

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890035

研究課題名(和文)肥満・糖尿病における肝細胞増殖因子の役割に関する実験的研究

研究課題名(英文)Roles of hepatocyte growth factor in obesity and diabetes

研究代表者

奥西 勝秀 (Okunishi, Katsuhide)

群馬大学・生体調節研究所・講師

研究者番号：50401112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、HGFがPGE2の産生亢進を介してその生物学的作用を発揮する(HGF-PGE2 axis)ことを考慮し、本研究で、まず、PGE2が各種細胞に及ぼす効果を検討した。そして、PGE2が、肺線維芽細胞やマクロファージにおいて、翻訳抑制を介して多種の蛋白の発現を抑制することを見出した。更に、PGE2が、T細胞機能を抑制することによりアレルギー性気道炎症を抑制することも見出した。以上、HGF-PGE2 axisは、免疫細胞の抑制を介した慢性炎症抑制の結果、糖尿病発症を抑制したり、肥満に合併した喘息や肺線維症の増悪を抑制したりする可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte growth factor (HGF) exhibits its biological action via up-regulation of prostaglandin (PG) E2 production in many types of cells (HGF-PGE2 axis). So I examined the effect of PGE2 on different types of cells. I clarified that PGE2 inhibits global protein synthesis in lung fibroblasts and macrophages via suppression of protein translation. Moreover, I also found that PGE2 suppresses allergic airway inflammation via inhibition of T cell functions. It is now well accepted that macrophages and T cells play pathogenetic roles in the development of type II diabetes. Moreover, obesity is recognized as an important risk factor for development of asthma and exacerbation of pulmonary fibrosis. My findings described above suggest that HGF-PGE2 axis suppresses not only the development of diabetes in obese individuals but also obese-related pulmonary diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：プロスタグランジンE2 マクロファージ 肺線維芽細胞 T細胞 翻訳抑制 細胞機能抑制

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は、肝細胞以外にも、様々な細胞から産生され、また、多様な細胞に多岐に渡る生物学的活性を発揮することが知られている。近年、脂肪細胞からも産生されることが明らかになり、現在では、肥満や糖尿病でその産生が亢進するアディポカインの一つとして認識されている。一方で、肥満や糖尿病の病態生理におけるその役割は、まだ十分には解明されていない。

また、肥満・糖尿病と呼吸器疾患との関連性が近年指摘されている。例えば、肥満は、気管支喘息発症の危険因子であることや、肺線維症の急性増悪の危険因子であることが、明らかになって来ている。

### 2. 研究の目的

現在、肥満から糖尿病発症に至る上で、“慢性炎症状態”が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。すなわち、肥満において、慢性的に活性化したマクロファージやT細胞などの免疫細胞が、糖尿病発症に病源的な役割を果たし、それら免疫細胞の抑制が、その後の糖尿病発症の抑制につながる可能性が示唆されている。また、前述の様に、肥満が、気管支喘息や肺線維症のリスクファクターであることも明らかになってきている。

現在では、肥満や糖尿病でその産生が亢進するアディポカインの一つとして認識されているHGFだが、それが、肥満から糖尿病発症に至る際に重要な役割を果たす免疫細胞に及ぼす効果や、肥満・糖尿病との関連が指摘されている気管支喘息や肺線維症において果たす役割は、まだ十分には解明されていない。そこで、本研究で、それらを明らかにする為に、下記の各種検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫・呼吸器関連の実験系のセットアップ:

申請者の所属研究室では、これまで、免疫・呼吸器系の実験が行われていなかった。そこで、申請者は、本申請期間中に、各種免疫細胞の誘導ならびに分離・精製システム、肺線維芽細胞の分離・精製システムや、卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) により誘導するマウス喘息モデルの確立を目指した。

#### (2) HGF-PGE<sub>2</sub> axis が各種細胞機能や呼吸器疾患マウスモデルに及ぼす効果の検討:

申請者は、以前、HGF が、各種の細胞において、シクロオキシゲナーゼ-2 の発現を上昇させ、その結果、プロスタグランジン (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) の産生を亢進させること、及び、HGF の生物学的作用が、この PGE<sub>2</sub> を介していることを報告した (HGF-PGE<sub>2</sub> axis) (Bauman KA, Wettlaufer SH, Okunishi K, et al. (2010). J. Clin.

