

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22688024

研究課題名(和文) PGD2産生制御による病態治療と組織再生方法の確立

研究課題名(英文) Investigation of the pathophysiological role of an anti-inflammatory mediator prostaglandin D2.

研究代表者

村田 幸久 (MURATA, Takahisa)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40422365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円、(間接経費) 6,210,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、“血管透過性抑制因子として知られるプロスタグランジンD2(PGD2)の産生制御を炎症病態の治療と損傷組織における血管再生に応用すること”を目的として行った。遺伝子欠損マウスを作製して薬理学・生化学的な手法を用いて解析を行い、() PGD2産生制御機構の解明、() 尿中PGD2代謝産物検出方法の確立、() 癌や肺炎に代表される炎症病態へのPGD2シグナルの治療応用、() PGD2シグナルを利用した血管や組織再生方法の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：We here investigated the pathophysiological role of an anti-inflammatory mediator prostaglandin D2. We found that 1) integral membrane protein Caveolin-1 modulates prostaglandin synthase activity, 2) urinary metabolite of prostaglandin D2 might be biomarker of various inflammatory diseases, 3) prostaglandin D2 signal enhancement inhibit the progressions of inflammatory diseases, 4) inhibition of prostaglandin D2 synthase leads vascular and tissue regenerations. These observations provide new insights for future therapy against inflammatory diseases and tissue re-generation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：薬理 炎症 病態 組織再生

1. 研究開始当初の背景

炎症反応は損傷を受けた組織の修復と機能回復を担う、すべての動物が備え持つ生体防御機構である。その中心的役割を果たす 6 種類のプロスタグランジン(PG)は血圧から、体温、痛みの調節まで多様な生理活性を示す。その1つである PGD₂ は、免疫細胞の細胞膜のアラキドン酸を基質として、シクロオキシゲナーゼ (COX1/2) と PGD₂ 合成酵素 (H-PGDS)によって代謝・産生される。これまでに、肥満細胞から大量に産生される PGD₂ がアレルギーの発症に関与することがわかっている (Murata Science 1997)。しかし、PGD₂ の半減期は 1.5 分と非常に短く、末梢組織での検出が難しいことから、その詳細な産生機構と生理作用については明らかにされていない。

代表者は、PGD₂ の血管組織における病態生理学的役割に着目し、PGD₂ が“炎症組織における血管透過性亢進とそれに続く血管新生に対する強力な抑制分子”であることを世界に先駆けて証明した(前研究提案: 若手 A; 2006-2009)。

PGD₂ は血管透過性のブレーキとして組織の炎症バランスと血管新生を制御する、これまでにない全く新しい生理活性物質である。そのシグナルの増強は過度な炎症反応に起因する病態への進展を防ぎ、効率的な抑制は虚血や再生不良に陥った組織での速やかな血流再開と血管再生、ひいては組織の再生をも促進できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究提案ではこれまでに得た研究結果を基に、“PGD₂ 産生制御の分子基盤の解明”と“血管透過性制御による慢性炎症病態治療方法と組織再生方法の確立”をめざす。

3. 研究の方法

以下に主な実験方法について記述する。

(1) PGD₂ 産生制御機構の解明: 単離血管内皮細胞やマクロファージを用い、細胞内 Ca 濃度測定、ウェスタンブロット、PCR、免疫沈降を用いて解析を行った

(2) PGD₂ 検出方法の確立: マウスを用いて腸炎、肺炎、移植癌モデルを作成し、代謝ゲージを用いて尿を採取した。採取した尿を質量分析装置にかけ、PGD₂ 代謝産物の濃度測定を行った。

(3) 慢性炎症病態への治療応用: プレオマイシン投与による慢性肺炎モデルを作成し、その病態解析を行った。このモデルに PGD₂ 合成酵素の遺伝子欠損や PGD₂ 受容体作動薬の投与が与える影響を検討した。

(4) 血管再生方法の確立: 虚血性下肢壊死モデルを作成し、PGD₂ 合成酵素の遺伝子欠損や PGD₂ 受容体作動薬の投与が与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) PGD₂ 産生制御機構の解明:

PG を産生する炎症性細胞にはカベオラという膜の窪み構造がある。その構造蛋白質である Caveolin-1 に PG 合成酵素と COX-1 が細胞内の Ca²⁺濃度の上昇に伴って結合し、効率よく基質 (膜リン脂質) から PG を産生していることを解明した。

