

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590169

研究課題名(和文)プロスタグランジンD2のシグナル伝達機構の解明と新規受容体の検索

研究課題名(英文)Possible novel receptor and its signaling pathway for prostaglandin D2

研究代表者

小山田 一(OYAMADA, Hajime)

秋田大学・医学部・臨床検査技師長

研究者番号：80375310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタグランジンD2(PGD2)はアレルギー炎症の形成に重要な役割を担っている。PGD2の作用は細胞表面受容体であるCRTH2/DP1、もしくは核内受容体を介していることが知られていたが、これまでの検討から未知の細胞表面受容体の存在が示唆された。

われわれはPGD2がケモカイン受容体CCR3の発現を抑制し、これが通常リガンド刺激で認められるinternalizationによるものであることを見いだした。そこでPGD2がCCR3を介して機能している可能性を、トランスフェクション細胞を用いた受容体結合試験やカルシウムシグナルによる検討を行ったが、いずれにおいても否定的な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin D2 (PGD2) has been known to play an important role in allergic inflammation through cell surface receptor CRTH2 and DP1, and also through nuclear receptor PPAR $\gamma$ . Our previous study suggested the presence of novel receptor other than these three known receptors for PGD2.

Since we found that PGD2 induced chemokine receptor CCR3 internalization, we studied the possibility that PGD2 act through CCR3. Receptor binding assay and calcium signaling assay using CCR3-transfected cell indicated that PGD2 did not bind/activate CCR3.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：プロスタグランジンD2 PGD2受容体 ケモカイン受容体CCR3 アレルギー炎症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) プロスタグランジン D2 は脳において覚醒を司るほか、非常に強い気管の収縮や血管透過性亢進など、広範な生物学的活性を有しており、最近ではアレルギー性炎症反応の増悪に関与するという報告が相次いでいる。一方、このプロスタグランジン D2 の受容体について明らかになってきたのは最近であり、以前から知られていた細胞表面上の DP 受容体に加え、もう一つの G 蛋白共役型受容体として CRTH2 が 2001 年に報告された (Hirai H, et al. J Exp Med. 2001)。この CRTH2 は、肥満細胞・Th2 リンパ球や好酸球に選択的に発現し、細胞の遊走・活性化を強く惹起することが報告され (Iwasaki M et al. J Invest Dermatol. 2002)、アレルギー疾患の治療ターゲットとして注目されている。

(2) プロスタグランジン D2 は、血球系細胞 (リンパ球・肥満細胞・好酸球といった炎症性細胞) ではその機能が徐々に明らかとなっているが、気管支喘息をはじめとするアレルギー性気道炎症疾患の主要な炎症の場である気道上皮に対する作用は知られていなかった。そこでわれわれは、これまでヒト気道上皮細胞に対するプロスタグランジン D2 の機能について検索したところ、IL-8・GM-CSF といった炎症性サイトカインが産生されることを見出し、気道上皮細胞にはプロスタグランジン D2 の受容体である DP と CRTH2 がともに発現していることも証明した (Chiba T et al. Int Arch Allergy Immunol. 2006)。このため、このサイトカイン産生作用は、これらの受容体を介して惹起されると予想したが、実際に各々に選択的なアゴニストを使用しても同様のサイトカイン産生は惹起されず、各アンタゴニストも機能しなかった。さらにプロスタグランジン D2 が弱いアフィニティーを持つとされる TP 受容体や、核内受容体である PPAR の関与なども検討したが、いずれも否定的であった。さらに予備的な検討からは MAPK のリン酸化を介した反応であることから、既知の二つの受容体以外に新たな細胞表面受容体が存在し、その受容体を介して炎症性サイトカインの産生が行われている可能性がある。これまでの検討や他の研究者の報告からプロスタグランジン D2 の新たな受容体が存在する可能性は十分高く、この新規受容体の構造・機能を明らかにすることは、世界的にも非常に先駆的・重要な研究になるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) これまでに CRTH2 のノックアウトマウスが作成されているが、アレルギーにおける表現形は好酸球の局所遊走を抑制した (Satoh et al. J Immunol. 2006) という報

告と増強した (Chevalier et al. J Immunol. 2005) という報告があり、in vitro の知見が必ずしも vivo で一致していないことも、複数の受容体を持つプロスタグランジン D2 の複雑な作用機序を示唆している。また、気道上皮細胞に対するプロスタグランジン D2 の機能的な役割は炎症性サイトカインを産生すること、MDC を産生する (Honda K et al. J Exp Med. 2003) ことがわかっているものの、作用機序は不明な点が多い。これらを研究することにより気管支喘息や気道免疫のメカニズムを明らかにできる。

