

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08592

研究課題名(和文)EPRAPを標的とした炎症性疾患に対する新規医療の開発

研究課題名(英文)Drug discovery targeting EPRAP for chronic inflammatory diseases

研究代表者

南学(Minami, Manabu)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90511907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、EPRAP欠損マウスを用いて食事誘導性肥満モデルを作成し、肥満における慢性炎症でのEPRAPの機能を検討した。その結果、肥満の状態では、野生型と比較しEPRAP欠損マウスにおける全身の炎症マーカーの発現等に有意差は無く、むしろEPRAP欠損マウスでは肝臓での糖新生が著明に抑制され、耐糖能異常が有意に改善されることを明らかにした(Higuchi S, et al. 2019)。EPRAPは、各臓器や組織、細胞特異的な機能を有し、生体防御や精神神経系、エネルギー代謝など実に様々な面で生体の恒常性維持に極めて重要な働きをしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージの活性化による慢性的な炎症刺激は、がんや動脈硬化、肥満、認知症などの様々な疾患の発症や増悪に関与し、これら慢性難治性疾患の治療標的として期待が大きい。EPRAPはマクロファージの炎症性活性化を抑制する内因性分子であり、慢性炎症の病態生理に極めて重要であることから、EPRAPを標的とした炎症性疾患に対する新規医療の開発が期待される。本研究の結果から、EPRAPが、エネルギー代謝など様々な生体の恒常性維持にも重要な働きをしていることが明らかとなり、他の疾患領域におけるEPRAPを標的とした創薬の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study created diet-induced obesity models by using EPRAP-deficient mice, and investigated the role of EPRAP in chronic inflammation in obesity. Results showed no significant difference between obese and wild-type mice in the expression of systemic inflammatory markers. Hepatic gluconeogenesis was found to be markedly suppressed in EPRAP-deficient mice, leading to a significant improvement in the impaired glucose tolerance (Higuchi et al. 2019). The results of this study found that EPRAP has functions specific to certain organs, tissues, cells, and indeed plays an extremely important role in maintaining the homeostasis of a living body in various aspects, such as biological defense, the psychiatric and nervous system, and energy metabolism.

研究分野：代謝学、薬理学、炎症・免疫、血管生物学

キーワード：マクロファージ 慢性炎症 糖新生 ホメオスタシス EPRAP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マクロファージは、病原微生物や死細胞の貪食・処理、炎症制御などの機能を通じ、感染防御や生体の恒常性維持に必須の機能を果たしている。一方、マクロファージ活性化による慢性的な炎症刺激は、がんや肥満、動脈硬化など様々な難治性慢性疾患の病態にも深く関与していることが近年明らかとなり、新規の治療標的として精力的に研究が進められている。

EPRAP (EP4 receptor-associated protein) は、プロスタグランジン E2 (PGE<sub>2</sub>) の EP4 受容体の細胞内ドメイン結合蛋白として同定された。PGE<sub>2</sub>-EP4 受容体シグナルはマクロファージの M1 型炎症性活性化を抑制するが、我々は、EPRAP が MEK/ERK 経路の抑制分子である NF-B1 p105 と結合し、炎症刺激による p105 のリン酸化と加水分解を抑制することを報告した (Minami M, et al. J Biol Chem, 2008)。さらに我々は、EPRAP 遺伝子改変動物を作製し、デキストラン硫酸ナトリウム経口投与による炎症性腸疾患モデル (Nakatsuji M, et al. PLoS Genet. 2015) やブレオマイシン経気管投与による肺臓炎モデル (Higuchi S, et al. J Immunol. 2016) を用いて、様々な慢性炎症性疾患モデルにおいて、EPRAP が、マクロファージの炎症性活性化を抑制し疾患の病態生理に深く関わることを明らかにした。

以上の研究結果から、EPRAP が、マクロファージの過剰な炎症性活性化を制御する新規の内因性のフィードバック経路に重要な分子であり、その経路の賦活化は、マクロファージ特異的、かつ従来にない機序に基づく抗炎症薬開発につながるのではないかとこの着想を得た。

### 2. 研究の目的

慢性炎症制御による新規医療の開発を目指し、EPRAP およびその関連分子を標的とした創薬および診断法の開発に関する探索的研究を行うため、種々の慢性疾患の病態における EPRAP の機能について、EPRAP 遺伝子改変動物を用いて検討する。さらに、病態生理に重要な EPRAP 下流分子経路を同定する。

### 3. 研究の方法

- (1) 慢性疾患の病態における EPRAP の機能を、EPRAP 遺伝子改変動物を用いて検討する
- (2) EPRAP の翻訳後修飾に注目し下流の分子メカニズムを検討する。

