

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業))
分担研究報告書

PGE₂ 低下、COX 発現低下モデル (AERD 類似モデル) における病態解析

研究分担者 成 宮 周 京都大学大学院医学研究科神経細胞薬理学
研究協力者 姚 成 燦 京都大学医学研究科・研究員(日本学術振興会外国人共同研究者)
前 川 明 子 京都大学医学研究科・特定准教授

研究要旨:

本研究では、PGE₂の免疫およびアレルギー炎症における役割を同定し、この役割が“PGE₂低下、COX発現低下モデル(AERD類似モデル)における病態”にどう反映されるかを明らかにする。本年度は、前年度に引き続き、PGE₂によるTh1分化誘導促進作用の分子機構につき検討を行なうとともに、気道上皮細胞でのPGE₂作用について培養細胞を用いて検討した。前者においては、前年度にPGE₂のTh1分化誘導促進作用がIL-12Rβ2遺伝子の誘導によること、この経路がEP2/4-cAMP/PKA-CREB経路を介していることを明らかにしていたが、今年度は、CREBに加え、CREBのco-activatorであるCRTC2がこの遺伝子発現に関与していること、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2経路はこのほかに、interferon γの受容体INFγR1を誘導してINFγシグナルを増強することによりTh1分化を促進すること、従来知られていたcAMP-PKAのT細胞抑制作用はcAMPと同時にPI-3-kinaseにシグナルが入ることで解除できること、この経路によるTh1細胞分化はin vivoでTh1炎症の促進に働いていること、を示した。さらに、後者の研究では、BEAS-2B培養ヒト気道上皮細胞を用い、PGE₂-EP3経路とTh2サイトカインのクロストークを解析した。未だ予備的検討段階であるが、IL-4、IL-13などのサイトカインによりEP3受容体の発現が抑制されること、この抑制はEP3刺激で拮抗されること、また、EP3刺激はTh2サイトカインとアスピリンによるケモカイン産生の増強を抑制することが示された。これはPGE₂の低下がTh2依存性アレルギー炎症の亢進につながることを示唆する。今後、この所見を再現するとともに、この系を用い同様の作用を示す他の生理活性物質と受容体の探索を行う。

A. 研究目的

分担研究項目は「PGE₂低下、COX発現低下モデル(AERD類似モデル)における病態解析」である。本分担研究では、PGE₂の免疫およびアレルギー炎症における役割を同定し、その低下がいかにしてNSAIDs過敏性気道疾患の発症に結びつくかを明らかにする。本研究では、PGE₂の免疫とアレルギーにおける役割を、PGE₂のT細胞と気道上皮細胞に対する作用の両面から検討する。

喘息はヘルパーT細胞(CD4⁺T細胞)のうちTh2サブセットにより分泌されるサイトカイン(IL-4など)により誘発されるTh2反応に依存した病態であることが広く知られている。

これらの事実およびTh1/Th2細胞は相互に抑制しあうとの知見から、PGE₂によるTh1分化誘導促進作用すなわちTh2分化誘導抑制作用の抑制がアスピリン喘息の病態形成に関与している可能性が示唆される。本研究の第一の目的は、PGE₂によるTh1分化誘導促進作用の詳細を解明し、アスピリン喘息の薬物治療戦略を明確にすることである。

一方、PGE₂の気道上皮に対する作用については、これまでの研究で、卵白アルブミン誘発アレルギー喘息モデルでPGE₂が気道上皮細胞に発現するEP3受容体に作用し、そこでのアレルギー炎症関連遺伝子の発現を抑制することを見出している。これに基づき、NSAIDs

過敏性気道疾患の発症メカニズムを以下のように仮定する。即ち、「気道上皮には免疫刺激による活性化を抑制的に制御するような機構が存在し、PGE₂-EP3 経路もその一つである。アスピリンを始めとする NSAIDs は、PGE₂ 合成を抑制することにより、この経路を遮断し免疫刺激への感受性を亢進する。しかし、正常人の場合には、EP3 経路の抑制のみでは、アレルギー炎症の発症には至らない。それは、PGE₂-EP3 経路以外にもアレルギー関連遺伝子の発現抑制に働く経路が存在する為である。NSAIDs 過敏性気道疾患では、この redundant な経路の異常があるため、EP3 経路への依存性が高まっており、この経路の遮断だけでアレルギー発症に至る。」本研究の第二の目的は、この仮説に基づき、培養気道上皮細胞を用い、免疫刺激によるアレルギー炎症関連遺伝子の誘導が NSAIDs 処理により亢進するような in vitro での NSAIDs 過敏疾患モデルの作成を図り、そのモデルにおける EP3 経路以外の抑制経路の同定に努める。これにより、NSAIDs 過敏性気道疾患患者におけるこれら経路の異常の検討に結びつける。

