

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 京都大学医学研究科 特任教授

研究要旨:

本研究では、PGE<sub>2</sub> 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“PGE<sub>2</sub> 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。このため、PGE<sub>2</sub> の T 細胞分化、増殖に対する促進作用、とくに IL-12 依存性 Th1 細胞分化の促進、IL-23 依存性 Th17 細胞増殖の亢進、の分子メカニズムの解明を行った。前者では、PGE<sub>2</sub> の Th1 分化誘導促進作用が IL-12Rβ<sub>2</sub> 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、また、CREB に加え CREB の co-activator である CRTC 2 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 INF-γ 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 PI3kinase 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。後者では、PGE<sub>2</sub> が、TGFβ と IL-6 により誘導された Th17 細胞の IL-23 による増幅を用量依存的に促進すること、この促進作用は、EP2 と EP4 選択アゴニストで再現できること、PGE<sub>2</sub> による Th17 細胞の増幅は PKA(A キナーゼ)阻害薬で阻害され、dibutyl-cAMP および PKA アゴニストで模倣されたことから cAMP-PKA 経路を通っていること、上記 PGE<sub>2</sub>-cAMP 経路は CREB, CRTC2 依存性に IL-23 受容体サブユニット、IL-23R, の誘導を起こすこと、さらに、PGE<sub>2</sub>-cAMP による IL-23R mRNA の誘導が蛋白合成阻害薬で抑制されること、を見出した。即ち、本研究によって、PGE<sub>2</sub>-EP2/EP4-cAMP 経路が転写因子 CREB/CRTC2 を介して IL-12 や IL-23 の受容体を遺伝子レベルで誘導し、これらのサイトカインの作用を増強していることが明らかになった。このことはこれまで独立に働くとされていたサイトカインとプロスタグランジンが密接にクロストークしていることを示したものである。これまで、アレルギー喘息はヘルパー T 細胞 (CD4<sup>+</sup> 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、Th1 細胞と Th2 細胞は相互に抑制しあうことが知られている。本研究の結果から、アスピリンによる PGE<sub>2</sub> の低下は、Th1 分化誘導促進の抑制を起し、その結果、Th2 分化誘導が促進されて喘息の病態形成に関与している可能性が示唆された。

A . 研究目的

NSAIDs 過敏気道疾患いわゆるアスピリン喘息は、成人発症重症喘息の代表であるとともに喘息死の主要な原因となる。そのため、アスピリン喘息の病態解明とそれを通じた治療法の開発は社会的に重要である。研究代表者らの一連の検討からアスピリン喘息の病態にアスピリンの標的である cyclooxygenase により産生される炎症性脂質メディエーターの

prostaglandinE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) の産生低下が深く関与することが示されてきた。一方、喘息はヘルパー T 細胞 (CD4<sup>+</sup> 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、PGE<sub>2</sub> による Th2 分化誘導抑制作用すなわち Th1 分化誘導促進作用がアスピリン喘

息の病態形成に關与している可能性が示唆される。本研究では、”PGE<sub>2</sub> 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ため、PGE<sub>2</sub> の Th1 分化誘導促進と Th17 細胞の増殖促進作用の分子機構の解明を行った

## B . 研究方法

< PGE<sub>2</sub> の IL-12 依存性 Th1 細胞分化促進作用の分子機構の研究 >

### 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<sup>+</sup> T 細胞を濃縮した。Naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化は抗 CD3/CD28 抗体刺激により行った。

### 2) IFN- $\gamma$ 産生 Th1 の同定

IFN- $\gamma$  産生 Th1 の同定は、抗 IFN- $\gamma$  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 PGE<sub>2</sub> 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 $\beta$ 2、INF $\gamma$ 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 CRTC2 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) Th1 炎症モデル

上記モデルとしてマウス接触性皮膚炎、contact hypersensitivity (CHS) および rag2<sup>-/-</sup> 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。

< PGE<sub>2</sub> の IL-23 依存性 Th17 細胞増促進作用の分子機構の研究 >

### 1) T 細胞の調製と Th17 細胞分化

上記と同様に C57BL/6 マウスより Naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を調製し、これを抗 CD3/CD28 抗体と TGF $\beta$  と IL-6 の存在下で 4 日間培養することで Th17 分化を誘導した。

### 2) IL-23 による Th17 細胞の増幅

上記 Th17 細胞を IL-23 存在で PGE<sub>2</sub> の存在下、非存在下、また、各種試薬や CREB, CRTC2 の RNAi に供し 3 日間培養し、遺伝子発現を解析した。

### 3) 遺伝子発現解析

上記 Th17 細胞より 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-17、IL-23R、RORC など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。また、上記 RNA を用いて microarray 解析を行った。