(2) プロスタグランジン D2 のシグナル伝達経路は、これまでの知見から CRTH2 は MAPK やカルシウムシグナルが、一方 DP は cAMP が関与しているものの、まだその詳細なカスケードは証明されていない。プロスタグランジン D2 刺激による気道上皮細胞からのサイトカイン産生以外の機能的な生理活性を明らかにするため、好酸球などの他の細胞と比較することにより、新たな受容体に関して、様々なアプローチにより検索する。

(3) これまでに発現や機能について知られていない細胞表面受容体の評価を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 主要な CRTH2 の発現細胞として好酸球がある。種々の刺激によってヒト好酸球のケモカイン受容体である CCR3 の発現変化を検討していたところ、興味深いことに PGD2 は CCR3 の迅速な internalization を誘導することを見いだした。CCR3 は G 蛋白共役型受容体であり、リガンドにより internalization が起こることがよく知られている。そこで PGD2 の未知の受容体候補として CCR3 を考え、CCR3 のトランスフェクション細胞 (K562) において、PGD2 が CCR3 を介して機能するか、細胞内 Ca インジケータである fra-2 を用いて検討した。

(2) PGD2 は、その親和性は弱いながらも PGE 受容体 (EP)、PGF 受容体 (FP)、トロンボキサン受容体 (TP) に結合することが知られている。また、PGD2 は核内受容体である PPAR に対しても弱い親和性を有するので、それらの agonist や antagonist を用いてサイトカイン産生 (IL-8, GM-CSF) に対する影響を検討した。

(3) 気道上皮細胞における PGD2 刺激による IL-8, GM-CSF 産生シグナル伝達経路の検討を、各種シグナルの抑制剤を用いて行った。

(4) 気道上皮細胞株である NCI-H292 細胞を用いて CRTH2 と CCR3 の siRNA によるノックダウンを試みた。細胞培養後に siRNA を加

えるプロトコルと、細胞培養開始と同時に siRNA を加えるプロトコルを比較し、結果は qRT-PCR にて検討した。

(5) 特に好酸球の遊走機能を調節する分子とその受容体の発現と機能に関する検討を並行して行う。

#### 4. 研究成果

(1) CCR3 のトランスフェクション細胞 (K562) を用いて、PGD2 が CCR3 を介して機能するか、細胞内 Ca インジケータである fra-2 を用いて検討を行った。この結果、PGD2 による Ca 流入は認めなかった。また、PGD2 の前処理後に CCR3 のリガンド (eotaxin-1) 刺激を行ったが、Ca 流入の抑制は認められなかった。さらに binding assay により、PGD2 は eotaxin-1 の CCR3 への結合をほとんど阻害しないことが確認された。これらの結果から、PGD2 は CCR3 のリガンドとして機能しないことが示唆された。しかしながら、PGD2 によりケモカイン受容体の細胞表面発現が抑制されることは、好酸球の局所への遊走調節機能を明らかにする上で重要な知見と考えられる。CRTH2 アゴニストによる検討からも、PGD2 は既知の受容体である CRTH2 を介してケモカイン受容体 CCR3 の発現を抑制していることが明らかになった。さらに、ヒト末梢血の好酸球で CCR3 と CRTH2 の発現をアレルギー患者や健康人で検討したところ、細胞の表面発現は正の相関関係にあることが明らかになった。

(2) PGD2 は、PGE 受容体 (EP)、PGF 受容体 (FP)、トロンボキサン受容体 (TP) および核内受容体である PPAR に対しても弱い親和性ながら結合することが知られている。これらの受容体の刺激剤や抑制剤を用いて検討したところ、いずれもその関与は否定的であった。

(3) 各種シグナル抑制剤の効果の検討から、ERK および p38MAPK の関与が示唆された。また、Gi 蛋白の関与も疑われる結果となった。

(4) 培養時間や濃度、試薬などを検討したが、いずれの方法においてもノックダウンにより細胞死が認められ、適正な条件の設定ができなかった。

(5) 好酸球の遊走を調節する分子として、アディポサイトカインの一つであるアディポネクチンを見いだした。ヒト末梢血好酸球はアディポネクチン受容体である AdipoR1/R2 を蛋白・遺伝子レベルで発現しており、アディポネクチンで好酸球を刺激することによって好酸球の遊走・接着能が減弱する。これは細胞内 Ca 流入反応の減弱と関与

