

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790077

研究課題名 (和文) 新規プロスタグランジンD2受容体CRTH2を介した高次脳機能調節

研究課題名 (英文) Evaluation of the role of CRTH2, a novel prostaglandin D2 receptor, in higher brain function

研究代表者

新谷 紀人 (SHINTANI NORIHITO)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：10335367

研究成果の概要 (和文)：本研究では、CRTH2 の中枢機能の同定を目的として、その作動薬、拮抗薬、遺伝子欠損マウスを用いた検討を行い、CRTH2 が、光で誘発される位相前進性の概日リズム変化、リポ多糖(LPS)で誘発される新奇物体探索行動の減少、PC12 細胞における15-deoxy-PGJ₂ による神経栄養因子(NGF)誘発突起伸展の促進作用に関与することを見出した。これらの結果から高次脳機能における CRTH2 の役割が初めて明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：In this study, I aimed to determine the central function of CRTH2 by using agonists, antagonists, and knockout mice of CRTH2. I found that CRTH2 is involved in light-induced phase advance of circadian rhythm, lipopolysaccharide (LPS)-induced decrease of novel-object exploration behavior, and 15-deoxy-PGJ₂ enhancement of nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth in PC12 cells. These results demonstrate for the first time the role of CRTH2 in higher brain function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：薬理学、プロスタグランジン、遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells)は、2001年、その内因性リガンドがプロスタグランジン(PG)D₂であることが判明したオーファン受容体であり、PGの受容体としては最も研究の歴史が浅い分子である。またCRTH2は、脳内では海馬や嗅球、線条体等における発現が明らかにされているが、末梢の炎症反応における役割が精力的に解析されているのに対し、神経系での検討はほとんど為されていない。

一方で研究代表者は、神経ペプチドPACAPによる概日リズム制御作用の分子基盤解析の過程において、PACAPの下流標的として、リポカリンPGD₂合成酵素(L-PGDS)を同定した。またL-PGDSおよびCRTH2の遺伝子欠損マウスを用いた予備的検討から、これらの分子が、PACAPと同様に脳内において位相前進性の光誘発性概日リズム調節に関与すること、すなわち、L-PGDS-PGD₂-CRTH2シグナルが、中枢神経系で特定の高次脳機能制御に関わる可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、中枢神経系における PACAP の下流シグナル分子として同定した L-PGDS と CRTH2 に着目し、(1) 明暗環境順応、(2) 自発運動や探索行動、(3) 神経突起伸展などの中枢神経機能におけるこれら分子の関わりを解析した。以上により、CRTH2 の中枢機能の同定および、その創薬標的分子としての可能性評価を目標として研究を行った。

3. 研究の方法

PACAP, L-PGDS, CRTH2 の遺伝子欠損(KO)マウス、および CRTH2 の作動薬(非選択的 15-deoxy-PGJ₂ と選択的 DK-PGD₂)、拮抗薬(非選択的 ramatroban と選択的 CAY10471)を用いた。動物実験は大阪大学動物実験委員会で承認された実験計画にしたがって行った。

(1) 明暗環境順応：行動表現型として、光誘発性のリズム位相変化、夜間行動量の一過的抑制(マスキング)、瞳孔収縮を、分子機構として、視交叉上核における光誘発性の *period 1* 遺伝子発現誘導を評価した。

(2) 自発運動や探索行動：CRTH2-KO マウスの表現型を、SHIRPA プロトコルに従い網羅的に解析した。また脳内 PGD₂ 量を増加させる lipopolysaccharide (LPS) の腹腔内投与モデル(sickness behavior モデル)で認められる種々の行動変化や、脳神経核の活性化(c-Fos 発現誘導に関する免疫組織化学的検討)についても解析を行った。

(3) 神経突起伸展：PACAP で突起伸展作用が見られる神経細胞モデル PC12 細胞を用いた。シグナル機構の解明を目的として、イムノブロット法によるリン酸化 MAP kinase の定量等も行った。

4. 研究成果

本研究で得られた以下の成果は、5 に示すように、種々の学会(招待講演を含む)で発表を行うと共に、成果の一部については学術論文として公表した。

(1) 明暗環境順応：脳機能選択的な関与

PACAP, L-PGDS, CRTH2 の KO マウスの解析から、PACAP は光誘発の概日行動リズム位相制御、マスキング、交感神経活性化、の 3 種の明順応反応全てに関わるが、L-PGDS と CRTH2 は位相制御のみに関与することを明らかにした。また両分子は PACAP と同様、前進性の位相制御特異的に促進的に関与することを明らかにした。