B . 研究方法

PGE₂ の Th1 細胞分化促進の分子機構の研究

1) T 細胞の調製

C57BL/6 マウスないしは各種遺伝子欠損マウスの脾臓を深麻酔下で摘出し、脾臓の免疫細胞を調製した。その後、抗 CD4 抗体磁気ビーズを用いた細胞分離法にて CD4⁺ T 細胞を濃縮した。Naïve CD4⁺ T 細胞の活性化は抗 CD3/CD28 抗体刺激により行った。

2) IFN- γ 産生 Th1 の同定

IFN- γ 産生 Th1 の同定は、抗 IFN- γ 抗体を使用した FACS により行った。

3) 遺伝子発現解析

抗 CD3/CD28 抗体刺激による活性化 T 細胞

に対し PGE₂ 刺激を行った後、total RNA を抽出し逆転写反応を行い cDNA を調整した。その cDNA をテンプレートとして使用し、IL-12R β 2、INF γ R1、T-bet 各遺伝子の発現につき real time PCR 法により検討を行った。内因性コントロールとしては GAPDH 遺伝子の発現を使用した。

4) CREB および CRTC2 の RNAi と western blot CREB と CRTC2 の RNAi は Invitrogen 社の siRNA をエレクトロポレーション法にて T 細胞へ導入することにより行った。CREB の western blot 解析は T 細胞の細胞抽出液を使用し一次抗体として抗 CREB 抗体、抗リン酸化 CREB 抗体、抗 CRTC 2 抗体、抗 GAPDH 抗体 (内因性コントロール) を用い化学発光法による検出を行った。

5) Th 1 炎症モデル

Th 1 主体の炎症モデルとしてマウス接触性皮膚炎 contact hypersensitivity (CHS) および rag2^{-/-}マウスへの T 細胞移入による腸炎モデル adoptive transfer colitis を用いた。

PGE₂-EP3 経路の気道上皮に対する作用の研究

BEAS-2B 培養ヒト気道上皮細胞を用い、この細胞での EP3 受容体と GPR17 受容体の基底状態と Th2 サイトカイン刺激時、EP3 アゴニスト刺激時での発現を検討した。また、Th2 サイトカイン刺激時の BEAS-2B 細胞よりの PGE₂ 合成、MCP-1 誘導とこれにたいするアスピリン及び EP3 アゴニストの効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においてヒトを対象とした検討は含まれていない。実験動物を使用した検討については、動物実験の実験計画は動物愛護法‘実験動物の飼養・保管・苦痛軽減に関する基準’に準拠し作製され、京都大学実験動物委員会にて審

査を受け認証されている。また、遺伝子改変動物の使用については、カルタヘナ法に基づき計画され京都大学組換えDNA実験安全管理委員会において審査を受け承認を受けている。

C . 研究結果

PGE₂ の Th1 細胞分化促進の分子機構の研究

前年度見出した結果に加え、以下の結果を得た。

1. CREB の co-activator である CRTC2 が cAMP-PKA の下で活性化され、CREB とともに働き IL-12Rβ2 遺伝子の発現を促進した。

2. 上記、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路は、IL-12Rβ2 に加え interferon γ の受容体である INF γ R1 の遺伝子の誘導促進を起こし、INF γ のシグナルを増強すること、これにより、更に、IL-12Rβ2 の発現誘導が更に増強した。

3. cAMP 単独であると、従来明らかであった T 細胞活性化の阻害が強く見られ Th1 分化は抑制されるが、これに CD28 の共刺激や EP2/EP4 からの PI-3-キナーゼ活性化が加わると、cAMP による T 細胞抑制が解除され、Th1 分化促進作用が顕著になった。