していることが示唆された。これらの結果は国際学会で報告するとともに国際誌へ報告した (J Asthma. 2013)。また、好酸球の G 蛋白共役型受容体を介した遊走を調節する重要な細胞内シグナルとして、イノシトールリン脂質の一つである PI3K の機能検討を行った。PI3K のアイソフォームのうち の阻害薬は、細胞毒性が弱いものの、下流のシグナルである MAPK の減弱と遊走能を阻害することから、好酸球性炎症疾患の治療薬として有望であることが示唆された。このほか、エストロゲンの細胞膜受容体である GPER がヒト好酸球に発現しており、遊走能と生存能を調節していることを初めて見だし、国際誌へ報告した (Immunol Lett. 2014)。

#### 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 2件)

Yamamoto R, Ueki S, Moritoki Y, Kobayashi Y, Oyamada H, Konno Y, Tamaki M, Itoga M, Takeda M, Ito W, Chihara J. Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis: implications in allergic inflammation. J Asthma. 査読有 2013; 50 (8): 828-835. DOI: 10.3109/02770903.2013.816725

Tamaki M, Konno Y, Kobayashi Y, Takeda M, Itoga M, Moritoki Y, Oyamada H, Kayaba H, Chihara J, Ueki S. Expression and functional roles of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) in human eosinophils. Immunol Lett. 査読有 2014; 160(1): 72-78. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.03.013

[学会発表](計 6件)

Ueki S, Yamamoto R, Moritoki Y, Kobayashi Y, Oyamada H, Konno Y, Tamaki Y, Itoga M, Takeda M, Chihara J. Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis. 8th Biennial symposium of the international eosinophil society. (2013) July 13<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup>. Oxford. UK.

田村明日美, 戸島洋子, 小熊マリ子, 石川千賀子, 藤田美好, 小山田一, 竹田正秀, 廣川誠(2013) 高アルカリ尿が尿蛋白性に及ぼす機器差の検討  
第45回日本臨床検査自動化学会, 10月10日~12日, 横浜

齋藤桃香, 鎌田由美子, 山内由美子, 伊藤祐希, 小山田一, 廣川誠(2013) イムライズ2000による可溶性インターロイキン2受容体

(sIL-2R) 測定の基礎的検討。

第 37 回秋田県医学検査学会，11 月 3 日，由利本荘市

井上 縁，藤田美好，平澤裕之，高崎貴海，今野裕子，菊地敏子，小山田二，廣川誠 (2013) 動脈硬化性疾患予防ガイドライン (2012 年版) への対応について。

第 37 回秋田県医学検査学会，11 月 3 日，由利本荘市

山田千尋，平澤裕之，小熊マリ子，井上縁，今野裕子，菊地敏子，藤田美好，高崎貴海，小山田二，廣川 誠 (2013) 高感度トロポニン T 試薬の評価

第 37 回秋田県医学検査学会，11 月 3 日，由利本荘市

佐藤麻衣子，富谷陽子，高屋のぶ子，山本梨絵，田村麗奈，田中美紀子，齋藤桃香，小山田二，廣川 誠 (2013) 分子標的薬治療中に重篤な不整脈を発症した慢性骨髄性白血病の一例

第 37 回秋田県医学検査学会，11 月 3 日，由利本荘市

Yukiko Saito, Masahide Takeda, Yasunori Konno, Mami Tamaki, Yuki Moritoki, Shigeharu Ueki, Hajime Oyamada, Makoto Hirokawa Pharmacological PI3k gamma inhibitor attenuates eotaxin-induced human eosinophil functions.

第 63 回日本医学検査学会 5 月 17 日～18 日，新潟市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小山田 一 (OYAMADA Hajime)  
秋田大学・医学部・臨床検査技師長  
研究者番号：8 0 3 7 5 3 1 0

### (2) 研究分担者

守時 由起 (MORITOKI Yuki)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：9 0 5 8 5 5 2 2

蘇生会病院・名誉理事  
茆原 順一 (CHIHARA Junichi)  
研究者番号：8 0 1 9 7 6 1 5

植木 重治 (UEKI Shigeharu)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号：9 0 5 8 5 5 2 2