H-PGDS と Caveolin-1 との結合には、Caveolin-1 の scaffolding ドメインが関与していることをプルダウンアッセイを用いて明らかにした。

膜透過性の Caveolin-1 ペプチドを合成し、投与することで PGD₂ の産生抑制に成功した。

(2) PGD₂ 検出方法の確立

マウスの移植癌の成長や肺炎の症状増悪に伴い、PGD₂の代謝産物である PGDM の尿中への排泄量が増加することが、質量分析装置を用いた検討により明らかとなり、この病態マーカーとしての有用性が示された。

マウスのDSS誘発性腸炎やTNBS誘発性腸炎、アジュバンド誘発性リウマチモデルの尿中に排泄されるPG代謝産物の濃度測定を行い。この一部の代謝産物が、これの病態のマーカーとなる可能性があることを示すことができた。

(3) 慢性炎症病態への治療応用

PGD₂が組織の慢性炎症と繊維化に及ぼす影響を、“血管透過性と病態進行との相関”に焦点をあて検討を行った。その結果PGD₂の欠損が菌体成分投与による肺炎、ブレオマイシン投与による肺線維症、炎症誘発性の大腸癌の発症や進行を大幅に促進することが分かった。

これらの病態症状の増悪には、各組織における血管透過性の異常亢進が伴うことを明らかにした。

PGD₂受容体作動薬の連続投与が、移植癌の増殖や肺の炎症を抑制することを明らかにした。

骨髄細胞特異的な遺伝子欠損マウスを作成してもちいることで、これらの治療効果が血管内皮細胞のDP受容体活性が必須であることを明らかにした。

PGD₂受容体作動薬の連続投与が、マウスの腸炎やそれに続く発がんを抑えることを明らかにした。

(4) 血管再生方法の確立

PGD₂の産生阻害が、血管新生を促進するメカニズムの解明を目的に実験を行った。遺伝子発現解析の結果、虚血状態に陥った組織において、PGD₂産生阻害は血管新生促進因子やサイトカインの発現を上昇させること

を明らかにした。

血管再生方法の確立:将来的な治療応用を見据え、新規PGD₂受容体阻害剤のスクリーニング系を確立し、複数の候補物質の選択に成功した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20件)

1. Sarashina H, Tsubosaka Y, Omori K, Aritake K, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H, Murata T. Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. *J Immunol*. 査読有. 2014; 192(1):459-65. doi: 10.4049/jimmunol.1302080.
2. Kida T, Omori K, Hori M, Ozaki H, Murata T. Stimulation of G protein-coupled bile acid receptor enhances vascular endothelial barrier function via activation of protein kinase A and Rac1. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有. 2014; 348(1):125-30. doi: 10.1124/jpet.113.209288.
3. Kida T, Sawada K, Kobayashi K, Hori M, Ozaki H, Murata T. Diverse effects of prostaglandin E2 on vascular contractility. *Heart Vessels*. 査読有. 2014; 29(3):390-5. doi: 10.1007/s00380-013-0374-6.
4. Nakamura T, Murata T, Hori M, Ozaki H. UDP induces intestinal epithelial migration via the P2Y6 receptor. *Br J Pharmacol*. 査読有. 2013; 170(4):883-92. doi: 10.1111/bph.12334.
5. Kida T, Tsubosaka Y, Hori M, Ozaki H, Murata T. Bile acid receptor TGR5 agonism induces NO production and reduces monocyte adhesion in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有. 2013; 33(7):1663-9. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301565.