4. T 細胞特異的に EP4 を欠損させたマウスを用いた接触性皮膚炎や Rag2 KO マウスへの T 細胞移入による腸炎症では、Th1 細胞分化の阻害と炎症の減弱とが見られ、上記 PGE₂ 経路が個体の病態でも Th1 分化促進と炎症亢進に働いていることが確認された。

PGE₂-EP3 経路の気道上皮に対する作用の研究

1. EP3 受容体は基底状態の BEAS-2B 細胞で発現が見られ、これは IL-4、IL-13、IL-4+IL-13 (各 20 ng/ml) の Th2 サイトカイン刺激で半分程度に低下し、これに EP3 作用薬 ONO-AE248 を加えることにより回復した。GPR17 も基底状態の BEAS-2B 細胞で発現が

見られたが、この発現に対する Th2 サイトカインや AE248 の効果は軽度であった。

2. BEAS-2B 細胞を IL-4、IL-13、IL-4+IL-13 (各 20 ng/ml) で処理したところ、約 10 pg/ml 程度の PGE₂ 産生が見られた。基底状態での PGE₂ 産生は検出限界以下であった。

3. IL-4、IL-13、IL-4+IL-13 などの Th2 サイトカインは、BEAS-2B 細胞でケモカイン MCP-1 の発現を 30%程度増加させた。IL-4 と IL-13 で相加効果は示さなかった。アスピリンは、Th2 サイトカインの効果を軽度、有意に上昇させ、これに EP3 作用薬を添加すると、Th2 サイトカインとアスピリンの効果は抑制された。

D . 考察

PGE₂ の Th1 細胞分化促進の分子機構の研究

上記結果と前年度の結果を合わせ、PGE₂ による Th1 分化促進が EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路を介した IL-12Rβ2 遺伝子と INF γ R1 遺伝子の転写誘導により担われていることが明らかになった。また、この作用が、CD28 共刺激や EP2/4 による PI-3-キナーゼの活性化で保障されていることも明らかになった。また、in vivo のモデル実験からこの経路による Th1 分化が免疫炎症の発現に貢献していることも明らかとなった。アスピリン喘息においては、研究代表者らの以前の検討により全身の PGE₂ 低下が確認されていることから、アスピリン喘息の病態に PGE₂ 低下による Th1 分化誘導促進作用の減弱とそれに伴う Th2 反応の亢進が関与していることが示唆される。

PGE₂-EP3 経路の気道上皮に対する作用の研究

上記の結果は、気道上皮細胞で Th2 サイトカインが PGE₂ を産生し、この PGE₂ が EP3 受容体に働き、Th2 サイトカインの MCP-1 誘導

を抑制するという我々の仮説と一致するが、BEAS-2B 細胞での Th 2 サイトカインの MCP-1 誘導は、たかだか 30% 程度の増加に留まっている。今後、Th2 サイトカイン作用の指標となるより大きな誘導を起こす遺伝子の同定、或は、より大きな増加を示す新規細胞系の確立が、PGE₂-EP3 経路 やその他の抑制経路の相互作用の解析には重要であると考えられた。

E . 結論

PGE₂ の Th1 分化誘導促進作用を解析することにより、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路を介した IL-12Rβ2 遺伝子と INFγR1 遺伝子の転写誘導が Th1 分化を促進していること、この経路が個体での in vivo の Th1 炎症の発症に働いていること、を見出した。

また、気道上皮細胞を用いて、PGE₂ と Th2 サイトカインの negative な cross talk が見出された。これは、NSAIDs 過敏性の in vitro 実験系の予備的検討である。今後、このアッセイ系を確立して、PGE₂-EP3 経路以外の抑制経路の同定に用いる他、NSAIDs 過敏性気道疾患患者の鼻粘膜上皮を用いた過敏性の検討や、上記で同定される経路の NSAIDs 過敏性気道疾患患者での異常の有無などの検討に繋げたい。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Tomohiro Aoki, and Shuh Narumiya (2012) Prostaglandins and chronic inflammation. Trends Pharmacol. Sci., 33(6), 304-311.

2) Chengcan Yao, Takako Hirata, Kitipong Soontrapa, Xiaojun Ma, Hiroshi Takemori and Shuh Narumiya (2013) Prostaglandin E₂ promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signaling by cAMP and PI3-Kinase. Nature Commun., in press

2 . 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし