

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460338

研究課題名(和文)慢性炎症性疾患の病態制御におけるマクロファージEPRAPの役割と診断・治療応用

研究課題名(英文)Role of EPRAP on the pathophysiology of chronic inflammatory diseases

研究代表者

南学(MINAMI, Manabu)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90511907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：EPRAPは、マクロファージにおいて、プロスタグランジンE2受容体EP4の新規細胞内ドメイン結合蛋白として同定され、炎症性刺激後のMEK-ERK経路の活性化を特異的に抑制する。本研究では、独自に開発したEPRAP遺伝子改変動物を用い、慢性炎症病態モデルにおけるEPRAPの機能を検討した。その結果、炎症性腸疾患などの発症、進展にEPRAPが極めて重要な役割を担っており、EP4-EPRAPシグナルが、難治性慢性疾患の新規の診断・治療標的となる可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：EP4 receptor-associated protein, EPRAP, has been identified as a novel cytoplasmic regulator of macrophage activation, which inhibits MEK-ERK pathway activation induced by inflammatory stimuli. In this study, we aimed to dissect the significance and pathophysiological roles of EPRAP on chronic inflammation in vivo. We generated EPRAP-deficient mice as well as transgenic mice with enforced expression of EPRAP in macrophages, and created various animal models of chronic inflammatory diseases. Our study demonstrated that EPRAP deficiency markedly worsened the inflammatory phenotypes and outcomes of inflammatory bowel disease and pulmonary fibrosis. Our results indicated that EPRAP plays crucial roles in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases; and EP4-EPRAP signaling could be a novel diagnostic or therapeutic target for refractory chronic diseases.

研究分野：内科学、薬理学、代謝学、炎症・免疫学

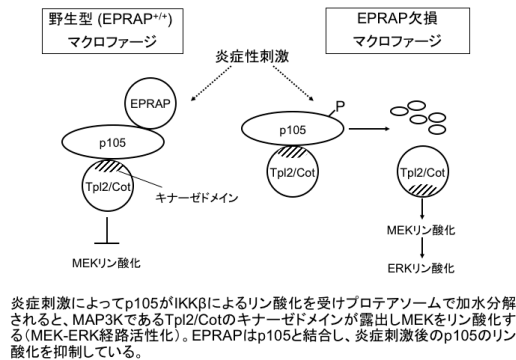
キーワード：EPRAP マクロファージ 慢性炎症 シグナル情報伝達 翻訳後修飾

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、生体防御や恒常性の維持を司る。近年、マクロファージが、その多彩な機能を通じ、代謝性疾患(インスリン抵抗性・2型糖尿病)や動脈硬化、がんの発生・転移など、様々な難治性慢性疾患の病態に深く関与していることが明らかになり、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/FEM1Aは、プロスタグランジンE2のEP4受容体の新規結合蛋白として同定された。EP4受容体シグナルはマクロファージの炎症性活性化を抑制するが、我々は、EPRAPがその中心的な役割を果たしていることを報告した。すなわち、EPRAPは、MEK/ERKおよびNF-κB経路の拮抗分子であるNF-κB 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し、両経路の活性化を抑制する(M. Minami, et al. J Biol Chem, 2008)【図1】。

【図1】 EPRAPによるマクロファージ活性化抑制機序



生体でのEPRAPの機能解明のため、我々は、独自にEPRAP遺伝子改変動物(EPRAP欠損マウス、及びマクロファージ特異的EPRAP過剰発現マウス)を作成した。慢性炎症の病態において、EPRAPは、EP4受容体下流にあってマクロファージの炎症性活性化を負に制御する内因性の重要な抑制分子であり、難治性慢性疾患の病態生理に重要な役割を果たしている可能性がある。

2. 研究の目的

慢性炎症の病態におけるEPRAPの病態生理学的な機能を詳細に検討し、難治性慢性疾患に対する、EP4受容体-EPRAP経路を標的とした、新規診断・治療法開発に向けた探索的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 慢性疾患の病態におけるEPRAPの機能解析

マクロファージの関与する様々な慢性疾患の病態におけるEPRAPおよびその下流シグナルの機能を解明することは、これを標的とした新規医療開発の上で欠かすことができない。EPRAP遺伝子改変動物(EPRAP欠損マウス、及びマクロファージ特異的EPRAP過剰発現マウス)を用いて、慢性炎症疾患モデル(炎症性腸疾患モデル、薬剤性肺臓炎モデルなど)を作成し、EPRAPの病態生理学的な機能を詳細に検討する。

ウス、及びマクロファージ特異的EPRAP過剰発現マウス)を用いて、慢性炎症疾患モデル(炎症性腸疾患モデル、薬剤性肺臓炎モデルなど)を作成し、EPRAPの病態生理学的な機能を詳細に検討する。

(2) EPRAPの翻訳後修飾の検討

これまで我々は、EPRAPの抗炎症作用の発現には、EP4受容体へのリガンド結合後に、EPRAPの何らかの「活性化」が必要であることを確認しているが、詳細は不明である。EPRAPの活性化機序を明らかにすることは、EP4-EPRAP経路、およびその下流標的シグナルを選択的に賦活化させる新規薬剤の開発には必須である。

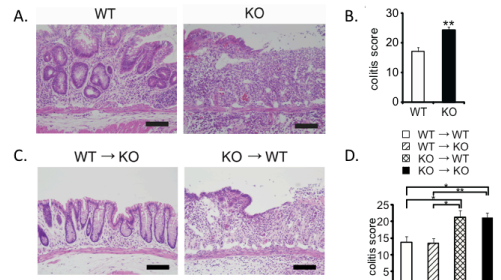
データベース上、ヒト・マウスEPRAPには共通に保存されたリン酸化等の予測部位が存在する。これらの部位別のミュータントEPRAP発現プラスミドを作成し、EPRAP遺伝子欠損マウス胎児線維芽細胞(MEF)に導入する。野生型EPRAPと、それぞれの翻訳後修飾予測部位のミュータントEPRAPを導入した場合の抗炎症効果を比較し、抗炎症作用発現に重要なEPRAP翻訳後修飾およびその部位を同定する。

4. 研究成果

(1) 慢性疾患の病態におけるEPRAPの機能解析

EPRAP遺伝子改変動物を用いて、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)経口投与による炎症性腸疾患を作成した。EPRAP遺伝子欠損マウスでは腸炎の著しい悪化と粘膜下浸潤マクロファージの炎症性活性化亢進を認めしたが、マクロファージ特異的にEPRAPを発現させることによりこれらの表現型は回復した【図2】。

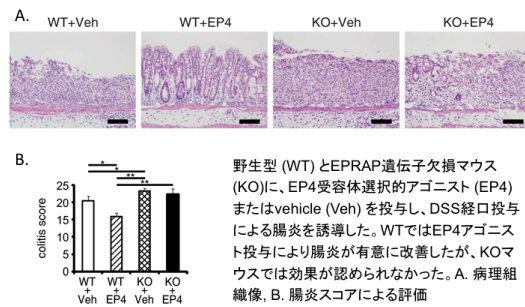
【図2】 マクロファージのEPRAP欠損はDSS腸炎の病態を悪化させる



【上】EPRAP遺伝子欠損マウス(KO)は野生型(WT)と比較し、有意に腸炎が悪化した。【下】KOマウスにWT骨髄細胞を移植すると腸炎は改善した(WT→KO)が、WTにKOマウス骨髄細胞を移植する(KO→WT)と腸炎は悪化した。A, C. 病理組織像, B, D., 腸炎スコアによる評価

野生型ではEP4受容体選択的アゴニスト投与によりDSS腸炎の表現型改善を認めしたが、EPRAP遺伝子欠損マウスでは効果を示さなかった【図3】。このことから、EP4受容体シグナルによる腸管炎症制御には、下流分子としてEPRAPが必須であることが示された(Nakatsuji M, et al. PLoS Genet. 2015)。

【図3】 EPRAPはEP4受容体シグナルの抗炎症作用に必須である



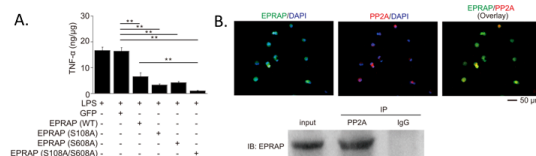
ブレオマイシン (BLM) 経気管投与による肺臓炎モデルでも、EPRAP 遺伝子欠損による炎症の悪化と肺胞マクロファージの活性化、EP4 受容体アゴニスト投与が無効であるなど全く同様の結果を得られた (Higuchi S, et al. J Immunol, 2016)。

(2) EPRAP の翻訳後修飾の検討

EPRAP は定常状態でリン酸化されていることが報告されていたが (Cambier, L, et al. FEBS Lett, 2009; Wagner, S. et al. Mol. Cell. Proteomics, 2012)、我々は EPRAP 変異体や BLM 肺臓炎マウスの肺胞マクロファージを用いた検討から、EPRAP は protein phosphatase 2A (PP2A) の器質であり、PP2A によって特定のセリン残基 (S108/S608) が脱リン酸化を受けることが EPRAP の抗炎症作用発現に極めて重要であることを明らかにした。

【図4】

【図4】 EPRAP の脱リン酸化と抗炎症作用



(A) EPRAP 遺伝子欠損マウス胎児線維芽細胞に各 EPRAP 変異体をトランスフェクションし、LPS 刺激後の TNF- α 産生量を比較した。
(B) BLM 肺臓炎マウス肺胞マクロファージにおける、EPRAP と PP2A の共発現。

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 7 件)

- ① Fukumitsu, R., M. Minami*, K. Yoshida, M. Nagata, M. Yasui, S. Higuchi, R. Fujikawa, T. Ikedo, S. Yamagata, Y. Sato, H. Arai, M. Yokode, S. Miyamoto. Expression of Vasohibin-1 in Human Carotid Atherosclerotic Plaque. 査読有、J Atheroscler Thromb. 2015; 22(9):942-8. doi: 10.5551/jat.29074. (*Corresponding author)
- ② Hamanishi, J., M. Mandai, T. Ikeda, M.

Minami, A. Kawaguchi, T. Murayama, M. Kanai, Y. Mori, S. Matsumoto, S. Chikuma, N. Matsumura, K. Abiko, T. Baba, K. Yamaguchi, A. Ueda, Y. Hosoe, S. Morita, M. Yokode, A. Shimizu, T. Honjo, I. Konishi. Safety and Anti-tumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients with Platinum-resistant Ovarian Cancer. 査読有、J Clin Oncol. 2015; 33(34):4015-22. doi: 10.1200/JCO.2015.62.3397.

- ③ Yasui, M., Y. Tamura, M. Minami*, S. Higuchi, R. Fujikawa, T. Ikedo, M. Nagata, H. Arai, T. Murayama, and M. Yokode. The Prostaglandin E2 Receptor EP4 Regulates Obesity-related Inflammation and Insulin Sensitivity. 査読有、PLOS One, 2015; 10(8):e0136304. doi: 10.1371/journal.pone.0136304. (*Corresponding author)
- ④ Nakatsuji, M., M. Minami*, H. Seno*, M. Yasui, H. Komekado, S. Higuchi, R. Fujikawa, Y. Nakanishi, A. Fukuda, K. Kawada, Y. Sakai, T. Kita, P. Libby, H. Ikeuchi, M. Yokode, and T. Chiba. EP4 receptor-associated protein in macrophages ameliorates colitis and colitis-associated tumorigenesis. 査読有、PLoS Genet. 2015; 11(10):e1005542. doi: 10.1371/journal.pgen.1005542. (*Corresponding author)
- ⑤ Fujikawa R, S. Higuchi, M. Nakatsuji, M. Yasui, T. Ikedo, M. Nagata, M. Yokode, and M. Minami*. EP4 Receptor-Associated Protein in Microglia Promotes Inflammation in the Brain. 査読有、Am J Pathol. 2016. Aug; 186(8):1982-1988. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.04.002. (*Corresponding author)
- ⑥ Higuchi S, R. Fujikawa, T. Ikedo, K. Hayashi, M. Yasui, M. Nagata, M. Nakatsuji, M. Yokode, and M. Minami*. EP4 receptor-associated protein (EPRAP) in macrophages protects against bleomycin-induced pulmonary inflammation in mice. 査読有、J Immunol. 2016; 197(11):4436-4443. doi:10.4049/jimmunol.1502618 (*Corresponding author)
- ⑦ Fujikawa R, S. Higuchi, T. Ikedo, M. Nagata, K. Hayashi, T. Yang, T. Miyata,

M. Yokode, M. Minami*. Behavioral abnormalities and reduced norepinephrine in EP4 receptor-associated protein (EPRAP)-deficient mice. 査読有、Biochem and Biophys Res Commun. 2017; 486(2):584-588. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.095. (*Corresponding author)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 南学, 安井 美加, 横出 正之: 肥満に伴う慢性炎症における EP4 受容体の機能解析、第 51 回日本臨床分子医学会学術集会, 4/11/2014, 東京・東京
- ② Yasui, M., M. Minami, M. Yokode: Role of EP4 signaling in obesity-related inflammation, The 18th International Vascular Biology Meeting, 4/14/2014, Kyoto, Kyoto
- ③ Yasui, M., M. Minami, M. Yokode: EP4 receptor regulates obesity-related Inflammation and insulin sensitivity, The 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, 9/13/2014, Kyoto, Kyoto
- ④ 南学: 化学療法時の薬剤性心毒性におけるバイオマーカーの有用性(ランチョンセミナー)、第 46 回日本臨床検査自動化学会, 10/11/2014, 兵庫・神戸
- ⑤ Fujikawa, R., M. Minami, S. Higuchi, M. Yasui, T. Ikedo, M. Nagata, M. Yokode: EP4 receptor-associated protein (EPRAP) in microglia promotes inflammation in the brain、Neuroscience 2014, 11/18/2014, Washington DC, USA
- ⑥ 安井 美加, 南学, 横出 正之: 肥満による脂肪組織の炎症およびインスリン抵抗性における EP4 受容体の役割、第 37 回日本分子生物学会年会, 11/26/2014, 神奈川・横浜
- ⑦ 藤川 理沙子, 樋口 聖, 南学, 安井美加, 池堂太一, 永田学, 横出 正之: EP4 receptor-associated protein (EPRAP) exerts anti-inflammatory effects through dephosphorylation by PP2A (優秀発表演題)、第 88 回日本薬理学会年会, 3/18/2015, 愛知・名古屋
- ⑧ 樋口 聖, 南学, 藤川 理沙子, 安井美加, 池堂太一, 永田学, 横出 正之: EP4 receptor-associated protein (EPRAP) regulates gluconeogenesis in

the liver、第 88 回日本薬理学会年会, 3/20/2015, 愛知・名古屋

- ⑨ 南学: 薬剤性心毒性の臨床的重要性(ランチョンセミナー)、第 79 回日本循環器学会, 4/25/2015, 大阪・大阪
- ⑩ 安井 美加, 南学, 横出 正之: EP4 受容体活性化による 2 型糖尿病マウスのインスリン抵抗性改善機構、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 5/21/2015, 山口・下関
- ⑪ Fujikawa, R., M. Minami, S. Higuchi, M. Yasui, T. Ikedo, M. Nagata, M. Yokode: EP4 receptor-associated protein (EPRAP) deficient mice exhibited behavioral abnormalities, Neuroscience 2015, 10/19/2015, Chicago, USA
- ⑫ Yasui, M., M. Minami, M. Yokode: Role of EP4 signaling in islet inflammation induced by pancreatic macrophages、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同大会, 12/3/2015, 兵庫・神戸
- ⑬ 安井 美加, 南学, 横出 正之: 膵臓マクロファージによる膵β細胞の慢性炎症における EP4 シグナルの役割(若手優秀発表賞)、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同大会, 12/4/2015, 兵庫・神戸
- ⑭ 南学: 冠動脈危険因子の管理-脂質異常症- (Educational プログラム)、近畿心血管治療ジョイントライブ, 4/22/2016, 京都・京都
- ⑮ 南学: Onco-Cardiology の国内外の現状と早期診断におけるバイオマーカーの有用性 (シンポジウム指定講演)、第 64 回日本心臓病学会, 9/23/2016, 東京・東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 学 (MINAMI, Manabu)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 905011907

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

妹尾 浩 (SENO, Hiroshi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 90335266

(4) 研究協力者

中辻 正人 (NAKATSUJI, Masato)
安井 美加 (YASUI, Mika)
藤川 理沙子 (FUJIKAWA Risako)
樋口 聖 (HIGUCHI, Sei)
福光 龍 (FUKUMITSU, Ryu)
池堂 太一 (IKEDO, Taichi)
永田 学 (NAGATA, Manabu)
林 晃佑 (HAYASHI, Kosuke)
宮田 武 (MIYATA, Takeshi)
楊 涛 (YANG, Tao)