

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790074

研究課題名（和文） 炎症反応を制御する新規シグナル調節機構の解析

研究課題名（英文） Novel mechanism for regulation of inflammatory response.

研究代表者

伊藤 政明（ITOU MASAOKI）

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：30438759

研究成果の概要（和文）：

Gq-ホスホリパーゼ C（PLC）情報伝達経路を介する細胞外ヌクレオチドによる炎症応答反応に対する新しい抑制機構を解析した。Gq-PLC 経路は種々のホルモンや神経伝達物質などの多くの情報が収束されることから、この経路の抑制は Gq-PLC を介する興奮性の生理機能応答を背景とする様々な疾患に対する新規治療薬開発において魅力的な標的になると期待される。

研究成果の概要（英文）：

We have shown a new inhibitory mechanism against inflammatory response to extracellular nucleotides-induced Gq protein/phospholipase C (PLC) pathway. Because the Gq/PLC pathway consolidates several signal transductions caused by hormones and neurotransmitters, inhibition of this pathway may be an attractive target for novel therapeutic drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞外ヌクレオチド、プリン受容体、マクロファージ、プロスタグランジン、細胞内情報伝達、炎症反応、

1. 研究開始当初の背景

(1) マクロファージは、その貪食作用により殺菌を行うと共に、抗原提示によって抗体の産生を行うための最初のシグナルとして働くなど、重要な恒常性維持機構の一角を担っている。しかし、その機能異常は慢性的な炎症の原因となり、免疫関連の多くの病気に関わっている。

(2) アデノシン三リン酸（ATP）をはじめとする細胞外ヌクレオチドは、イオンチャネル型の P2X 受容体、並びに G タンパク質共役型の P2Y 受容体などの多様なプリン作動性受容体を介して生体反応を媒介するメディエーターとして作用する。炎症巣では、組織より大量の ATP や UDP 分子が放出されることから、プリン作動性シグナルはそれら炎症病態

との関連性が指摘されている。近年、ATP による肥満細胞の遊走亢進や UDP による単球やミクログリアなどのサイトカイン産生や食作用亢進作用が見つかり、その機能調節因子としての役割が益々注目されている。しかし、マクロファージ機能への影響は明らかにされていない。

(3) 炎症組織等においては細胞外ヌクレオチドとともにプロスタノイドのような種々のケミカルメディエーターも放出され、相互に影響し合い細胞障害の初期応答因子として働くと考えられているが、それらの相互作用については明らかでない。

2. 研究の目的

- (1) マクロファージを取り巻くプリン作動性シグナル伝達の詳細を明らかにする。
- (2) 炎症病態におけるマクロファージ機能制御に関わるプリン作動性シグナルの役割について明らかにする。
- (3) 炎症病態においてプリン作動性シグナルを介するマクロファージ細胞機能がどのように調節制御されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウスマクロファージ由来 J774 細胞株におけるプリン受容体の発現を解析する。
- (2) 発現が確認されたプリン受容体について、サイトカイン産生能などのマクロファージ機能への影響を評価する。
- (3) マクロファージにおけるプリン作動性シグナルとケミカルメディエーターによるシグナルとの相互作用について、細胞内情報伝達経路を検討し、その分子メカニズムを解析する。

4. 研究成果

(1) マウスマクロファージ由来の J774 細胞株におけるプリン受容体の遺伝子発現を real-time RT-PCR で解析した結果、イオンチャンネル型の P2X₄ と P2X₇ 受容体、G 蛋白共役型の P2Y₂ と P2Y₆ 受容体の発現が認められ、特に P2Y₆ 受容体の発現が顕著であることが明らかとなった。また、これらのプリン受容体を介する細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇作用を指標とした場合、それらはいずれも機能的に発現していると考えられた。

一方、主要なケミカルメディエーターであるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、J774 細胞において単独では [Ca²⁺]_i に影響せず、前処置しておくことにより ATP による P2Y₂, P2X₄ 受容体を介する反応や UDP による P2Y₆ 受容体を介する反応である [Ca²⁺]_i 上昇作用を抑制

した。しかし、BZ-ATP による P2X₇ 受容体を介する反応は PGE₂ で抑制されなかった。したがって、PGE₂ はイオンチャンネル型 P2X₄ 受容体と G 蛋白共役型 P2Y₂ および P2Y₆ 受容体の機能を共に抑制することが示された (図 1)。