Invest.). そこで、本研究では、まず、肥満・糖尿病やそれと関連する呼吸器疾患において、PGE<sub>2</sub> が果たす役割を解明する為に、各疾患で重要な役割を果たす免疫担当細胞 (マクロファージや CD4<sup>+</sup>T ヘルパー (T helper, Th) 細胞など) や肺線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験、及び、マウス喘息モデルを用いた *in vivo* の実験を行った。

#### ヒト正常肺由来線維芽細胞を用いた実験:

Passage 6-10 のヒト成人正常肺由来線維芽細胞 (CCL210, ATCC から購入) を用いた。実験の際には、6 穴プレートを使用し、細胞プレートに接着させる為に、10%FBS 含有 DMEM 培地で 8-10 時間細胞を培養した後、血清の影響を除去する為に、血清を含まない DMEM 培地で 16-20 時間培養後、各種実験を行った。各試薬の効果を検討する為に、試薬投与後、セルライセートを抽出し、WB により、セルライセート内の標的蛋白の発現量を検出した。標的蛋白の発現量を、ローディングコントロールである GAPDH の発現量で標準化した値を、コントロールの無試薬の群と試薬投与群で比較検討した。

#### マウス腹腔マクロファージを用いた実験:

C57BL/6 マウス (8-12 週齢、雄) を使用。5ml の PBS でマウスの腹腔洗浄を行い、腹腔細胞を回収した後、6 穴プレート上で、10%FBS 含有 RPMI で 2h 培養した。その後、血清を含まない RPMI 培地で 2 回洗浄し、浮遊細胞を除いた後、プレートに接着しているマクロファージを実験に用いた。実験では、一部のマクロファージを PGE<sub>2</sub> 1 μM 存在下で培養し、その後、各群マクロファージのセルライセートを回収し、前述の様に WB を用いて、標的蛋白の発現量を比較検討した。

#### マウス喘息モデルを用いた実験:

野生型 C57BL/6 マウス (8-12 週齢、雄) を使用。OVA 20 μg/alum 2 mg でマウスを感作した後、PBS に溶解して作成した 1% OVA 溶液をネブライザーで経気道的に投与して好酸球性気道炎症を惹起した。一部のマウスには、OVA/alum の投与前後で PGE<sub>2</sub> アナログを投与した。更に、FACS sorting または MACS sorting (後述) により CD4<sup>+</sup> Th 細胞を分離・精製し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した時のサイトカイン産生や IL-4 刺激時の STAT6 リン酸化において、PGE<sub>2</sub>、EP2 アゴニストや、PGE<sub>2</sub> が EP2 に結合し細胞内 cAMP を上昇させた際に活性化されるプロテインキナーゼ A (protein kinase A, PKA) や Epac に対する特異的な刺激剤が及ぼす効果を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 免疫・呼吸器関連の実験システムの確立:

申請者は、FACS sorting や磁気ビーズ付抗体を用いた MACS sorting による免疫細胞の

分離システム、腹腔や肺胞マクロファージの回収システム、肺線維芽細胞の分離・精製システム、各種細胞機能評価の為の実験系、マウス喘息モデルなど、本申請研究に必要な免疫・呼吸器の実験システムを、所属研究室で新たに確立した(図1)。

- |  |
|--|
| <p>1) 細胞表面または細胞内抗原評価システム:<br/>FACS解析。<br/>2) 免疫細胞を主とした各種細胞の分離・精製システム<br/>セルソーティング:<br/>FACSまたはMACS sorting。<br/>骨髄細胞から各免疫細胞への分化・誘導システム:<br/>好塩基球、好酸球(IL-3を使用)、樹状細胞(GM-CSFを使用)や、マクロファージ(M-CSF含有培地を使用)の分化誘導。<br/>好酸球の分離・精製:<br/>IL-5発現プラスミドを急速静注法を用いてマウスに投与し、IL-5を強制発現させ好酸球を増加させた後、FACS sortingにより、好酸球を分離・精製。<br/>マクロファージの回収:<br/>マウスの気管(支)肺胞洗浄、又は、腹腔洗浄によるマクロファージの回収。<br/>肺線維芽細胞の分離・精製:<br/>マウス肺からの肺線維芽細胞の分離・精製。<br/>3) 免疫細胞機能評価システム:<br/>抗原で感作したマウスの脾細胞やリンパ節細胞を抗原で再刺激した際の細胞増殖能やサイトカイン産生の評価、抗CD3/CD28抗体で刺激時のT細胞からのサイトカイン産生の評価や、樹状細胞の抗原提示能の評価。<br/>4) マウス喘息モデル及びその評価方法:<br/>OVA/alumで感作し、OVA溶液の経気道的投与によるアレルギー性気道炎症の誘導。<br/>気管(支)肺胞洗浄液や血清などの各種サンプルの回収。</p> |
|--|

