

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006-2008

課題番号：18380173

研究課題名（和文）プロスタグランジン D2 を介した新たな自然免疫制御機構と消化管機能障害

研究課題名（英文） Prostaglandin D2-mediated control mechanisms of natural immunity and gastrointestinal dysfunction.

研究代表者

氏名（アルファベット）堀 正敏（Hori Masatoshi）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号 70211547

研究成果の概要：

細胞膜を構成するアラキドン酸から合成されるプロスタグランジン(PG)類は炎症や痛みに関与する脂質メディエーターである。本研究では、これまで明かではなかった PGD2 が炎症担当細胞であるマクロファージの細胞遊走活性に関与する知見に加えて、PGE2 による誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現機構とそれに伴う炎症性の消化管運動機能障害機構について明らかにした。これらの知見は、消化管炎症に伴う消化管運動障害の分子基盤の一端を担うものであり、消化器疾患の多い家畜の生産性向上を目指す基盤研究として意義深い。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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：プロスタグランジン D2、プロスタグランジン E2、マクロファージ、消化管、細胞遊走、蠕動運動、炎症、一酸化窒素(NO)

1. 研究開始当初の背景

炎症を伴う腸疾患はヒトの QOL を著しく害し、また家畜の生産性低下をもたらす。腸炎疾患においては、原因不明の消化管運動障害が生じ、これによって腸内フローラなどの腸管内環境が悪化し炎症を増悪化する。従って、腸炎時の消化管運動障害機構を解明することはヒトや家畜の腸疾患克服や、家畜の生産性向上に繋がる。我々は、消化管筋層部に常在するマクロファージが細菌菌体成分である LPS を認識し、NO 合成酵素を誘導するこ

とで消化管運動障害が生じることを見いだした。そして、その過程で何らかのプロスタグランジンが深く関与する証拠を掴んだが、その詳細な機構については不明であった。

2. 研究の目的

家畜の生産向上のための基盤研究として消化管の自然免疫と運動機能に焦点をあて、特に脂質メディエーターであるプロスタグランジン D2 と E2 による消化管運動機能調節と自然免疫応答調節機能を解明することを目

的とした。

3. 研究の方法

- (1) RAW264.7 培養マクロファージにおけるボイデンチャンパーを用いた LPS 誘発細胞遊走活性の解析
- (2) PGE2 受容体 EP2 KO マウス、PGD2 合成酵素 H-PGDS KO マウス、PGD2 受容体 DP KO マウス、PGD2 受容体 CRTH2 KO マウスから単離した腹腔マクロファージを用いた LPS によるマクロファージ遊走活性の解析
- (3) 消化管器官培養法を用いた LPS 誘発消化管運動抑制作用におけるプロスタグランジン D2 と E2 の機能解析
- (4) TNBS 誘発腸炎モデルマウスを用いた消化管運動抑制機構解析
- (5) SAMP1/Yit クローン病モデルマウスを用いた消化管運動抑制機構解析

4. 研究成果

(1) マクロファージにおいて細菌菌体成分 LPS は細胞遊走活性を持つことを明らかにした。その分子機構は LPS 刺激によって COX-2 の発現が増加し、そこから産生される PGD2 と PGE2 がそれぞれ CRTH2 受容体と EP4 受容体を介して細胞遊走活性を増加させること、LPS による刺激後 4 時間以降では PGE2 はさらに MCP-1 を誘導し細胞遊走を活性化することを明らかにした。