6. Ayabe S, Kida T, Hori M, Ozaki H, Murata T. Prostaglandin D2 inhibits collagen secretion from lung fibroblasts by activating the DP receptor. *J Pharmacol Sci*. 査読有. 2013; 121(4):312-7.
7. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H. Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有. 2013; 110(13):5205-10. doi: 10.1073/pnas.1218091110.
8. Iwanaga K, Murata T, Hori M, Ozaki H. Purinergic P2Y1 receptor signaling mediates wound stimuli-induced cyclooxygenase-2 expression in intestinal subepithelial myofibroblasts. *Eur J Pharmacol*. 査読有. 2013; 702(1-3):158-64. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.025.
9. Kobayashi K, Tsubosaka Y, Hori M, Narumiya S, Ozaki H, Murata T. Prostaglandin D2-DP signaling promotes endothelial barrier function via the cAMP/PKA/Tiam1/Rac1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有. 2013; 33(3):565-71. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300993.
10. Sakai S, Murata T, Tsubosaka Y, Ushio H, Hori M, Ozaki H. γ -Oryzanol reduces adhesion molecule expression in vascular endothelial cells via suppression of nuclear factor- κ B activation. *J Agric Food Chem*. 査読有. 2012;60(13):3367-72. doi: 10.1021/jf2043407.
11. Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Michishita M, Matsuoka T, Narumiya S, Ozaki H, Hori M. EP2 and EP4 receptors on muscularis resident macrophages mediate LPS-induced intestinal dysmotility via iNOS upregulation through cAMP/ERK signals. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 査読有. 2012; 302(5):G524-34. doi: 10.1152/ajpgi.00264.2011.
12. Iwanaga K, Okada M, Murata T, Hori M, Ozaki H. Prostaglandin E2 promotes wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP2, EP3, and EP4 prostanoid receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有. 2012; 340(3):604-11. doi: 10.1124/jpet.111.189845.
13. Murata T, Aritake K, Matsumoto S, Kamauchi S, Nakagawa T, Hori M, Momotani E, Urade Y, Ozaki H. Prostaglandin D2 is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有. 2011; 108(49):19802-7. doi: 10.1073/pnas.1110011108.
14. Takimoto T, Suzuki K, Arisaka H, Murata T, Ozaki H, Koyama N. Effect of N-(p-coumaroyl)serotonin and N-feruloylserotonin, major anti-atherogenic polyphenols in safflower seed, on vasodilation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Nutr Food Res*. 査読有. 2011; 55(10):1561-71. doi: 10.1002/mnfr.201000545.
15. Maruyama T, Ayabe S, Murata T, Hori M, Ozaki H. Relaxant effect of prostaglandin D(2)--receptor DP agonist on liver myofibroblast contraction. *J Pharmacol Sci*. 査読有. 2011;116(2):197-203.
16. Kobayashi K, Murata T, Hori M, Ozaki H. Prostaglandin E2-prostanoid EP3 signal induces

vascular contraction via nPKC and ROCK activation in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol.* 査読有. 2011; 660(2-3):375-80. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.03.032.

17. Iizuka M, Murata T, Hori M, Ozaki H. Increased contractility of hepatic stellate cells in cirrhosis is mediated by enhanced Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-sensitization pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 査読有. 2011; 300(6):G1010-21. doi: 10.1152/ajpgi.00350.2010.

18. Nakamura T, Iwanaga K, Murata T, Hori M, Ozaki H. ATP induces contraction mediated by the P2Y(2) receptor in rat intestinal subepithelial myofibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 査読有. 2011; 657(1-3):152-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.01.047.

18. Kajita M, Murata T, Horiguchi K, Iizuka M, Hori M, Ozaki H. iNOS expression in vascular resident macrophages contributes to circulatory dysfunction of splanchnic vascular smooth muscle contractions in portal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 査読有. 2011; 300(3):H1021-31. doi: 10.1152/ajpheart.00563.2009.

19. Kida T, Chuma H, Murata T, Yamawaki H, Matsumoto S, Hori M, Ozaki H. Chronic treatment with PDGF-BB and endothelin-1 synergistically induces vascular hyperplasia and loss of contractility in organ-cultured rat tail artery. *Atherosclerosis.* 査読有. 2011; 214(2):288-94. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.001.

20. Tsuchida Y, Hatao F, Fujisawa M, Murata T, Kaminishi M, Seto Y, Hori M, Ozaki H. Neuronal

stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via $\alpha 7$ nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. *Gut.* 査読有. 2011; 60(5):638-47. doi: 10.1136/gut.2010.227546.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：血管新生促進剤

発明者：村田 幸久, 裏出 良博, 有竹 浩介

権利者：東京大学

種類：PCT 出願

番号：JP2010/069040

出願年月日：2010 年 10 月 27 日

国内外の別： 国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/houshasen/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田 幸久 (MURATA Takahisa)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40422365

(2)研究分担者