(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

< PGE<sub>2</sub> の Th1 細分化促進の分子機構の研究 >

1) PGE<sub>2</sub> による Th1 分化誘導促進作用の標的分子としての IL-12Rβ2 遺伝子の同定。

PGE<sub>2</sub> による Th1 分化誘導促進作用の機構を解析するために、PGE<sub>2</sub> 刺激により Th1 分化誘導に関与する転写因子 T-bet とサイトカイン IL-12 受容体の発現がどのように変化するか検討した。本検討は、抗 CD3/CD28 抗体刺激により活性化された CD4<sup>+</sup> T 細胞を IL-12 添加により Th1 細胞へ分化誘導する条件下で行った。結果、PGE<sub>2</sub> 刺激は IL-12 刺激による IL-12 受容体の特異的サブユニットである IL-12Rβ2 遺伝子の発現誘導を IL-12 刺激と協調的に増幅することを real time PCR 法により確認した。一方 IL-12 刺激による T-bet 遺伝子の発現誘導は PGE<sub>2</sub> 刺激により影響を受けなかった。この結果から、PGE<sub>2</sub> による Th1 分化誘導促進作用は IL-12 刺激による IL-12 受容体の誘導を増幅した結果として生じていることが示唆された。

2) PGE<sub>2</sub> による IL-12Rβ2 誘導増幅効果に寄与する細胞内情報伝達経路の同定。

次に、PGE<sub>2</sub> による IL-12Rβ2 の発現誘導増幅効果の分子機構の解明を試みた。EP2 および EP4 は、下流の情報伝達経路として cAMP を介して protein kinase A (PKA) を活性化するとともに phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) を介して Akt を活性化することが知られている。そのため、PKA, PI3K, Akt それぞれの選択的阻害薬を使用して cAMP/PKA 経路

と PI3K/Akt 経路の関与を検討した。活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞において PGE<sub>2</sub> 依存的 IL-12Rβ2 発現誘導は、H-89 (PKA inhibitor), LY294002, Wortmannin (以上 PI3K inhibitor), Akt inhibitor の各種阻害薬により有意に抑制された。また、cAMP アナログである dibutyl-cAMP, Forskolin により PGE<sub>2</sub> による IL-12Rβ2 発現誘導作用が模倣できた。これらの結果から、PGE<sub>2</sub> による IL-12Rβ2 の発現誘導は cAMP/PKA および PI3K/Akt の両者を介して行われることが示唆された。

3) PGE<sub>2</sub> 依存的 IL-12Rβ2 遺伝子発現誘導に対する転写因子 CREB の関与の同定。

引き続き PGE<sub>2</sub> による IL-12Rβ2 の発現誘導を司る転写因子の同定を試みた。この PGE<sub>2</sub> による IL-12Rβ2 の発現誘導経路に cAMP が関与することを見出しているため、我々は、cAMP 依存的転写因子である CREB に注目した。活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞において、dibutyl-cAMP は CREB のリン酸化を亢進し、PKA 阻害薬 H-89 投与によりその効果は打ち消された。この結果から確かに活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞では、cAMP/PKA 依存的に CREB が活性化していることが明らかとなった。さらに、我々は PGE<sub>2</sub> 依存的な IL-12Rβ2 の発現誘導に対する CREB の関与を明確にするために、CREB の RNAi を使用した検討を行った。結果、CREB を siRNA で抑制することにより PGE<sub>2</sub> 依存的 IL-12Rβ2 の発現誘導は有意に抑制された。この結果から、PGE<sub>2</sub> は cAMP/PKA を介した CREB のリン酸化による活性化により IL-12Rβ2 の発現を転写レベルで誘導していることが明らかとなった。

4) さらに、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することを、CRTC2 の RNAi, ChiP assay にて確認した。

5) また、上記、EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路による IL-12R $\beta$ 2 遺伝子の発現は蛋白合成阻害薬により有意に抑制されることから、直接の誘導に加え、新規蛋白質による間接的な誘導が存在することが想定された。このため、microarray 解析により候補遺伝子として interferon- $\gamma$  の受容体である INF $\gamma$ R1 を同定、PGE<sub>2</sub> はこの遺伝子の誘導促進を起し、IFN- $\gamma$  のシグナルを増強することにより、更に、IL-12R $\beta$ 2 の発現誘導を増強していることを明らかにした。

6) 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 PGE<sub>2</sub> 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。

< PGE<sub>2</sub> の IL-23 依存性 Th17 細胞増促進作用の分子機構の研究 >

1) PGE<sub>2</sub> は、TGF $\beta$  と IL-6 により誘導された Th17 細胞の IL-23 による増幅を用量依存的に促進した。この促進作用は、EP2 と EP4 選択アゴニストで再現できた。