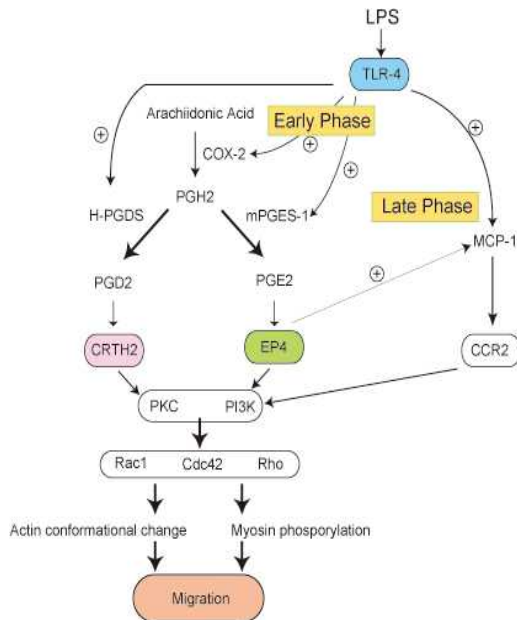


図1 LPS 刺激による PGD2 と PGE2 を介したマクロファージ細胞遊走活性機構

(2) 消化管筋層部の器官培養法により、LPS 刺激によって消化管運動が抑制すること、その抑制が筋層部常在型マクロファージを欠

失する M-CSF 欠損マウス (op/op マウス) 消化管では消失することから、筋層部の常在型マクロファージが消化管運動抑制の実行細胞であることを突き止めた。さらに、各種 PG KO マウスを用いた解析から、マクロファージから産生される PGE2 が iNOS を誘導し、消化管運動を抑制することを明らかにした。

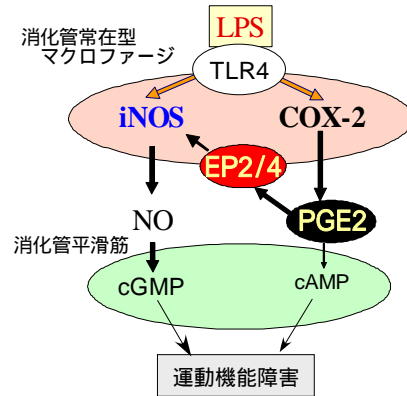


図2 消化管常在型マクロファージを介した炎症に伴う消化管運動機能障害機構

(3) TNBS 誘発腸炎モデルにおける消化管運動障害機構について解析した。まず始めに、消化管筋層部においても粘膜炎症部に匹敵する免疫・炎症応答が生じていることを各種サイトカイン、ケモカイン類の Real-time RT-PCR にて明らかにした。腸炎による消化管運動機能障害機構を解明するために、代表的な炎症性サイトカインである TNF- α KO マウスを用いて腸炎モデルを作製して解析した結果、TNF- α KO マウスでは腸炎症が减弱し、消化管運動機能障害も低下することを見いだした。さらに、器官培養法によって TNF- α 自身が平滑筋細胞に直接作用し、平滑筋細胞の収縮制御タンパク質である CPI-17 の発現低下をもたらし、収縮能を低下させるという新たな運動抑制機序を発見した。

(4) SAMP1/Yit クローン病モデルマウスは世界唯一の自然発症型の小腸型クローン病モデルであるが、この小腸病変部では蠕動運動が抑制されること、その抑制には筋層部常在型マクロファージが関与することを見いだした。さらに、重度の筋層部肥厚が見られたが、これには筋層部に浸潤した肥満細胞からの NGF 産生による血管新生が関与する可能性が考えられた。

以上、消化管炎症時における消化管運動機能障害の一端をプロスタグランジン D2 と E2 を中心に解明したが、得られた知見は消化器疾患の多い家畜の生産性向上を目指す基盤研究として意義深い。

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 12 件)