一方、PACAP や L-PGDS の光誘発性のリズム位相制御の分子基盤については、既知の機構(時計遺伝子 *period 1* 遺伝子の発現誘導)と異なる可能性を見出した。

これらの成果は、一部論文として公表済みであり(論文②③)、他の成果に関しても現在論文を執筆中である。

(2) 探索行動等：意欲や好奇心制御への関与

CRTH2 の KO マウスは自発運動活性や感覚機能などに異常がない一方、強制水泳試験で無動時間の減少を示すことを見出した。

また LPS 誘発の sickness behavior モデルにおいて、本マウスでは、LPS 誘発の自発運動量や摂食量の減少が通常どおり認められる一方、他マウスとの社会的相互作用や新奇物体への探索行動の減少が消失すること、また LPS による強制水泳時の無動時間延長も有意に抑制されることを見出した。

一方、新規物体探索行動の減少は、LPS で誘発される行動変化のうち最も顕著な変化(最も低用量の LPS で認められかつ最も長時間持続する表現型)であることを見出し、またこれは炎症性病態時の意欲・好奇心低下を反映する表現型であることを示す各種の行動薬理学的データを得た。

なお ramatroban や CAY10471 脳室内投与後の行動解析や脳内 c-Fos 発現解析から、この LPS で誘発される“モノ”に対する探索行動減少には、脳内の CRTH2 を介した扁桃体中心核等の持続的活性化が重要である可能性を示す知見を得た。これらの成果についても、現在論文を執筆中である。

(3) 突起伸展：神経細胞における機能実証

PC12 細胞で、15d-PGJ₂ が NGF による p38 MAP キナーゼのリン酸化と神経突起伸展作用を増強すること、一方これらの作用は CAY10471 で阻害されることを見出した。

また DK-PGD₂ の単独処置で p38 MAP キナーゼの持続的なリン酸化亢進が認められる一方、神経突起伸展には影響が見られないことを示し、15d-PGJ₂ の作用発現において CRTH2 は必要ではあるが、十分条件にはならないことを明らかにした。これらの成果は論文にまとめ公表した(論文①)。

[総括と意義]

本研究により、CRTH2 は中枢神経系でも種々特有の機能を果たすことが初めて明らかとなり、PACAP の下流標的分子として、特に概日リズム、意欲や好奇心、神経突起伸展の制御に関与することが示された。

CRTH2 に関する論文報告は、2009 年以降、約 50 報が発表され全 200 報を超えた。これまで同様、末梢炎症モデルでの役割が精力的に解析されるほか、種々低分子量リガンド開発や、炎症性疾患とヒト CRTH2 遺伝子の一塩基多型との関連を示す報告等が相次ぎ、世界中の注目を集めつつある現状と言える。

そのなかで、神経系における CRTH2 の機能を明らかにした成果は、研究代表者が公表した論文①の他には未だなく、本研究で得た知見は CRTH2 の中枢機能研究で世界をリードするに十分な成果と考える。今後は、本研究で見出された、概日リズム、意欲・好奇心、神経形態制御等の機能から導かれる“CRTH2

と情動機能の関わり”に主眼を置き、CRTH2が同機能を制御する新しい機能分子としてどのような役割を担うのかについて、基礎および臨床の両面から解析を進めたいと考えている。

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)

①Hatanaka M, Shibata N, Shintani N, Haba R, Hayata A, Hashimoto H, Baba A., 15d-prostaglandin J₂ enhancement of nerve growth factor-induced neurite outgrowth is blocked by the chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T-helper type 2 cells (CRTH2) antagonist CAY10471 in PC12 cells., *J Pharmacol Sci.* (2010) 113(1), 89-93. 査読あり.

② Kawaguchi C, Isojima Y, Shintani N, Hatanaka M, Guo X, Okumura N, Nagai K, Hashimoto H, Baba A., PACAP-deficient mice exhibit light parameter-dependent abnormalities on nonvisual photoreception and early activity onset., *PLoS One* (2010) 5(2), e9286. 査読あり.

③ Tanida M, Shintani N, Morita Y, Tsukiyama N, Hatanaka M, Hashimoto H, Sawai H, Baba A, Nagai K., Regulation of autonomic nerve activities by central pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide., *Regul Pept.*, (2010) 161(1-3), 73-80. 査読あり.