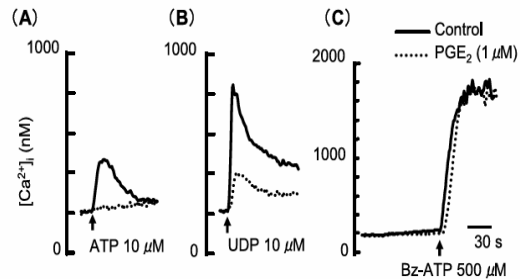


図 1. プリン作動性シグナルに対する PGE₂ の選択的抑制作用。

Ca 蛍光指示薬である Fura-2 をロードした細胞を、PGE₂ 1 μM 存在下 (破線) あるいは非存在下 (実線) において P2Y₂, P2X₄ に作用する ATP 10 μM、P2Y₆ に作用する UDP 10 μM あるいは P2X₇ に作用する Bz-ATP 500 μM で刺激した時の細胞内 Ca²⁺ 濃度変化。

(2) プリン受容体のマクロファージ機能への影響としては、ATP あるいは UDP による [Ca²⁺]_i 上昇作用の程度がマクロファージ炎症性蛋白質 (MIP)-1 の遊離促進作用と関係していることを明らかにした。この蛋白質は炎症反応に関与する C-C ケモカインの一つである。また PGE₂ は、MIP-1 の遊離を抑制したが、それはプリン作動性シグナルによる [Ca²⁺]_i 上昇に対する抑制プロファイルと一致していた。すなわち、PGE₂ は P2X₄、P2Y₂ および P2Y₆ による [Ca²⁺]_i 上昇ならびに MIP-1 の放出を抑制したが、P2X₇ を介する反応は抑制しなかった。 (図 2)。

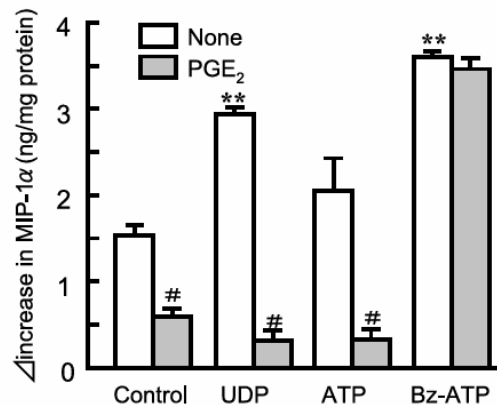


図 2. 細胞外ヌクレオチドによる MIP-1 の産生と PGE₂ による抑制

J774 細胞を 1 μM PGE₂ の非存在下あるいは存在下で、ATP (10 μM)、UDP (10 μM)、あるいは Bz-ATP (500 μM) により 1 時間刺激した際の培養上清を測定した。

したがって、ATPやUDPをはじめとする細胞外ヌクレオチドは、炎症を促進する作用があると考えられた。一方、炎症反応において主要な働きを担うPGE₂が、これらの細胞外ヌクレオチドの作用を受容体特異的に抑制し、抗炎症作用をもたらす可能性が示唆された。この受容体に対する抑制作用の差異はPGE₂による炎症性促進作用と抗炎症作用に関する報告の差と関連するかもしれない。

(3)次にプリン作動性シグナルとPGE₂のクロストークの詳細についてUDP/P2Y₆受容体に対するPGE₂の抑制機構に焦点を絞り検討した。まず、J774細胞におけるPGE₂受容体としてはEP2およびEP4受容体の発現が認められ、特にEP2受容体が豊富であった。ATPおよびUDPによる[Ca²⁺]_i上昇に対する各種EP受容体選択的アゴニストの抑制作用を検討した結果、EP2およびEP4受容体の選択的アゴニストがPGE₂の作用を模倣した。また、EP4受容体の選択的アンタゴニストがPGE₂の作用を減弱させた。さらに、EP2およびEP4受容体の選択的アゴニストは濃度依存的にcAMPレベルを上昇させたが、その作用はEP2選択的アゴニストでより強力であった。以上、受容体発現レベル、cAMP産生能などを勘案し、PGE₂は主にEP2受容体を介して作用していることが示唆され、既報よりGs蛋白質/cyclicAMP経路の関与が示唆された。しかしながら、フォルスコリン(FK)やジブチリルcAMP(dbcAMP)によるプロテインキナーゼA(PKA)シグナルの活性化では、UDPによる[Ca²⁺]_i上昇やPI代謝回転の亢進が抑制されなかった(図3、4)。