(図1:申請者が本研究期間中に新たに確立した各種実験系)

(2) PGE<sub>2</sub>が各種細胞機能や呼吸器疾患マウスモデルに及ぼす効果:

PGE<sub>2</sub>がヒト成人正常肺線維芽細胞やマウス腹腔マクロファージに及ぼす効果:

肺線維芽細胞が産生するコラーゲンを始めとする様々な細胞外マトリックス蛋白が、肺線維症など肺の線維化病変の形成上、必須である。肺線維芽細胞により産生される細胞外マトリックスの主要なものが、I型コラーゲンである。

PGE<sub>2</sub>には、EP1-4の4つの受容体が存在する。肺線維芽細胞においては、PGE<sub>2</sub>は、肺線維芽細胞上Gs共役型EP2受容体に結合し、細胞内cAMPを上昇させ、PKAを活性化することにより、肺線維芽細胞のI型コラーゲンの産生を抑制する。しかしながら、その機序は、これまで十分には解明されていなかった。そこで、本研究で、その機序を検討した。

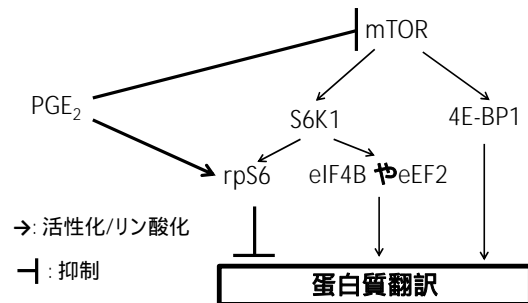
申請者は、まず、PGE<sub>2</sub>によるCCL210細胞のI型コラーゲン産生抑制の時間的変化を検討した。そして、PGE<sub>2</sub>(500 nM)投与群では、投与後1時間という非常に早期の時点で、コントロール群の無治療群と比較して、統計学的有意差を持って40%程度のI型コラーゲン蛋白の発現量の減少を認め(約1.5時間で50%の減少。)投与後8時間で、最大減少量の90%程度の大幅な減少を認めた一方で、PGE<sub>2</sub>投与後1時間から24時間までのタイミングでは、I型コラーゲンのmRNAの発現量の低下は認めなかった。I型コラーゲンは、細胞内で合成された後、その多くが細胞内で速やかに分解されることが知られている。実際、CCL210に蛋白質翻訳抑制剤であるシクロヘキサミドを投与し新規の蛋白合成を阻害すると、PGE<sub>2</sub>と同様、投与後1.5時間後から、I型コラー

ゲン蛋白の発現量の急速な低下を認め、一方で、PGE<sub>2</sub>を同時投与しても、シクロヘキサミドへの追加効果は認めなかった。更に、細胞内に取り込まれたメチオニンアナログの量を検出することにより新規合成蛋白量を定量する方法及びI型コラーゲンに対する抗体を用いた免疫沈降を併用して、40分間という非常に短い間に新規に合成されたI型コラーゲン量を検討した結果、PGE<sub>2</sub>投与群で、コントロール群と比べてその合成量が強く低下していることを確認した。以上の結果から、PGE<sub>2</sub>が、シクロヘキサミドと同様の経路、すなわち、蛋白への翻訳抑制を介して、CCL210ヒト成人正常肺線維芽細胞におけるI型コラーゲン蛋白の発現量を減少させていることが示唆された。

次に、PGE<sub>2</sub>が、CCL210肺線維芽細胞において、I型コラーゲン以外の蛋白の発現に及ぼす効果を検討した。そして、前述と同様の方法を用いて40分間という短時間の間の蛋白合成にPGE<sub>2</sub>が及ぼす効果を検討し、様々な蛋白の合成を抑制することも確認した。