- 1: Ayabe S, Murata T, Maruyama T, Hori M, Ozaki H: PGE2 induces liver myofibroblast contraction via EP3 and FP receptor activation.
Br. J. Pharmacol. (2009)156:835-845
 - 2: Maruyama T, Murata T, Ayabe S, Hori M and Ozaki H : Prostaglandin D2 induces contraction via thromboxane A₂ receptor in rat liver myofibroblasts.
Eur. J. Pharmacol. (2008) 591:237-242
 - 3: Ohama T, Okada M, Brautigam, DL, Hori M, Ozaki H: Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression through ERK/p38 MAPKs activation in mouse intestinal subepithelial myofibroblasts: that is not involved in IL-1 β -induced COX-2 expression.
Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) (2008) 295:G766-775.
 - 4: Ohama T, Hori M, Fujisawa M, Kiyosue M, Hashimoto M, Ikenoue Y, Jinno Y, Miwa H, Matsumoto T, Murata T and Ozaki H: Downregulation of CPI-17 contributes to dysfunctional motility in chronic intestinal inflammation model mice and ulcerative colitis patients
J. Gastroenterology (2008) 43:858-865
 - 5: Murata T, Lin MI, Aritake K, Matsumoto S, Narumiya S, Ozaki H, Urade Y, Hori M and Sessa WC: Role of Prostaglandin D2 receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. (2008) 105:20009-20014
 - 6: Hori M, Nobe H, Horiguchi K. and Ozaki H: Inhibition of muscularis macrophages recruitment by targeting MCP-1 in colonic inflammation.
Am J Physiol (Cell Physiol) (2008) 294:C391-401
 - 7: Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Hirai H, Nakamura M, Ozaki H and Hori M: Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D₂ and prostaglandin E₂.
J. Pharmacol. Exp. Ther. (2008) 326:493-501
 - 8: Ohama T, Hori M, Momotani E, Elorza M, Gerthoffer WT, Ozaki H: IL-1 β inhibits intestinal smooth muscle proliferation in an organ culture system: Involvement of COX-2 and iNOS induction in muscularis resident macrophages.
Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) (2007) 295:G1315-1322
 - 9: Ohama T, Hori M, Momotani E, Iwakura Y, Guo F, Kishi H, Kobayashi S, Ozaki H: Intestinal inflammation down-regulates smooth muscle CPI-17 through induction of TNF- α and causes motility disorders.
Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) (2007) 295:G1429-1438
 - 10: Kinoshita K, Horiguchi K, Fujisawa M, Kobirumaki F, Yamato S, Hori M, Ozaki H: Possible involvement of muscularis resident macrophages in impairment of interstitial cells of Cajal and myenteric nerve systems in rat models of TNBS-induced colitis.
Histochem Cell Biol (2007) 127:41-53
 - 11: Kiyosue M, Fujisawa M, Kinoshita K, Hori M and Ozaki H: Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis.
Neurogastroenterol Motil (2006) 18:1019-1030
 - 12: Kinoshita K, Hori M, Fujisawa M, Sato K, Ohama T, Momotani E, Ozaki H: The role of TNF- α in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: Clues from TNF- α deficient mice.
Neurogastroenterol Motil (2006) 18:578-588
- (総説、レビュー、図書) (計 7件)
- 1: 堀正敏、尾崎博：消化管炎症における筋層部マクロファージを介した消化管運動機能不全
日薬理誌 (Folia Pharmacol Jpn) (2009) 113: vol133: No.4: 190-193
 - 2: 尾崎博、大濱剛、堀正敏：IBD と IBS における消化管運動機能障害：炎症性サイトカイン IL-1 を中心に
消化器心身医学 (2008) vol.15(1)15-24
 - 3: 堀正敏：腸炎疾患における平滑筋機能異常とその治療戦略
Medical. Bio. Vol 3:48-52 (2008)
 - 4: 上西紀夫、小川利久、児玉正智、横地高志、谷徹 編集:(堀正敏、田島剛、村田幸久、尾崎博 分担執筆) 基礎と臨床の最新知見：LPS によるマクロファージ遊走活性におけるプロスタグランジンの役割 (株) 医学図書出版 (東京) 144 頁
エンドトキシン研究10 巻 P1-7 (2007)
 - 5: Ohama T, Hori M and Ozaki H: Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced?
J. Smooth Muscle Res. (2007) 43:43-54

6:堀正敏、藤澤正彦、尾崎博：腸炎疾患における消化管筋層部炎症応答と運動機能障害
日薬理誌 (Folia Pharmacol Jpn) (2006) 128:72-77

7:尾崎博、堀正敏：消化管運動と炎症性サイトカイン
G.I. Research (2006) vol.14(3)233-244

〔学会発表〕(計 27 件)