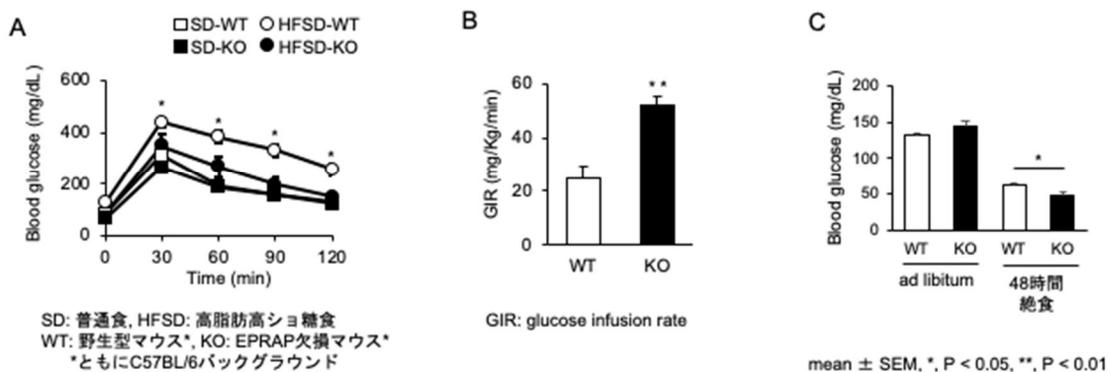
### 4. 研究成果

- (1) 慢性疾患の病態における EPRAP の機能解明

#### 2 型糖尿病

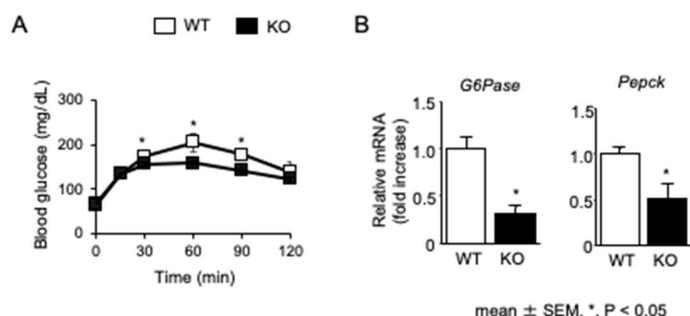
2 型糖尿病の発生には慢性炎症が大きく関与することが知られている。本研究では、EPRAP 欠損マウスを用いて食事誘導性肥満モデルを作成し、肥満における慢性炎症での EPRAP の機能を検討した。その結果、当初の予想に反して、肥満の状態では、野生型と比較し EPRAP 欠損マウスにおける全身の炎症マーカーの発現等に有意差は無く、EPRAP 欠損マウスではブドウ糖負荷試験における耐糖能異常が有意に改善し (図 1A)、グルコースクランプ法ではインスリン抵抗性の改善を認め (図 1B)、絶食時の血糖値は低値を示した (図 1C)。

図1



インスリン抵抗性は 2 型糖尿病の基盤病態であるが、糖新生は肝臓のインスリン感受性制御に重要である。EPRAP 欠損が絶食時の血糖低値をもたらすことから、我々は肝糖新生に着目し検討を進めた結果、野生型と比較し EPRAP 欠損マウスでは、ピルビン酸負荷による糖新生能が有意に抑制され (図 2A)、肝臓における糖新生関連酵素 (Glucose 6-phosphatase,

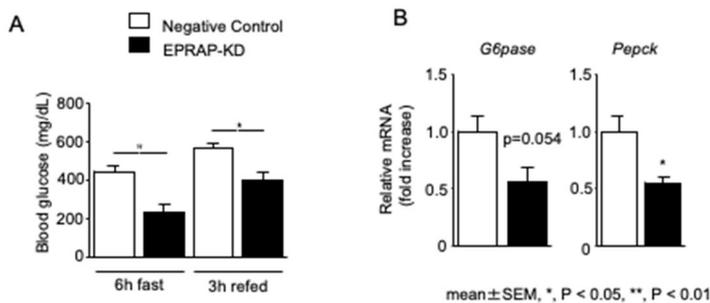
図2



G6Pase; phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) の発現が低値を示した (図 2B)。