蛋白質翻訳のマスターレギュレーターが、セリン・スレオニンカイネースの一つであるmammalian target of rapamycin (mTOR)である。mTORは、その下流の二つの経路、S6カイネース1(S6 kinase 1, S6K1)及び4E-BP1の経路を活性化し、蛋白質翻訳を亢進させる。一方、S6K1によるその下流のeIF4BとeEF2のリン酸化は翻訳を亢進させるが、リボソーム蛋白S6(ribosomal protein S6, rpS6)のリン酸化は、翻訳抑制に作用する、すなわち、翻訳のネガティブレギュレーターとして作用することが知られている。そこで、次に、PGE<sub>2</sub>がmTORの経路に及ぼす効果を検討した。そして、PGE<sub>2</sub>が、mTORの二つの基質、S6K1と4E-BP1のリン酸化を抑制し、一方で、rpS6のリン酸化を亢進させることを確認した。さらに、これらのPGE<sub>2</sub>の効果が、PKA阻害剤により解除されることも確認した。

以上の結果から、ヒト正常肺線維芽細胞において、PGE<sub>2</sub>は、mTOR経路の抑制及びrpS6のリン酸化亢進を介して蛋白質翻訳を抑制することが示された(図2)。



(図2:PGE<sub>2</sub>による蛋白質翻訳抑制の機序)

次に、マウス腹腔マクロファージを用いて、ヒト正常肺線維芽細胞と同様の検討を行った。そして、PGE<sub>2</sub>が、マウス腹腔マクロファ

ージにおいても、ヒト肺線維芽細胞の時と同様に、40 分間という短時間での様々な蛋白の新規合成を抑制し、さらに、mTOR 経路の抑制及び rpS6 のリン酸化の亢進を誘導することを確認した。

以上、申請者は、PGE<sub>2</sub> が、mTOR 経路を抑制すると同時に rpS6 のリン酸化を亢進させることで、蛋白質翻訳を抑制し、種々の蛋白質の発現量を制御するという、新奇の PGE<sub>2</sub> の生物学的作用を見出した(図 2)。なお、この成果は、2014 年、FASEB J 誌に掲載された(5. 主な発表論文 参照)。

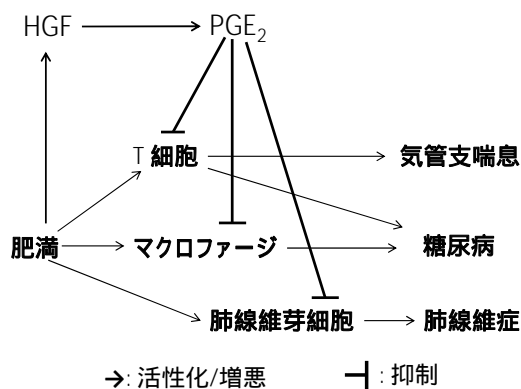
PGE<sub>2</sub> によるアレルギー性気道炎症抑制作用の標的細胞に関する検討：

前述の様に、肥満は気管支喘息発症のリスク因子であることが知られている。

PGE<sub>2</sub> はアレルギー性気道炎症を抑制することは既に報告されているが、その機序はまだ十分に解明されていない。そこで、申請者は、まず、マウス喘息モデルを用いて、外因性に投与した PGE<sub>2</sub> アナログの効果を検討した。そして、感作期に PGE<sub>2</sub> アナログを投与することで、その後の抗原吸入により誘導されるアレルギー性気道炎症が強く抑制されることを見出した。すなわち、PGE<sub>2</sub> は、抗原に対する感作を抑制することが示唆された。抗原に対する感作は、樹状細胞などの抗原提示細胞と Th 細胞との相互作用の結果誘導される。そこで、申請者は、次に、PGE<sub>2</sub> が CD4<sup>+</sup> Th 細胞に及ぼす効果を検討した。そして、分離・精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞を、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した際の IL-13 産生や、IL-4 により誘導される STAT6 のリン酸化が、PGE<sub>2</sub> や、EP2 アゴニスト、PKA、Epac 特異的的刺激剤により、強く抑制されることも確認した。以上、申請者は、PGE<sub>2</sub> によるアレルギー性気道炎症抑制の機序として、PGE<sub>2</sub> による CD4<sup>+</sup> Th 細胞機能抑制の可能性のあることを見出した。なお、この成果は、2014 年、Journal of Allergy and Clinical Immunology 誌に掲載された(5. 主な発表論文 参照)。

