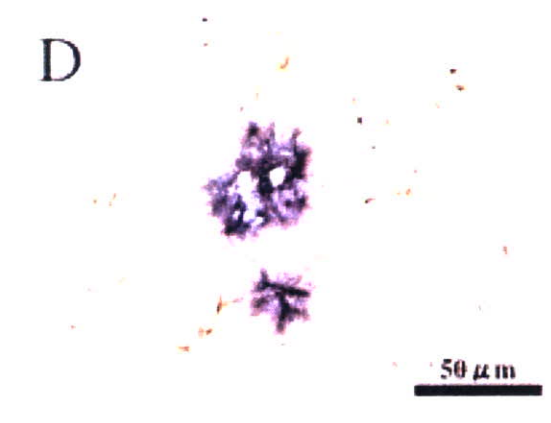
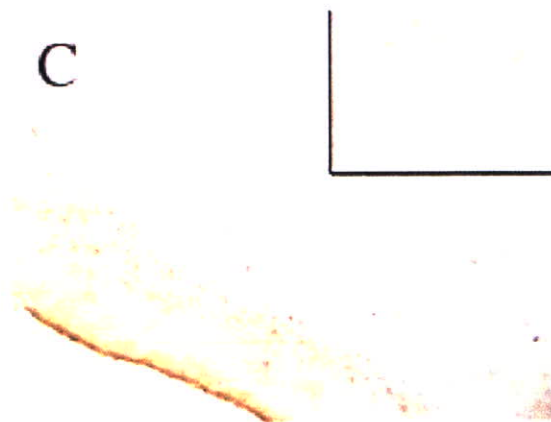
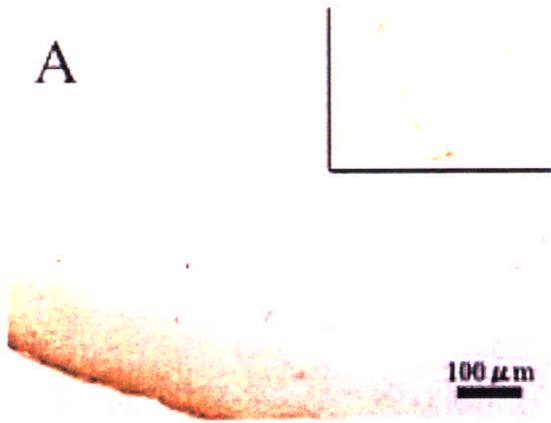
- [22] Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S *et al.* Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. *J Biol Chem* 2004; **279**: 33684-33695.

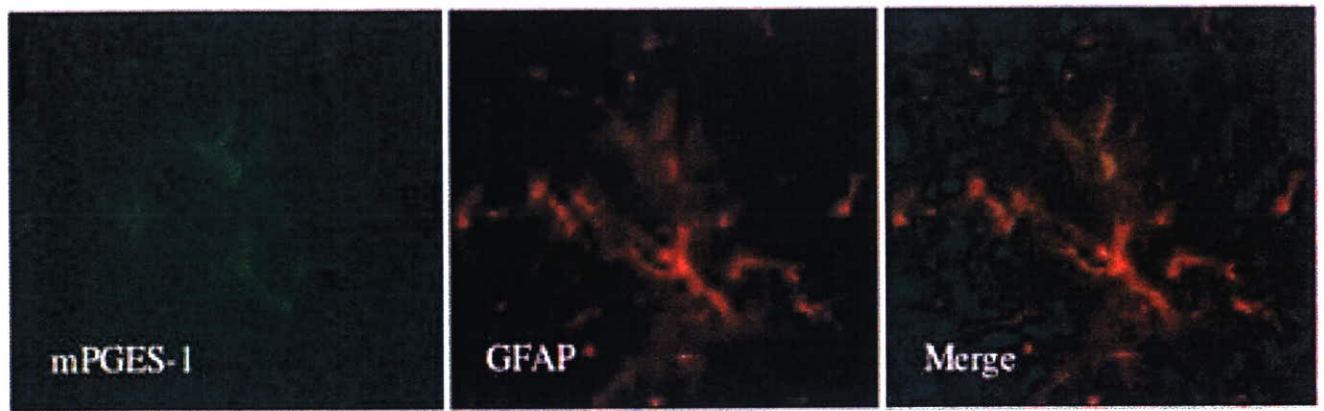
Legends to figures

Figure 1. Immunostaining with anti-PGES antibodies and anti-A β antibodies.

Photomicrographs illustrating the immunohistochemical staining of anti-mPGES-1 (A), anti-mPGES-2 (B) and anti-cPGES (C) antibody in Tg2576 mice. The inserts are each macrophotographs of the areas surrounding A β plaques. Double-immunostaining of PGES expression (brown) associated with A β plaques (dark purple). Scale bar: A-C, 100 μ m; D-F, 50 μ m.