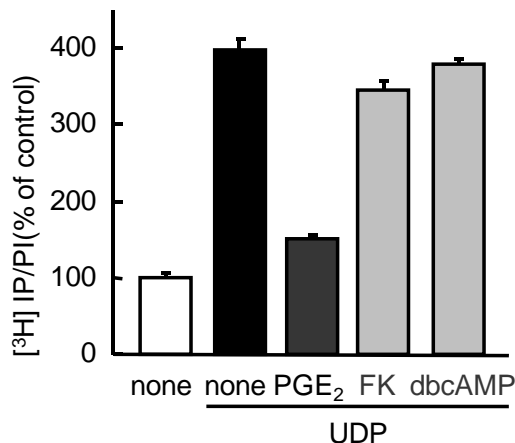


図3. UDPによるPI代謝回転の亢進に対するFKおよびdbcAMPの作用

また、UDPによる[Ca²⁺]_i上昇に対するPGE₂の抑制作用は、PKA阻害剤であるH89処理によっても減弱しなかった(図4)。

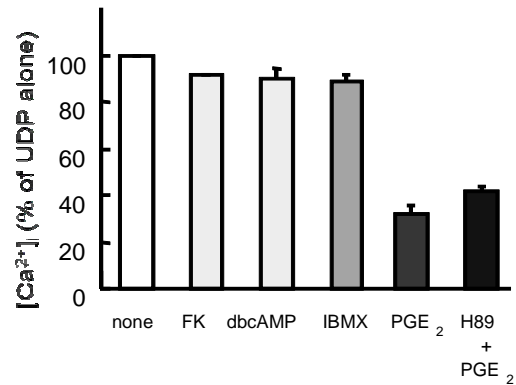


図4. UDPによる[Ca²⁺]_i上昇に対するcAMP/PKA経路修飾薬の影響

さらに、PGE₂によるUDP誘発PI代謝亢進の抑制作用は、百日咳毒素処理によってGiタンパク質を抑制しても影響を受けなかった。

J774細胞においてPGE₂は他のGq共役型受容体を介する[Ca²⁺]_i上昇も抑制したことから、Gq-PLC-Ca²⁺シグナルに共通する経路を阻害すると考えられた。また、PGE₂はフッ化アルミニウムによる直接的なG蛋白質活性化によるホスファチジルイノシトール(PI)代謝の亢進は抑制したが、カルシウムイオノフォアによる細胞外Ca²⁺の流入によるPI代謝亢進やシクロピアゾン酸誘発Ca²⁺ストア作動性の細胞外Ca²⁺流入は抑制しないことから、G蛋白質とPLCとの相互作用を阻害している可能性が考えられた(図5)。

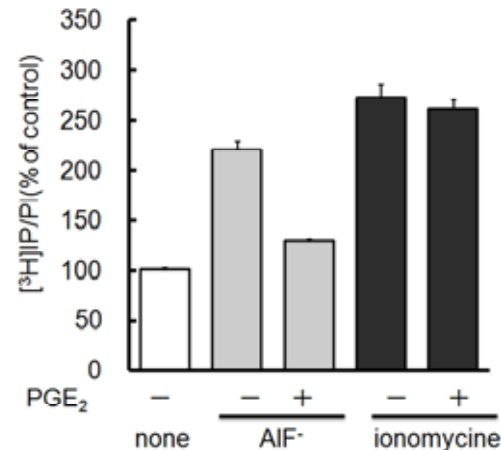


図5. フッ化アルミニウムあるいはイオノマイシンによるPI代謝亢進に対するPGE₂の作用

J774細胞を1 μM PGE₂の非存在下あるいは存在下で、フッ化アルミニウム(AIF⁻; 30 mM)あるいはイオノマイシン(10 μM)により10分間刺激した。

PGE₂は主にEP2を介してアデニル酸シクラーゼのType 7(AC7)を刺激してcAMP-PKAを活

性化すると考えられた。J774 細胞にはGqで活性化されるPLC としては、PLC- 3 のみが発現していた。PLC- 3 はPKAなどによりその1105 番目のセリン残基がリン酸化されると機能が抑制されることが報告されている。しかし、PKA阻害薬処理やAC7 遺伝子ノックダウンによりcAMP産生を阻害してもPGE₂の抑制作用は消失しなかった。また、cAMPのもう一つのエフェクター分子であるEpac (exchange protein directory activated by cAMP) に特異的なアゴニストを用いた検討から、PGE₂の抑制作用にEpacが関与する可能性も否定された。