- 1:消化管平滑筋における長期低酸素ストレスによる RhoA 依存性 Ca 感受性増加機構障害: 北岡優佳、堀 正敏、大濱剛、尾崎 博
第 142 回日本獣医学会学術集会
2006.9.22-24 山口県 (山口市) 口頭発表
- 2:低酸素ストレスによる消化管平滑筋収縮の Ca 感受性低下作用: 堀 正敏、北岡優佳、大濱 剛、尾崎 博
第 115 回 日本薬理学会関東部会
2006.09.28 群馬県 (高崎市) 口頭発表
- 3: Different responsiveness of liver myofibroblast to endothelin-1 and PDGF during the process of cell differentiation.: Natsumi Kojima, Takahisa Murata, Yoshihito Morizane, Masatoshi Hori, Ozaki Hiroshi
第 80 回 日本薬理学会年会
2007.03-14-16 愛知県(名古屋国際会議場) 口頭発表
- 4:消化管炎症時の筋層部マクロファージ動態と機能: 堀 正敏、尾崎 博
第 49 回 日本平滑筋学会 (奈良)
2007.07.05-06 口頭発表(シンポジスト)
- 5:消化管筋層間常在型マクロファージを介した IL-1 による平滑筋細胞の増殖抑制機構: 堀 正敏、大浜 剛、百溪 英一、E Margaret, WT Gerthoffer、尾崎 博
第 49 回 日本平滑筋学会 (奈良)
2007.07.05-06 口頭発表
- 6:PGD₂ and PGE₂ contribute to LPS-induced migration of macrophages: Tsuyoshi Tajima, Takahisa Murata, Kosuke Aritake, Yoshihiro Urade, Hiroshi Ozaki and Masatoshi Hori
16th International Symposium of Molecular Cell Biology of Macrophages
2007.06.14-15 静岡 (静岡市) ポスター発表
- 7:Impairment of peristalsis of the inflamed terminal ileum in SAMP1/Yit mice, a spontaneous ileitis model of Crohn's disease: Masatoshi Hori, Masahiko Fujisawa, Yasuyo Yamamoto, Kazuhide Horiguchi, Satoshi Iino, Satoshi Matsumoto, Yoshinori Umesaki, and Hiroshi Ozaki
The 4nd Science and Research Symposium by Pfizer Global Research & Development Nagoya Laboratories
2007.08.27 愛知 (名古屋) ポスター発表
- 8:Impairment of peristalsis of the inflamed

terminal ileum in SAMP1/Yit mice, a spontaneous ileitis model of Crohn's disease : Masatoshi Hori, Masahiko Fujisawa, Yasuyo Yamamoto, Kazuhide Horiguchi, Satoshi Iino, Satoshi Matsumoto, Yoshinori Umesaki, and Hiroshi Ozaki

Little Brain Big Brain (LB-BB Meeting)
2007.08.31 Jeju, Korea

- 9:MCP-1 targeting inhibits muscularis macrophage recruitment and intestinal smooth muscle dysfunction in colonic inflammation: Masatoshi Hori, Hiromi Nobe, Kazuhide Horiguchi, and Hiroshi Ozaki
The 21th International Symposium on Neurogastroenterology and Motility,
2007.09.02-05, Jeju, Korea
- 10:自然発症クローン病モデルマウス SAMP1/Yit における小腸蠕動運動機能障害: 堀 正敏、藤澤正彦、山本康代、飯野敏、堀口和秀、松本 敏、梅崎良則、尾崎 博
第 6 回日本神経消化器病学会
2007.11.03 (大阪) 口頭発表
- 11:NSAID 誘発性胃潰瘍に対するクエン酸モサプリド(ガスモチン)の作用: 藤澤正彦、村田幸久、堀正敏、尾崎博
第 6 回日本神経消化器病学会
2007.11.03 (大阪) 口頭発表
- 12:肝筋線維芽細胞におけるプロスタグランジン D₂ の収縮作用: 丸山智晴、村田幸久、堀正敏、尾崎博
第 144 回日本獣医学会学術集会
2007.09.27-29 北海道 口頭発表
- 13:肝筋線維芽細胞におけるプロスタグランジン E₂ の収縮作用: 綾部信哉、村田幸久、堀正敏、尾崎博
第 144 回日本獣医学会学術集会
2007.09.27-29 北海道 口頭発表
- 14:腸炎疾患における筋層部常在型マクロファージの病態生理機能: 堀正敏、堀口和秀、藤澤正彦、木下一哉、野部裕美、鳥橋茂子、鈴木敏彦、清末正晴、村田幸久、尾崎博
第 81 回 日本薬理学会年会
2008.03-17-19 横浜 口頭発表 (シンポジウムオーガナイザー)
- 15: プロスタグランジン E₂ 受容体 EP₃ を介した肝線維芽細胞の収縮機構: 綾部信哉、丸山智晴、村田幸久、堀正敏、尾崎博
第 81 回 日本薬理学会年会
2008.03-17-19 横浜 口頭発表
- 16:肝線維芽細胞におけるプロスタグランジン D₂ のトロンボキサン A₂ 受容体を介した収縮作用: 丸山智晴、村田幸久、堀正敏、尾崎博
第 81 回 日本薬理学会年会
2008.03-17-19 横浜 口頭発表