[学会発表] (計19件)

① 新谷 紀人, 他, Lipopolysaccharide 腹腔内投与で誘発される精神機能変化の解析, 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2010.10.30, 大阪

② 新谷 紀人, 他, Sickness behavior 発現における中枢プロスタグランジン DP2 受容体の選択的役割, 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 2010.9.15~17, 宮城

③ 黒見 藍, 畑中 道賢, 新谷 紀人, 他, 概日リズムの前進性光同調選択的ナリポカリン型プロスタグランジン D₂ 合成酵素(L-PGDS)の関与, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010, 2010.9.11, 京都

④ 羽場 亮太, 新谷 紀人, 他, 特定の sickness behavior 発現における脳内 CRTH2 の選択的関与, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010, 2010.9.11, 京都

⑤ 尾中 勇祐, 羽場 亮太, 王 海波, 新谷 紀人, 他, 強制水泳試験時の行動調節における CRTH2 の役割, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010, 2010.9.11, 京都

⑥ 新谷 紀人, II型プロスタグランジン D₂ 受

容体(CRTH2/DP2)の中枢機能, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010, 2010.9.11, 京都

⑦ Haba R, Shintani N, et al., Involvement of a prostanoid receptor CRTH2 in the LPS-induced decrease in object exploration behavior, *Neuro2010* (第33回日本神経科学学会・第53回日本神経化学学会・第20回日本神経回路学会合同大会), 2010.9.2~4, 神戸

⑧ 尾中 勇祐, 羽場 亮太, 新谷 紀人, 他, CRTH2 遺伝子欠損マウスの行動薬理学的特性, 第117回日本薬理学会近畿部会, 2010.7.8, 徳島

⑨ Shintani N, et al., Specific involvement of prostaglandin D₂ signaling in the light-induced phase advance of circadian rhythm, *Official Satellite Symposium of the 14th International Congress of Endocrinology (GPCR2010)*, 2010.3.30-31, Kyoto Garden Palace, Kyoto (招待シンポジウム)

⑩ 羽場 亮太, 新谷 紀人, 他, LPS 誘発 sickness behavior に対する新規プロスタノイド受容体 CRTH2 の関与, 日本薬学会第130年会, 2010.3.28~30, 岡山

⑪ Hatanaka M, Shintani N, et al., Mice lacking L-PGDS showed specific impairment in the light-induced phase advance of locomotor rhythm, 第83回日本薬理学会年会, 2010.3.16~18, 大阪

⑫ Haba R, Shintani N, et al., Involvement of novel prostanoid receptor CRTH2 in LPS-induced sickness behaviors, 第83回日本薬理学会年会, 2010.3.16~18, 大阪

⑬ 新谷 紀人, 他, 精神行動・情動機能制御における中枢 CRTH2 の役割, CRTH2 研究会, 2010.2.27, 東京 (招待講演)

⑭ 王 海波, 羽場 亮太, 新谷 紀人, 他, Lipopolysaccharide (LPS)誘発 sickness behavior に対する PGD₂・TXA₂ 受容体拮抗薬ラマトロバンの作用, 第116回日本薬理学会近畿部会, 2009.11.13, 滋賀

⑮ Hatanaka M, Shintani N, et al., Identification of a novel signaling cascade specifically involved in the light-induced phase advance of circadian rhythm by using PACAP knockout mice, *The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides*, 2009.10.4~8, 鹿児島

⑯ Shibata N, Hatanaka M, Shintani N, et al., 15-Deoxy- Δ -prostaglandin J₂ enhances NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via a CRTH2 receptor-p38 MAP kinase pathway, *The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides*, 2009.10.4~8, 鹿児島

⑰ Shintani N, et al., L-PGDS-PGD₂-CRTH2 signaling is a novel signaling cascade specifically involved in light-induced phase advance of circadian rhythm, 第36回国際生理学会世界大

会 (IUPS2009) , 2009.7.27~8.1, 京都

⑱羽場 亮太, 畑中 道賢, 新谷 紀人, 他, PGD₂受容体 CRTH2 アゴニストのオープンフィールド行動に対する作用, 第 115 回日本薬理学会近畿部会, 2009.6.26, 金沢

⑲羽場 亮太, 畑中 道賢, 新谷 紀人, 他, 精神運動機能調節における CRTH2 受容体の役割に関する行動薬理的検討, 第 6 回 GPCR 研究会, 2009.5.8~9, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新谷 紀人 (SHINTANI NORIHITO)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号 : 10335367