Figure 2. Double-immunofluorescent staining with anti-mPGES-1 and anti-GFAP antibodies. Immunofluorescent staining of cells for mPGES-1 expressions (green), anti-GFAP antibody staining of reactive astrocytes (red) and the merged image.





特集 脂質の新たな機能を追う

PGE₂ 合成酵素の新展開New Insight into the Role of PGE₂ Synthases

中谷良人 亀井大輔 工藤一郎

Yoshihito Nakatani, Daisuke Kamei, Ichiro Kudo

PGE₂ 合成酵素 (PGES) は PGE₂ 生合成系の最終段階である PGH₂ を PGE₂ に変換する過程を触媒する酵素で、同定が遅れていたが 1999 年以降相次いで cPGES/p23, mPGES-1, mPGES-2 の 3 つの分子種が発見された。最近、細胞内で各々の酵素が異なる刺激によって使い分けられていることが明らかになってきた。さらに遺伝子欠損マウスの解析から、cPGES/p23 は胎仔期の肺の発達、mPGES-1 は発痛や炎症性疾患、骨形成などに深く関与することがわかった。

key words

PGE₂, cPGES/p23, mPGES-1, mPGES-2

中谷良人 昭和大学薬学部 衛生化学教室 E-mail: nakatani@pharm.showa-u.ac.jp

1991 年東京大学薬学部卒業。1994 年同大学院薬学系研究科博士課程中退後、昭和大学薬学部助手。2000 年博士 (薬学) を授かり、専任講師に就任。

亀井大輔 昭和大学薬学部 衛生化学教室

工藤一郎 昭和大学薬学部 衛生化学教室



はじめに

PGE₂ (プロスタグランジン E₂) 合成酵素 (PGES) は PGE₂ 生合成系の最終段階である PGH₂ を PGE₂ に変換する過程を司る酵素で、現在までに、細胞質に存在する約 23kDa の cPGES/p23 と膜面に存在する 2 種類の mPGES (mPGES-1, mPGES-2) の 3 つの分子種が存在することが明らかになっている。cPGES/p23 と mPGES-1 についてはすでに遺伝子欠損マウスが作製されており、生体内での役割が解明されつつある。

I. cPGES/p23

1. 発見と酵素学的性質

筆者らはエンドトキシンの 1 つである LPS (リポポリサッカライド) を投与したラットの脳可溶性画分に無処置ラットのそれと比較して高い PGES 活性が存在することを見だし、cPGES/p23 を精製し、一次構造を決定することに成功した¹⁾。cPGES/p23 のリコンビナントタンパク質を用いた解析により、PGES 活性の発現にグルタチオン (GSH) が必須であり、GSH S-トランスフェラーゼ (GST) の基質の 1 つである 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) により酵素活性がほぼ完全に阻害されることがわかった。これらの性質はラット脳可溶性画分に検出された PGES 活性の特徴と類似していた。ラットにおける臓器分布を検討した結果、広範な臓器に恒常的に発現していることがわかったが、脳では LPS 投与による遺伝子発現の上昇が観察された。さらに、cPGES/

p23 は常在型酵素であるシクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) とカップリングして、即時的な PGE₂ 産生に関与することを見出した (図 1)。また、cPGES は ATP が結合した熱ショックタンパク質 Hsp90 に会合するタンパク質である p23 と同一分子であり²⁾、筆者らは cPGES/p23 の酵素活性が Hsp90 との結合により上昇すること³⁾、プロテインキナーゼ CK2 により cPGES/p23 の 113 番目と 118 番目の Ser が両方ともリン酸化を受けると、活性の上昇ならびに Hsp90 との結合の亢進が起こり活性化状態になることを明らかにした⁴⁾。