- 17:肝星細胞における収縮蛋白関連遺伝子の発現動態解析: 飯塚真央、村田幸久、堀正敏、尾崎博
第143回日本獣医学会学術集会
2008.3.28-30 神奈川 ポスター発表
- 18:炎症性サイトカインによる消化管平滑筋収縮 Ca 感受性の低下作用 = 腸炎疾患による消化管運動機能障害 =: 堀正敏、大浜剛、尾崎博
日本生理学会 2008.03.25-27 (東京)
口頭発表(シンポジウム)
- 19:消化管筋層部における LPS 曝露によるマクロファージを介した炎症応答と消化管運動障害: 堀 正敏
第17回内毒素・LPS研究会
2008.6.21 東京 口頭発表(招待講演)
- 20:ラット術後腸管麻痺モデルにおける消化管筋層部におけるマクロファージ動態と消化管運動機能障害: 土田泰昭、畑尾史彦、塩入利一、西田正人、小川利久、三村芳和、上西紀夫、堀 正敏、尾崎 博
第45回日本外科代謝栄養学会
2008.7.1-2 仙台市
- 21:選択的 5-HT₄ 受容体作動薬クエン酸モサプリドはラット術後腸麻痺を改善する: 土田泰昭、村田幸久、堀 正敏、尾崎 博、畑尾史彦、瀬戸泰之
第146回日本獣医学会
2008.9.24-26 宮崎市 口頭発表
- 22:腸筋線維芽細胞においてアセチルコリンは M₂、M₃ 受容体を介して細胞内 Ca 上昇を伴った細胞収縮を引き起こす: 岩永剛一、村田幸久、岡田宗善、堀 正敏、尾崎 博
第146回日本獣医学会
2008.9.24-26 宮崎市 口頭発表
- 23:Prostaglandin D₂ 受容体 DP の腫瘍血管透過性抑制作用: 村田幸久、Lin Michelle、有竹浩介、松本重子、成宮周、尾崎 博、裏出良博、堀 正敏、Sessa William
第146回日本獣医学会
2008.9.24-26 宮崎市 口頭発表
- 24:5-HT₄ 受容体選択的作動薬クエン酸モサプリドによる術後腸麻痺改善作用: 堀 正敏、土田泰昭、村田幸久、畑尾史彦、小川利久、三村芳和、瀬戸泰之、尾崎 博
第5回消化管学会
2009.2.12-13 東京 口頭発表(シンポジスト)
- 25:消化管運動と腸内フローラ: 堀 正敏、栗原哲也、平山和宏、伊藤喜久治、尾崎博
第8回腸管の機能と免疫研究会
2009.2.14 東京 口頭発表(シンポジスト)
- 26:無菌マウスの結腸における蠕動運動特性と LPS 感受性: 栗原哲也、堀正敏、平山和宏、伊藤喜久治、村田幸久、尾崎博

第82回日本薬理学会年会
2009.3.16-18 横浜 口頭発表

- 27:DP 受容体作動薬 BW245C は肝線維芽細胞に対して cAMP/PKA シグナルを介して弛緩反応を誘起する: 丸山智晴、村田幸久、堀正敏、尾崎博
第82回日本薬理学会年会
2009.3.16-18 横浜 口頭発表

〔図書〕(計 1 件)

- 1:上西紀夫、小川利久、児玉正智、横地高志、谷徹 編集:(堀正敏、田島剛、村田幸久、尾崎博 分担執筆) 基礎と臨床の最新知見: LPS によるマクロファージ遊走活性におけるプロスタグランジンの役割
(株)医学図書出版(東京)
エンドトキシン研究 10 巻 144 頁 P1-7
(2007)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 正敏 (HORI MASATOSHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 70211547

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

裏出 良博 (URADE YOSHIHIRO)

大阪バイオサイエンス研究所
主任研究員
研究者番号: 10201360

尾崎 博 (OZAKI HIROSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 30134505

村田 幸久 (MURATA TAKAHISA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 40422365

藤澤 正彦 (FUJISAWA MASAHIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・研究員
研究者番号: なし

田島 剛 (TAJIMA TSUYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・大学院博士課程 大学院生
研究者番号: なし

大濱 剛 (OHAMA TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・大学院博士課程 大学院生
研究者番号: なし