以上の結果からPGE₂によるEP2 を介するGq-PLC-Ca²⁺シグナル制御機構にはAC-PKA以外の因子が関与し、それはGq蛋白質とPLCとの相互作用を阻害すると考えられた(図 6)。

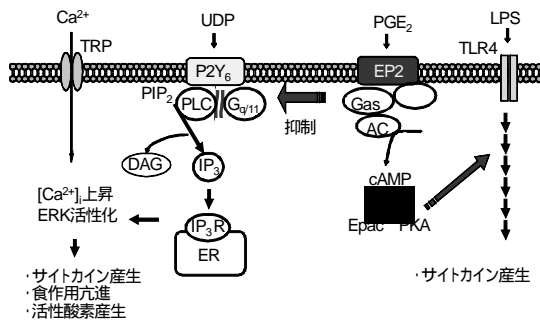


図 6. PGE₂によるJ774 細胞におけるP2Y₆プリン作動性シグナルの抑制

Gq-PLC シグナルは種々のホルモンや神経伝達物質からの多くの情報が収束される経路である。この抑制性調節機構の key となる分子の特定にはさらなる検討が必要であるが、本研究成果は Gq-PLC シグナルの抑制を標的にすることで、興奮性の生理機能応答を背景とする血圧上昇、気管支狭窄、免疫細胞のサイトカイン産生亢進、血栓形成などの様々な病態に対して、受容体遮断薬よりも広いスペクトルを持つ治療薬の創出につながるものと期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Kimura T, Tomura H, Sato K, Masaaki Ito, Isao Matsuoka, Im DS, Kuwabara A, Mogi C, Itoh H, Kurose H, Murakami M, Okajima F., Mechanism and role of high density lipoprotein-induced

activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells.

The Journal of Biological Chemistry, 査読有、Vol.285、2010、4387-97

松岡 功、伊藤 政明 Gタンパク質共役型受容体を介したホスホリパーゼCシグナル伝達系に対する抑制性調節機構 日本薬理学雑誌、査読有 Vol.134、2009、254-258

Masaaki Ito, Isao Matsuoka

Regulation of Purinergic Signaling by Prostaglandin E2 in Murine Macrophages. Journal of Pharmacological Sciences. 査読有 Vol. 107, 2008, 443-450

[学会発表] (計 6 件)

伊藤 政明、松岡 功 P2Y₆ 受容体発現1321N1ヒトアストロサイトーマ細胞におけるUDPによるCa²⁺シグナルに対するプロスタグランジンE2の作用、日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 17 日、大阪国際会議場 (大阪)

松岡 功、伊藤 政明、蓬田 伸一、血管内皮細胞の細胞外ヌクレオチド分解酵素活性に及ぼすHMG-CoA還元酵素阻害剤の影響、日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16 日、大阪国際会議場 (大阪)

伊藤 政明、松岡 功、Inhibition of P2Y₆ receptor-induced Ca²⁺ signaling by prostaglandin E2 in murine J774 macrophages., Fukuoka Purine 2009(IUPS 2009 サテライト) 平成 21 年 7 月 24 日、ホテル ルイガンズ (福岡)

伊藤 政明 松岡 功 マウスマクロファージJ774 細胞におけるUDPによるストア作動性Ca²⁺流入のプロスタグランジンE2 による抑制、日本薬理学会年会、平成 21 年 3 月 16 日、パシフィコ横浜

松岡 功、伊藤 政明、マクロファージのGq-ホスホリパーゼC情報伝達に対するプロスタグランジンE2による抑制性制御、日本薬理学会年会、平成 21 年 3 月 18 日、パシフィコ横浜

伊藤 政明 松岡 功、ホスホリパーゼCの抑制と共役する 7 回膜貫通型受容体のシグナル伝達機構の解析、特定領域研究班会議 (G蛋白質シグナル) 平成 20 年 9 月 19 日、NASPA ニューオータニ

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 政明 (ITOU MASAOKI)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：30438759

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

松岡 功 (MATSUOKA ISAO)
高崎健康福祉大学・薬学部・教授
研究者番号：10145633