2. 生体内機能

最近、筆者らは cPGES/p23 欠損マウスを樹立した結果、へ

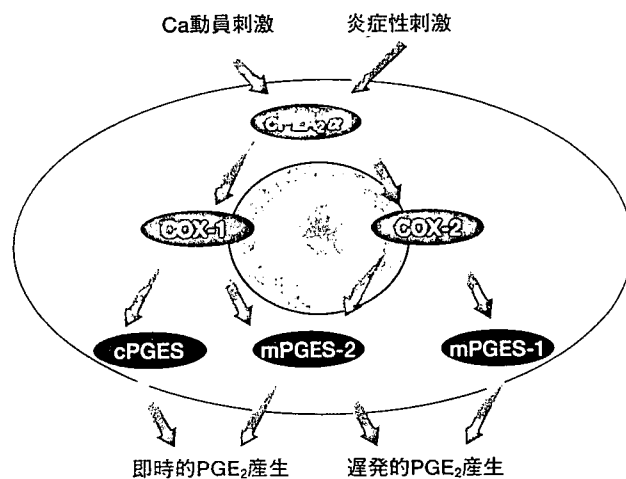


図 1. PGE₂ 生合成酵素群の機能的関連の模式図

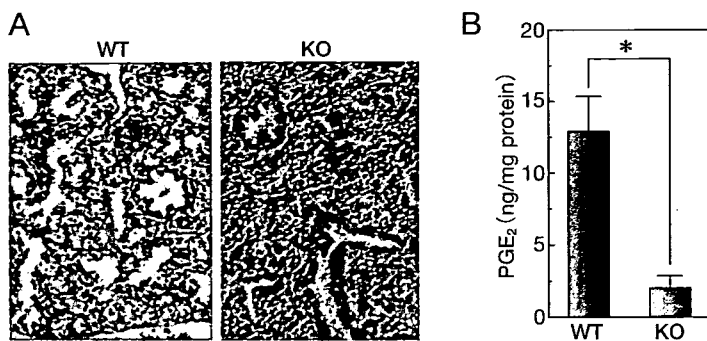


図2. cPGES/p23 はマウス胎仔の肺の発達に必須である 18.5dpc マウス胎仔の肺組織切片のHE染色像 (A) と肺組織含有 PGE₂ 量 (B). cPGES/p23 欠損マウスで肺胞形成の不全と肺組織内 PGE₂ 産生量の低下が観察された. *; P < 0.05. Nakatani Y, et al: Biochem Biophys Res Commun (2007) 362: 387-392 より改変.

テロ欠損マウスは正常に発育し生殖機能にも異常は見られなかったが、ホモ欠損マウスは出生直後に死に至ることがわかった⁵⁾。そこで胎仔の解析を行うと、周産期の欠損マウス胎仔は野生型マウスに比べて有意に体重が軽いことがわかった。また、cPGES/p23 欠損マウス胎仔より調製した初代培養繊維芽細胞の細胞増殖を調べた結果、野生型よりも有意に遅く、cPGES/p23 が正常な細胞増殖に必要であることが示唆された。さらに興味深いことに、cPGES/p23 欠損マウス胎仔の表皮と肺で形態的に顕著な異常が見られた。周産期の cPGES/p23 欠損マウス胎仔の皮膚には光沢があるが、組織切片を観察すると角質形成が不十分で、表皮が非常に薄い。ケラチノサイトの増殖を PGE₂ が促進することが報告されていることから、表皮形成に cPGES/p23 由来の PGE₂ が重要であることが想定される。次に、出生直前の 18.5 日 (dpc) の cPGES/p23 欠損マウス胎仔は母体から摘出した後、自発呼吸を開始せず死に至る。そこで、胎仔肺の組織切片を作製し観察した結果、野生型マウスではすでに肺胞の形成が始まっており多数の空胞が形成されていたが、cPGES/p23 欠損マウスでは空胞がほとんど観察されなかったことから、致死の原因は肺の形成不全であると考えられた (図2A)。以上の結果から、cPGES/p23 は、マウス胎仔の皮膚や肺の正常な分化や増殖に必要な不可欠であることが明らかになった。

さらに、胎仔肺組織中の PGE₂ 含有量を測定した結果、野生型マウスと比べて cPGES/p23 欠損マウスの肺の PGE₂ 量は著しく低値を示した (図2B)。一方、形態的に大きな異常が見られなかった心臓や肝臓の含有 PGE₂ 量は cPGES/p23 欠損マウスと野生型マウスでほとんど差がなかった。したがって、マウス胎仔の肺組織中の PGE₂ 合成は主に cPGES/p23 を介して行われ、産生された PGE₂ が肺の正常な発達に重要であることが予想された。

筆者らとほぼ同時期に D. Picard らも cPGES/p23 欠損マウスの作製に成功しており、周産期致死であることや皮膚や肺における形態的な異常などの表現型は筆者らの結果とよく一致していた⁶⁾。cPGES/p23 は Hsp90 に結合してステロイドホルモン受容体のような細胞内受容体の機能の維持

に関わることが知られているので、彼らは cPGES/p23 のコシャペロンとしての機能を重視し、cPGES/p23 欠損マウスではグルココルチコイドを介したシグナリングが減弱し、サーファクタントタンパク質などの発現が低下するため、肺の形成不全が起こることを予想している。

これまでに PGE₂ 合成に関わる様々な酵素や PGE₂ 受容体の欠損マウスが作製され、解析されてきた。COX-1/COX-2 のダブル欠損マウスや EP4 受容体欠損マウスは出生後数日以内に動脈管開存症⁷⁾で死に至ることが報告されている^{7), 8)}。しかし、cPGES/p23 の場合のように出生直後に死に至るという重篤な表現型を示すものは報告されていない。cPGES/p23 が PGE₂ 産生に寄与することに加えて、分子シャペロン機構への寄与もあるために、生体にとって必須で代替できない重要な機能を持つのであろう。