### (3) 結語

本申請研究において、申請者は、まず、新たな実験系を確立した。そして、PGE<sub>2</sub> の新たな生物学的作用として、翻訳抑制を介した細胞機能制御作用(図 2)や、T 細胞機能抑制を介したアレルギー性気道炎症抑制作用を、明らかにした。これらの結果から、HGF-PGE<sub>2</sub> axis は、各種細胞機能を抑制することにより、肥満に伴う糖尿病や気管支喘息の発症を抑制したり、肥満に伴う肺線維症の増悪に抑制的に作用したりすること、すなわち、この経路は、肥満における内因性の抑制因子として作用する可能性が示唆された(図 3)。HGF の PGE<sub>2</sub> を介さない作用経路の役割や、外因性に投与した HGF の効果に関しては、今後の更なる検討が必要である。



(図3:HGF-PGE<sub>2</sub> axis は肥満関連疾患における内因性抑制因子として作用しうる)

### 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 5 件)

(全論文 査読有)

Okunishi K, DeGraaf AJ, Zaslona Z, Peters-Golden M. Inhibition of protein translation as a novel mechanism for prostaglandin E2 regulation of cell functions. FASEB J. 28:56-66, 2014. doi: 10.1096/fj.13-231720.

Zaslona Z, Okunishi K, Bourdonnay E, Domingo-Gonzalez R, Moore BB, Lukacs NW, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses allergic sensitization and lung inflammation by targeting the E prostanoid 2 receptor on T cells. J. Allergy Clin. Immunol. 133:379-387, 2014. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.037.

Imamura M, Sasaki O, Okunishi K, Nakagome K, Harada H, Kawahata K, Tanaka R, Yamamoto K, Dohi M. Perillyl alcohol suppresses antigen-induced immune responses in the lung. Biochem Biophys Res Commun. 443:266-71, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.106.

Sasaki O, Imamura M, Yamazumi Y, Harada H, Matsumoto T, Okunishi K, Nakagome K, Tanaka R, Akiyama T, Yamamoto K, Dohi M. Alendronate attenuates eosinophilic airway inflammation. J. Immunol. 191:2879-2889, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300460.

Garrison G, Huang SK, Okunishi K, Scott JP, Kumar Penke LR, Scruggs AM, Peters-Golden M. Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E2. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 48:550-558, 2013. doi: 10.1165/rcmb.2012-02620C.

〔学会発表〕(計 3 件)

(発表者名)奥西 勝秀

(発表標題)プロスタグランジン E<sub>2</sub>はT細胞上 EP2 受容体を介してアレルギー性気道炎症を抑制する

(学会等名)日本アレルギー学会

(発表年月日)2014 年 5/9 ~ 2014 年 5/11

(発表場所)京都 国立京都国際会館

(発表者名)奥西 勝秀、Angela J DeGraaf, Zbigniew Zaslona, Marc Peters-Golden

(発表標題)プロスタグランジン E<sub>2</sub>による肺線維芽細胞からのコラーゲン産生抑制の機序の解明

(学会等名)日本アレルギー学会

(発表年月日)2013 年 11/28 ~ 2013 年 11/30

(発表場所)東京 ホテルニューオータニ

(発表者名)奥西 勝秀、Angela J DeGraaf, Zbigniew Zaslona, Marc Peters-Golden

(発表標題)プロスタグランジン E<sub>2</sub>による蛋白翻訳抑制作用の発見及びその細胞内シグナル伝達経路の解明

(学会等名)日本アレルギー学会

(発表年月日)2012 年 11/29 ~ 2013 年 12/1

(発表場所)大阪 大阪国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学生体調節研究所 遺伝生化学分野  
泉研究室

[URL] <http://molend.showa.gunma-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

奥西 勝秀 (OKUNISHI KATSUhide)

群馬大学・生体調節研究所・講師

研究者番号: 50401112