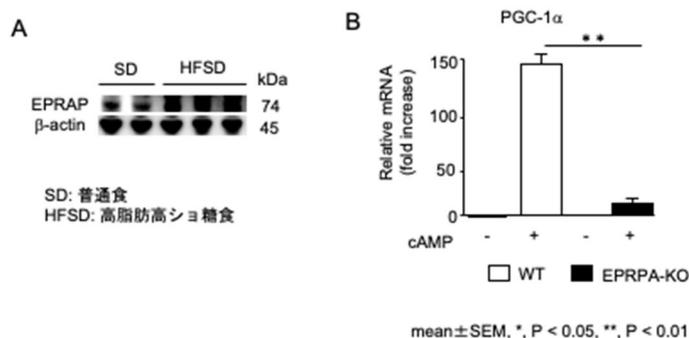
肝臓での EPRAP の機能を明らかにするため、我々は、肥満マウス (*db/db* マウス) にレンチウイルスベクターを用いて肝臓特異的に EPRAP をノックダウンした。その結果、肝で EPRAP をノックダウンした *db/db* マウスでは、絶食時の空腹時血糖は対照群と比較し有意に低値を示し (図 3A)、PEPCK の発現が有意に抑制された (図 3B)。

図3



食事誘導性肥満を導入した野生型マウス肝臓では EPRAP が過剰発現している (図 4A)。以上の結果から、EPRAP は、摂取エネルギー過剰の状況下では肝糖新生を正に制御し、インスリン抵抗性を増悪させると考えられた。さらに、EPRAP 欠損マウスから得た初代培養肝細胞では、糖代謝調節の鍵分子である PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) の、cAMP 刺激による発現誘導が著明に抑制されることから (図 4B)、EPRAP は PGC-1 $\alpha$  の上流にあって、生体の糖代謝やエネルギー恒常性維持に極めて重要な働きをしていることが推測された。

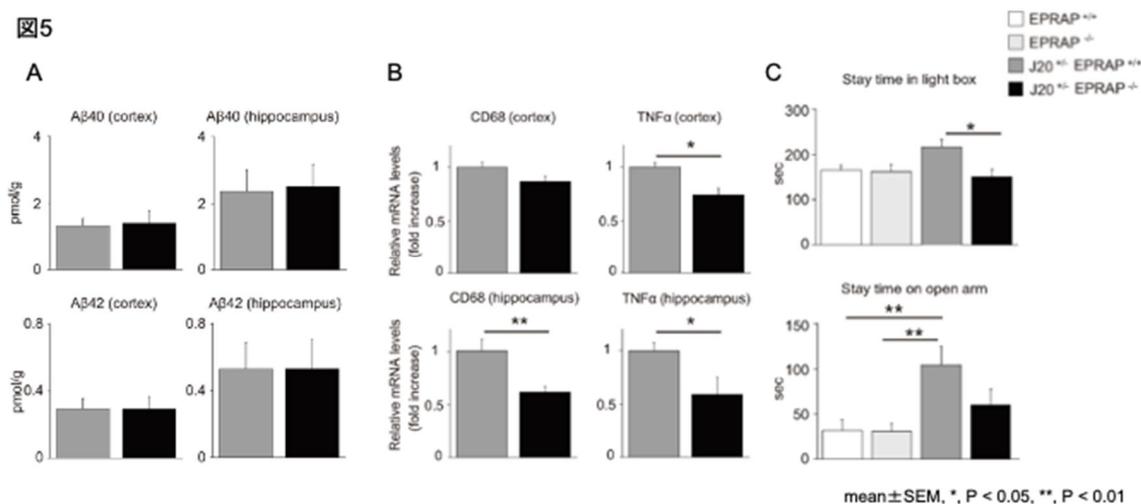
図4



### アルツハイマー型認知症

脳内免疫担当細胞であるミクログリアに対して EPRAP は催炎症性に働くことを我々は以前明らかにしたが (Fujikawa R, et al. Am J Pathol. 2016)、本研究では、アルツハイマー病モデルを用いて疾患での意義を検討した。J20 マウスは、家族性アルツハイマー病原因遺伝子の一つである変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子を神経細胞で強制発現させたトランスジェニックマウスであり、これを EPRAP 欠損マウスと交配し、複合遺伝子変異マウスを作製した。その結果、EPRAP 遺伝子欠損は脳内のアミロイド 蛋白の沈着には影響を与えなかったが (図 6A)、脳内炎症を抑制し (図 6B)、アルツハイマー病の周辺症状である不安を改善した (図 6C)。

図5



末梢マクロファージと中枢ミクログリアに対する EPRAP の相反する作用については、その分子機序を明らかにすることによって、安全性の高い EPRAP 経路の特異的賦活化薬の開発に通ずるとともに、免疫担当細胞としてのマクロファージとミクログリアの機能的差異を EPRAP が担っている可能性があり生物学的にも極めて興味深く、今後の重要な研究課題と考えられる。

以上の本研究結果から、EPRAP は、各臓器や組織、細胞特異的な機能を有し、生体防御や精神神経系、エネルギー代謝など実に様々な面で生体のホメオスタシスに極めて重要な働きをしていることが明らかとなった。