II. mPGES-1

1. 発見と酵素学的性質

遺伝子データベースに MGST1-L1 の名称で登録されていた EST クローンが PGE₂ 合成酵素活性を有することが報告された⁹⁾。mPGES-1 は cPGES/p23 と一次構造上の相同性は示さないが GSH 依存性で分子量は約 15kDa であった。ヒトにおいて恒常的に胎盤、精巣、乳腺、膀胱および前立腺に高い遺伝子発現が、小腸および結腸などの臓器に低い発現が検出されているが、その他の臓器では通常状態でほとんど発現が見られない。mPGES-1 は炎症刺激で強く発現誘導されることが知られており、例えば、ヒト肺癌由来細胞である A549 細胞を IL-1β で刺激すると mPGES-1 の発現が上昇することが示されている。また、筆者らはラット腹腔マクロファージを LPS で処理した際に mPGES-1 の遺伝子発現が誘導されることを観察している。mPGES-1 は活性発現に GSH が必要であるが、CDNB による阻害を受けない。蛍光抗体染

注1 大動脈と肺動脈をつなぐ動脈管は、子宮の中では開いているが、生まれるとすぐに閉じてしまう。これが開いたままになってしまう疾患。

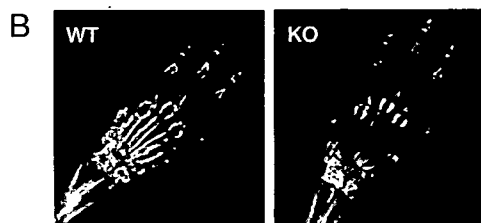
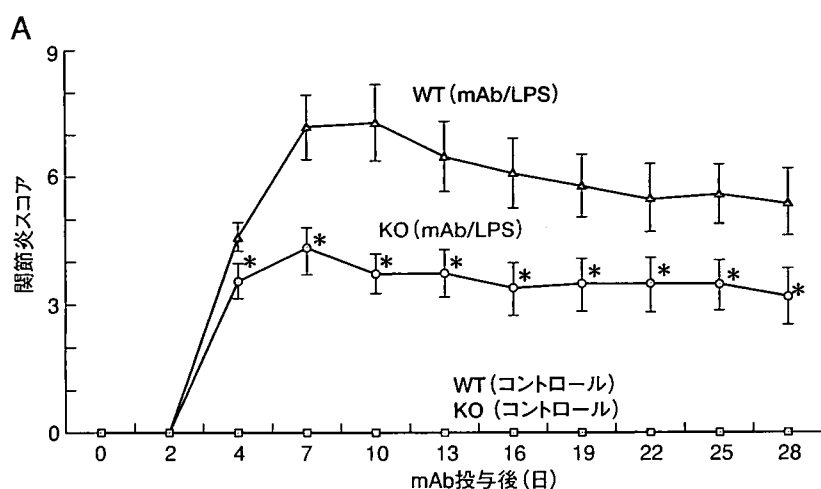


図3. mPGES-1は炎症性関節破壊に関与する
 A: 抗コラーゲン抗体 (mAb) 誘導関節炎の経時的評価。mPGES-1欠損マウス (KO) では症状の緩和が見られる。
 * ; $P < 0.05$ 。
 B: 抗コラーゲン抗体投与28日後の前肢のX線画像。mPGES-1欠損マウスでは骨破壊の抑制が見られる。
 Kamei D, et al: J Biol Chem (2004) 279: 33684-33695より改変。

色によりmPGES-1は核周縁部の膜に局在することがわかった。また、筆者らはmPGES-1が上流のCOX-2と機能関連してPGE₂産生に関与することを明らかにしており¹⁰⁾(図1)、実際にヒトの大腸癌、乳癌組織や胃潰瘍組織においてCOX-2とmPGES-1の共発現が観察されている。興味深いことに、COX-2とmPGES-1を共発現させた細胞株では顕著なPGE₂産生の亢進が観察されるだけでなく悪性形質転換が起こることを見いだした¹⁰⁾。mPGES-1遺伝子のマウスおよびヒトにおける発現調節機構については、遺伝子上流100bp付近に存在する2つのGCボックスが必須であり、これらの部位に転写調節因子Egr-1 (early growth response-1) が結合することが報告された¹¹⁾。Egr-1は細胞増殖や炎症反応に密接に関連する遺伝子の発現調節を行うことが知られているので、mPGES-1によるPGE₂産生がこれらの現象に深く関与することが示唆される。