2) 上記 PGE<sub>2</sub> による Th17 細胞の増幅は、PKA(A キナーゼ) 阻害薬で阻害され、dibutyl-cAMP および PKA アゴニストで模倣されたことから cAMP-PKA 経路を通っていることが示唆された。

3) 上記 PGE<sub>2</sub>-cAMP 経路による IL-23 作用の増幅のメカニズムとして、これらによる IL-23 受容体サブユニット、IL-23R、の誘導を見出した。さらに、PGE<sub>2</sub>-cAMP による IL-23R mRNA の誘導が蛋白合成阻害薬で抑制された。

4) cAMP-PKA 経路の下流にある転写因子

CREB の RNAi による枯渇により cAMP による IL-23R mRNA の誘導は抑制された。

D . 考察

< PGE<sub>2</sub> の Th1 細胞分化促進の分子機構の研究 >

上記結果により、PGE<sub>2</sub> による Th1 分化促進が EP2/4-cAMP/PKA-CREB/CRTC2 経路を介した IL-12R $\beta$ 2 遺伝子と INF $\gamma$ 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 PI3 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 PGE<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> 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。このことから我々は、本検討から見出された PGE<sub>2</sub> による Th1 分化誘導促進作用を増強し、結果として Th2 反応を抑制することがアスピリン喘息の新規の治療戦略となり得ると考えている。我々は、本年度の研究結果をもとにさらに PGE<sub>2</sub> による Th1 分化誘導促進作用の分子機序の解明を進め、アスピリン喘息の病態解明と薬物治療の標的分子の同定を目指したい。さらに、本検討から見出された知見をもとにアスピリン喘息の病態を模倣する新たな動物モデルの作出を目指したい。

< PGE<sub>2</sub> の IL-23 依存性 Th17 細胞増促進作用の分子機構の研究 >

Th17 細胞は様々な免疫炎症に関与する T 細胞集団であり、TGF $\beta$  と IL-6 によって naïve T 細胞より分化し、IL-23 によって安定化され増

幅される。本研究は、後者の Th17 増幅過程を PGE<sub>2</sub> が促進することを示したものであり、炎症局所の微小環境が T 細胞分化の方向に大きな影響を与えることを示唆する。IL-23 は、クローン病や乾癬などで病態形成に働いていることが報告されており、これらでは Th17 と同様に IL-17 を産生する CD4<sup>+</sup>T 細胞や ILC3 細胞が IL-23 依存性に増幅されることが示されている。PGE<sub>2</sub> が Th17 細胞と同様これらの細胞集団の増幅を起こすかは今後の見当が必要である。また、今回の研究で PGE<sub>2</sub> が IL-23 の受容体の誘導を起こすことにより IL-23 の作用を亢進することが示されたことは、PGE<sub>2</sub> の cytokine amplifier としての働きを分子レベルで解明したものである。最近、アレルギー喘息の主たるメディエーターである Th2 細胞と Th17 細胞の間でも、Th2 と Th1 細胞間に見られる相互排除的な転写ネットワークの存在が示唆されており、今回の結果は PGE<sub>2</sub> 低下が Th17 細胞の増幅を抑制により Th2 細胞優位の状況を惹起することを示唆しているかもしれない。

#### E . 結論

PGE<sub>2</sub> 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 / CRT2 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、PGE<sub>2</sub> による Th17 細胞の増幅促進の分子メカニズムが EP2/4 - cAMP / PKA - CREB / CRT2 経路を介した IL-23R 遺伝子の発現誘導によることが解明された。このことは、NSAIDs による PGE<sub>2</sub> の活性低下が Th17 細胞の低下につながることを示唆するものであり、これが Th2 活性の上昇によるアレルギー反応の促進にいたるか、今後検討が必要である。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

1) Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S. Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. Nat Commun. 4:1685. 2013

##### 2 . 学会発表

1) 成宮 周 : プロスタグランジンと炎症慢性化、第 5 3 回日本呼吸器学会学術講演会、基調講演、平成 25 年 4 月 19 日、東京

2) 成宮 周 : プロスタグランジン・炎症・心血管系、特別講演、日本ショック学会、平成 25 年 5 月 17 日、東京

3) Narumiya, S.: GPCR-Cytokine Crosstalk: Prostaglandins as a cytokine amplifier. RIKEN RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013 "Interface between Immune System and Environment", June 26-27, Yokohama.

4) Narumiya, S.: Prostaglandins in chronic inflammation. FASEB SRC "Lysophospholipid and other Related Mediators-From Bench to Clinic", Niseko, August 4-9, 2013.

5) Narumiya, S.: Prostaglandins and TLR Signaling in Stress Behaviour and Depression. シグナルネットワーク研究会、平成 25 年 8 月 30 日、札幌

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