### (2) EPRAP 下流の抗炎症メカニズムの解明

EPRAP は蛋白間結合を担うアンキリンリピートを多数有し、結合蛋白を介して炎症制御を含む様々な生体機能を発揮する。また、EPRAP が定常状態ではリン酸化されており、protein phosphatase 2A (PP2A) による特定のセリン残基 (S108/S608) の脱リン酸化が抗炎症作用発現に重要であることを我々は報告している (Higuchi S, et al. J Immunol. 2016)。本研究では、EPRAP の翻訳後修飾に注目し、特異的なリン酸化 EPRAP 抗体の作製に着手した。慢性炎症の病態における、各臓器や組織、炎症細胞等でのリン酸化 EPRAP の発現や分布については今後検討を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Higuchi Sei, Fujikawa Risako, Nakatsuji Masato, Yasui Mika, Ikedo Taichi, Nagata Manabu, Mishima Kenji, Irie Keiichi, Matsumoto Michihiro, Yokode Masayuki, Minami Manabu	4. 巻 316
2. 論文標題 EP4 receptor-associated protein regulates gluconeogenesis in the liver and is associated with hyperglycemia in diabetic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E410 ~ E417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00035.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujikawa Risako, Higuchi Sei, Ikedo Taichi, Nagata Manabu, Hayashi Kosuke, Yang Tao, Miyata Takeshi, Yokode Masayuki, Minami Manabu	4. 巻 486
2. 論文標題 Behavioral abnormalities and reduced norepinephrine in EP4 receptor-associated protein (EPRAP)-deficient mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 584 ~ 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.03.095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujikawa Risako, Higuchi Sei, Nakatsuji Masato, Yasui Mika, Ikedo Taichi, Nagata Manabu, Hayashi Kosuke, Yokode Masayuki, Minami Manabu	4. 巻 187
2. 論文標題 Deficiency in EP4 Receptor?Associated Protein Ameliorates Abnormal Anxiety-Like Behavior and Brain Inflammation in a Mouse Model of Alzheimer Disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1848 ~ 1854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikedo Taichi, Minami Manabu, Kataoka Hiroharu, Hayashi Kosuke, Nagata Manabu, Fujikawa Risako, Higuchi Sei, Yasui Mika, Aoki Tomohiro, Fukuda Miyuki, Yokode Masayuki, Miyamoto Susumu	4. 巻 6
2. 論文標題 Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Anagliptin Prevents Intracranial Aneurysm Growth by Suppressing Macrophage Infiltration and Activation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e004777 ~ e004777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.116.004777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikedo Taichi, Kataoka Hiroharu, Minami Manabu, Hayashi Kosuke, Miyata Takeshi, Nagata Manabu, Fujikawa Risako, Yokode Masayuki, Imai Hirohiko, Matsuda Tetsuya, Miyamoto Susumu	4. 巻 129
2. 論文標題 Sequential Inward Bending of Arterial Bifurcations is Associated with Intracranial Aneurysm Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e361 ~ e366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.05.153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikedo Taichi, Minami Manabu, Kataoka Hiroharu, Hayashi Kosuke, Nagata Manabu, Fujikawa Risako, Yamazaki Fumiyo, Setou Mitsutoshi, Yokode Masayuki, Miyamoto Susumu	4. 巻 495
2. 論文標題 Imaging mass spectroscopy delineates the thinned and thickened walls of intracranial aneurysms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 332 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.10.133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 学際領域として重要性をますOnco-Cardiology-その歴史と現状-
3. 学会等名 第66回日本心臓病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minami M
2. 発表標題 Important Adverse Effects of Molecular-Targeting Drugs in Aspects of Cardio-Oncology.
3. 学会等名 7th DIA Cardiac Safety Workshop in Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minami M
2. 発表標題 Prostaglandin E Receptor Type 4 Signaling in Chronic Inflammation and Metabolic Disorders.
3. 学会等名 JAPAN-ASEAN Seminar 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 Cardio-Oncologyとは
3. 学会等名 第65回日本心臓病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 委員会の運用における課題と対策
3. 学会等名 滋賀医科大学臨床研究開発センター 臨床研究法・改正指針への対応ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 抗がん剤の循環器系への副作用-Onco-Cardiologyの国内外の現状と課題
3. 学会等名 第9回日本安全性薬理研究会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 高齢者における脂質異常症管理
3. 学会等名 第60回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 脂質異常症治療薬の特徴と薬物治療における留意点
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 動脈硬化の新たなリスク因子としてのがん・がん診療
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南 学
2. 発表標題 がん治療と脳心血管アンチエイジング
3. 学会等名 第16回脳心血管抗加齢研究会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----