2. 生体内機能

mPGES-1ホモ欠損マウスは通常飼育状況では正常に発育し、生殖機能にも特に異常は見られなかったが、種々の病態下では野生型マウスと異なる応答が見いだされた。筆者らは、酢酸ライジング法^{注2)}を用いた急性疼痛モデル¹²⁾、綿糸移植法^{注3)}を用いた急性炎症モデル¹²⁾、抗コラーゲン抗体投与による慢性関節炎モデル¹²⁾(図3)、大腿骨骨折法を用いた骨再形成モデルなどの解析を行った結果、いずれの現象もmPGES-1欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に減弱していた。また、LPS投与による発熱¹³⁾や、脳虚血再灌流による脳卒中モデルにおける脳障害の程度が欠損マウスで減弱すること¹⁴⁾、LDL (低密度リポタンパク質) 受容体欠損マウスとのダブル欠損マウスにおける動脈硬化の軽減¹⁵⁾などが報告されている。したがって、疼痛の知覚、炎症性疾患、骨形成、発熱、脳梗塞や動脈硬化の発症と進展をmPGES-1

由来のPGE₂が促進することが明らかになった。

また筆者らは、発癌や癌の進展へのmPGES-1の関与も検討している。mPGES-1欠損マウスに培養癌細胞を移植し増殖を検討した結果、癌組織の増殖の遅延が観察された。さらに、培養癌細胞を静脈内投与した際の肺への転移もmPGES-1欠損マウスで有意に減少した。したがって、癌細胞の増殖や血行性転移にmPGES-1由来のPGE₂が寄与することが明らかになった。大腸ポリープの形成にEP2受容体を介した接着分子ラミニンBやVEGF (vascular endothelial growth factor) の発現誘導が関与することが示唆されている¹⁶⁾が、mPGES-1由来のPGE₂がどのような分子メカニズムで発癌を惹起するのかについてはいまだに明らかになっておらず、今後の課題の1つである。

3. 抗炎症薬の標的として

COX-2選択的阻害薬 (ロフェコキシブ) は副作用の少ない“夢の抗炎症薬”として期待されていたが、大規模臨床試験の結果、長期間の服用で急性心筋梗塞などの心血管系の疾患のリスクを有意に上昇することが明らかになり、2004年に市場から撤退するという事態に陥った。では次世代の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の開発につながる創薬ターゲットは存在するのか? 上述のように、炎症性疾患、発熱や発痛に関わるPGE₂の産生に主に寄与するmPGES-1が炎症性疾患の治療薬のターゲットとして期待が高まっている。すなわち、mPGES-1を特異的に抑制できれば、PGI₂やTXA₂ (トロンボキサンA₂) の産生に影響を与えずに、炎症や発痛を引き起こすPGE₂の生成を選択的に阻害することができるので、

注2 マウス腹腔内に酢酸を投与すると、苦悶症状 (ライジング) を示す。この反応を痛みの指標として行う試験。

注3 マウス背部皮下に1cm長の綿糸を移植し、綿糸周辺の炎症性肉芽の形成を評価する方法。

心血管系疾患のような重篤な副作用を起こさずに、抗炎症作用を発揮すると考えられる。今のところ、mPGES-1に対して強力で特異的な阻害作用を示す化合物は見つけられていないようであるが、mPGES-1が次世代NSAIDs開発の有力なターゲットの1つであることは間違いないであろう。

Ⅲ. mPGES-2

1. 発見と酵素学的性質

最近、ウシ心臓ミクロソーム画分から33kDaの膜結合型PGESが精製、同定された¹⁷⁾。mPGES-2は前述のcPGES/p23やmPGES-1とは異なりGSH非存在下でも有意な活性を発現し、GSHのみならず他の還元性化合物の存在下で活性が上昇する。cDNAから想定される全長は377アミノ酸であるが、翻訳後にプロセシングされ、成熟酵素ではN末端87アミノ酸が欠落している。mPGES-2は一次構造上GSTファミリーには属さないが、アミノ酸の104から120番目にチオレドキシシンやグルタレドキシシンのコンセンサス配列が存在し、N末端の疎水性アミノ酸に富む領域で膜に結合することが示唆されていた。最近、mPGES-2の結晶構造解析が行われ、ホモダイマーを形成しN末端側で膜リン脂質二重層に結合すること、

mPGES-2と造血器型PGDSの触媒部位の立体構造は非常に類似していることが明らかになった¹⁸⁾。mPGES-2を過剰発現した細胞株を用いた解析で、ゴルジ体でN末端部分がプロセシングされ、成熟型になり細胞質や核辺縁部に分布することが明らかになっている¹⁹⁾。mPGES-2はCOX-1とCOX-2の両方と機能関連してPGE₂産生に関わる(図1)。また、mPGES-2は様々な細胞や臓器に恒常的に発現しているが、例外的にヒト大腸癌に高い発現が見られることがある。

おわりに

他のプロスタノイドの最終合成酵素の同定に比べてPGE₂合成酵素の同定は遅れたものの、酵素学的解析、活性調節機構や細胞内での上流のCOXとの機能的関連などの解析が進み、最近になって遺伝子欠損マウスが作製され、生体にとっての重要性が解明され始めている。最も広範な細胞で生合成されるPGE₂が様々な生命現象や病態に関わることには疑問の余地がないが、これまでのPLA₂、COX、EP受容体の欠損マウスの解析に加え、PGES欠損マウスの解析でもその重要性が再認識されている。さらに、分子シャペロンとアラキドン酸代謝系の両方に関わるcPGES/p23の発見は新たな脂質の生理活性の解明への橋渡しになるかもしれない。

— 文献 —

- 1) Tanioka T, et al: J Biol Chem (2000) 275: 32775-32782
- 2) Johnson JL, et al: Mol Cell Biol (1994) 14: 1956-1963
- 3) Tanioka T, et al: Biochem Biophys Res Commun (2003) 303: 1018-1023
- 4) Kobayashi T, et al: Biochem J (2004) 381: 59-69
- 5) Nakatani Y, et al: Biochem Biophys Res Commun (2007) 362: 387-392
- 6) Grad I, et al: Mol Cell Biol (2006) 26: 8976-8983
- 7) Loftin CD, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98: 1059-1064
- 8) Segi E, et al: Biochem Biophys Res Commun (1998) 246: 7-12
- 9) Jakobsson PJ, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96: 7220-7225
- 10) Murakami M, et al: J Biol Chem (2000) 275: 32783-32792
- 11) Naraba H, et al: J Biol Chem (2002) 277: 28601-28608
- 12) Kamei D, et al: J Biol Chem (2004) 279: 33684-33695
- 13) Engblom D, et al: Nat Neurosci (2003) 6: 1137-1138
- 14) Ikeda-Matsuo Y, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103: 11790-11795
- 15) Wang M, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103: 14507-14512
- 16) Seno H, et al: Cancer Res (2002) 62: 506-511
- 17) Tanikawa N, et al: Biochem Biophys Res Commun (2002) 291: 884-889
- 18) Yamada T, et al: J Mol Biol (2005) 348: 1163-1176
- 19) Murakami M, et al: J Biol Chem (2003) 278: 37937-37947

COX-2/PGE₂合成経路の分子・生化学 2

COX-2の下流で機能する膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES-1)

亀井大輔 工藤一郎 村上 誠

かめい だいすけ：昭和大学薬学部 衛生化学，日本学術振興会特別研究員 (PD)，

くどう いちろう：昭和大学薬学部 衛生化学，

むらかみ まこと：同，東京都臨床医学総合研究所細胞膜情報伝達プロジェクト 1，PREST，JST

● はじめに

非ステロイド性消炎鎮痛薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) は解熱鎮痛抗炎症効果を示し，広く臨床の場で使用されているが，すべてのプロスタグランジン (PGs) 類の産生を一括遮断するための副作用の問題が深刻に議論されている。さらに近年，2種のシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) 分子種のうち誘導型の COX-2 に対する選択的阻害薬が開発されたが，重大な心血管系への副作用が判明し，NSAIDs の安全性への懸念は依然として解消されていない。

著者らはこれまでに COX の下流で PGE₂ 産生を特異的に制御する PGE 合成酵素 (PGES) を単離同定し，その機能解析を行ってきた。とりわけ COX-2 の下流で選択的に機能している膜結合型 PGES-1 (mPGES-1) が，発痛，炎症性疾患，がん，虚血性脳疾患などの増悪因子として機能していることが明らかになってきた。これらの知見は，mPGES-1 阻害薬が NSAIDs に代わる効果的な医薬品となりうる可能性を強く示唆している。本稿では，著者らによる mPGES-1 遺伝子欠損 (KO) マウスによる研究成果を中心に，他グループの知見をふまえ，mPGES-1 阻害薬の有効性，およびその問題点について概説する。

● プロスタグランジン E₂ 生合成経路と膜結合型 PGES-1

PGE₂ の生合成経路は，ホスホリパーゼ A₂ による膜グリセリン脂質からのアラキドン酸の遊離，COX によるアラキドン酸の PGH₂ への代謝，PGES による PGE₂ への異性化，という3段階の酵素反応からなる (図 1)。現在，PGES には細胞質型 PGES (cPGES)，mPGES-1，mPGES-2 の3種の分子種が同定されている¹⁾。

このうち mPGES-1 は，膜結合型グルタチオン-S-トランスフェラーゼファミリーに属する分子量 17kDa の核膜酵素で，3量体を形成する。酵素活性には 110 番目のアルギニン残基が必要で，さらにグルタチオンを補因子として要求する。本酵素はインターロイキン (IL)-1 やリポ多糖 (LPS) などの炎症性刺激により発現誘導され，この発現機構には TLR4/MyD88/NF-IL-6 経路が重要であるほか，転写因子 Egr-1 による転写制御が報告されている^{2,3)}。mPGES-1 の最も興味深い特徴は，生体内において主に COX-2 (誘導型 COX) と比較的選択的に機能連関して，遅発的 PGE₂ 産生に寄与していることである⁴⁾。病理学的解析においても，さまざまな疾患の病変部位に COX-2 と mPGES-1 の共発現が認められている^{1,5,6)}。このことから各種病態下における PGE₂ 産生には，COX-2/

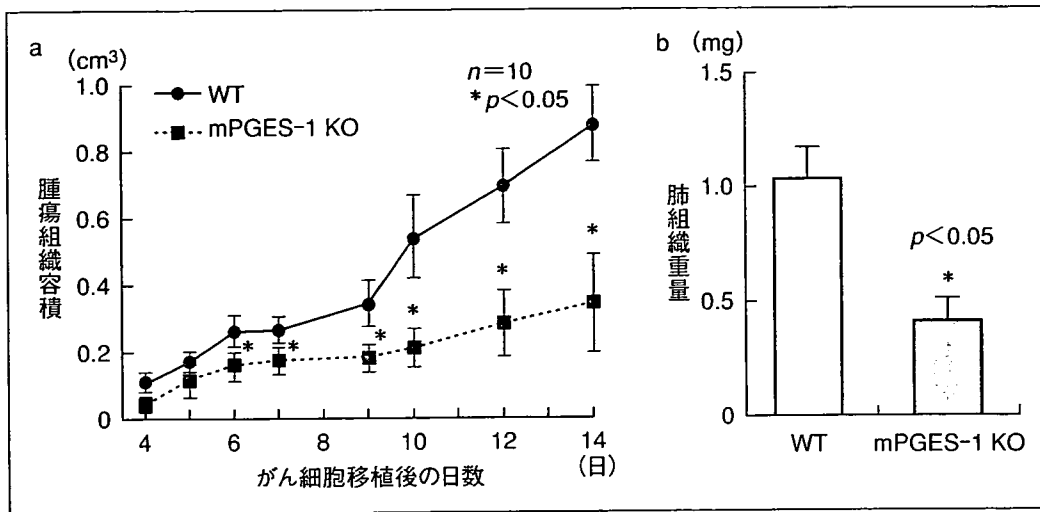


図2 膜結合型 (m) PGES-1 遺伝子欠損マウスにおける移植がん細胞の増殖転移の抑制
 a : 肺がん細胞株 LLC を野生型 (WT) または mPGES-1 欠損 (KO) マウスの背部皮下に移植し、局部腫瘍の増大を経時的にモニターした。KO マウスでは WT と比べて腫瘍の増大が抑制される。
 b : LLC を静脈内投与し、肺への血行性転移を肺組織重量により評価した。KO マウスでは WT マウスに比べて肺組織重量の増加 (=がん転移) が抑制される。

節炎症状の緩和に加え、抗コラーゲン抗体の産生量低下も認められており¹²⁾、患部での炎症応答に加え免疫応答に対する本酵素の寄与も示唆されている。

3 アテローム性動脈硬化

動脈硬化症は血管の慢性炎症と考えられ、血栓形成と炎症性細胞の集積が発症に関係している。Wang らは、高脂肪食負荷によるアテローム性動脈硬化モデルの解析で、低密度リポ蛋白質受容体 (LDLR) と mPGES-1 のダブルノックアウトマウスが対照マウスと比較して、アテローム形成の有意な低下と病巣へのマクロファージの遊走低下を認めることを報告している¹³⁾。なお、病巣において PGI₂ 産生の亢進が認められるのに対し、TXA₂ 産生に変化はない。また炎症性細胞の機能と遊走について、著者らによる腹腔マクロファージの解析では、KO マウス由来の細胞は、WT マウス由来と比較して、炎症刺激による PGE₂ 産生の抑制と、PGI₂ 産生の約 1.5 倍の上昇が認められた⁷⁾。また KO マウスでは、チオグリコレートやカラゲニンの腹腔内投与による炎症性細胞の遊走の抑制がみられ、さらに炎症性肉芽形成モデルでも、肉芽形成の抑制とともにマクロファージの遊走低下が

観察された⁷⁾。よって、mPGES-1 が病巣での炎症応答と炎症性細胞遊走の両側面に寄与し、疾患の進行に関与している可能性が考えられる。

4 がん

近年の多くの知見から、COX-2 と PGE₂ が、がんの発生や進展に重要な役割を演じていることは間違いなさそうである。著者らはがん細胞のマウス皮下移植モデルや血行性転移モデルで、がんの進展や転移への mPGES-1 の寄与を検討したところ、mPGES-1 KO マウスに移植した場合では、対照マウスと比較して腫瘍増殖の有意な低下と肺転移の抑制を認めた (図 2)。さらに mPGES-1 を過剰発現させたがん細胞株は、細胞の増殖速度、浸潤能の亢進が認められ、逆に siRNA により mPGES-1 の発現を抑制した細胞株では、増殖速度と浸潤能の有意な低下がみられた (投稿中)。

また発がん過程においては、筆者らによる COX-2 と mPGES-1 をともに強制発現させた細胞株が悪性形質転換を獲得する報告⁵⁾や、大島らの COX-2 と mPGES-1 の消化管粘膜特異的なダブルトランスジェニック (TG) マウスが過形成性胃癌病変を発症する報告¹⁴⁾などから、本酵素の発がん過程への関与も示唆される。

一方、肺胞および気道上皮細胞に特異的な mPGES-1 TG マウスは、肺での化学発がん発生率に、対照マウス群との違いを認めない報告¹⁵⁾もあり、臓器に特異的な寄与を示す可能性も示唆される。いずれにせよ、がんの多段階発がん過程の各フェーズにおいて、mPGES-1 が増悪因子として機能している可能性が考えられる。

5 脳卒中

虚血再灌流モデルやアルツハイマー病発症モデルによる解析から、COX-2 経路の脳神経細胞死への関与が考えられる。松尾らはマウス虚血再灌流モデルにおいて、再灌流後 24 時間までに脳内 PGE₂ 産生がピークに達し、その産生亢進が COX-2 と mPGES-1 に依存することを明らかにしている¹⁶⁾。さらに mPGES-1 KO マウスでは、対照マウスと比較して脳梗塞域と脳浮腫の顕著な抑制が認められることから¹⁷⁾、COX-2 と mPGES-1 由来の PGE₂ が脳神経細胞死を亢進する可能性が示唆されている。

● 膜結合型 PGES-1 阻害薬の有効性と問題点

選択的 COX-2 阻害薬の問題点は、COX-2 依存的な PG 類の一括阻害による副作用である。NSAIDs の投与は一般に妊婦には禁忌であるし、COX-2 阻害による PGI₂ の遮断は心血管系に悪影響を与えることは先述したとおりである。mPGES-1 欠損マウスでは生殖系に異常はみられず²⁾、また心血管系への悪影響も認められていない¹⁸⁾。したがって mPGES-1 阻害薬が選択的に PGE₂ の産生を阻害し、他の PG 類に影響を与えないならば、PGE₂ の寄与が大きい病態に対して、副作用の少ない効果的な治療薬として有効であろう。上述した mPGES-1 KO マウスを用いた病態モデルの解析結果は、その実用性を裏付ける重要な証拠である。

一方、問題点として、消化管粘膜保護や恒常性維持に対する mPGES-1 の関与が考えられる。著者らはデキストラン硫酸による潰瘍性大腸炎モデルの解析で、mPGES-1 KO マウスが大腸炎症状の悪化を示すという結果を得ており(投稿準備中)、本酵素の消化管組織保護への関与が示唆される。また、mPGES-1 が構成的に

発現している腎臓では生理的な制御に関与している可能性もあり、実際、高塩分摂取による高血圧モデルの解析において、mPGES-1 KO マウスは、対照マウスと比較して、高血圧を示す報告もある¹⁹⁾。もう 1 つの問題点は、mPGES-1 阻害により PG 類の産生バランスが乱れる影響である。本酵素の阻害で他の PG 類の産生が亢進し、その影響で副作用が生じる可能性がある^{7,13)}。いずれにせよ、NSAIDs や COX-2 選択的阻害薬が、副作用の問題はあるものの、すでに臨床で有効な治療効果を示しており、副作用が PG 類の一括阻害による影響であるならば、mPGES-1 阻害薬の開発は、PGE₂ 受容体に着目した創薬戦略と並んで、より現実的なものといえるであろう。

● おわりに

現在、世界中の研究者や製薬企業から mPGES-1 に着目した研究論文が続々と公表されており、本酵素の基礎研究データは驚くべき勢いで蓄積されている。一方で、臨床的研究報告はまだ少なく、本酵素の阻害薬の開発に向けては、臨床研究分野のさらなる充実が不可欠である。近い将来、mPGES-1 阻害薬が NSAIDs に代わり副作用の少ない新世代の医薬品として臨床応用される日を待ち望んでいる。

文献

- 1) Murakami M, Kudo I. *Curr Pharm Des* 2006 ; 12 : 943-54.
- 2) Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S. *J Immunol* 2002 ; 168 : 5811-6.
- 3) Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, et al. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 28601-8.
- 4) Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, et al. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 32783-92.
- 5) Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 19396-405.
- 6) Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, et al. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 37937-47.
- 7) Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, et al. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 33684-95.
- 8) Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ; 100 : 9044-9.