

機関番号：31201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590259

研究課題名 (和文) 膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素の血管新生における役割の解明

研究課題名 (英文) Involvement of membrane-associated prostaglandin E synthase-1 in neovascularization.

研究代表者

奈良場 博昭 (NARABA HIROAKI)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90296517

研究成果の概要 (和文)：膜結合型プロスタグランジン E₂ 合成酵素 (mPGES1) は誘導性の酵素であり、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の産生において重要な役割を果たし、新生血管の形成など様々な生理現象に関わると考えられている。我々は、この mPGES1 の発現に転写調節因子である Egr-1 が中心的な役割を果たしていることを報告している。本研究課題では、Egr-1 のコリプレッサーとして機能することが知られている NAB2 が、mPGES1 の発現にどのような役割を果たしているのか、また、その関与が、新生血管の形成などの生理現象においても影響しているのかを検討した。その結果、NAB2 は *in vitro* の細胞系や *in vivo* の病態モデルにおいて Egr-1 の活性化に伴い、発現誘導されることが示された。また、NAB2 の発現を siRNA によって抑制することにより、mPGES1 の発現や PGE₂ の産生が阻害されることが示唆された。これらの結果は、NAB2 が Egr-1 の抑制を介して、mPGES1 の発現を負に制御し、新生血管の形成などの生理現象にも関わることを推測させるものと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Membrane-associated prostaglandin E₂ synthase (mPGES1) is an inducible terminal enzyme in the biosynthetic pathway for prostaglandin E₂, which participates in many biological processes such as neovascularization. We have already shown that Egr-1 is a key transcription factor in regulating the inducible expression of mPGES. In this study I have investigated the role of NAB2, a specific corepressor of EGR-1, to down-regulate growth factor-induced mPGES expression in inflammatory cells and to inhibit neovascularization. NAB2 was rapidly induced by increased levels of Egr-1 *in vitro* and *in vivo* model of neovascularization. Moreover, it was observed that the induction of mPGES1 gene expression and production of PGE₂ by treatment of siRNA specific for NAB2. These results suggest that NAB2 is involved in the regulation of the expression of mPGES1, and it may serve as a key molecule in the development and progression of neovascularization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：遺伝子発現、転写調節、プロスタグランジン、シクロオキシゲナーゼ、炎症性病態、新生血管

1. 研究開始当初の背景

血管は、発生早期に形成される脊椎動物の基本構造であるが、同時に様々な病態の発症と進行に密接に関与する。そして、血管新生は新たな血管ネットワークの形成であり、癌や増殖性炎症などの多くの病態において中心的な役割を果たす。その形成は基底膜の分解から始まり、血管の新生に至る一連の過程であり、各種増殖因子などにより調節される。そして、プロスタグランジン (PG) も血管新生を増強することが知られており、PG 受容体 EP3 を介した VEGF の誘導が報告されている。

PG は、病態の進行に伴い発現誘導されるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の活性上昇により産生され、この COX-2 の選択的な阻害薬である NS-398 や celecoxib が血管新生を抑制することが *in vitro* 及び *in vivo* の実験で報告されている。

一方、我々を含め幾つかの研究グループは、COX-2 の下流で働き PGE₂ の産生にのみ関与する膜結合型プロスタグランジン E₂ 合成酵素 (mPGES1) が COX-2 と同様に非常に重要な役割を果たし、疾患治療における新たな標的になると考えている。

しかし、血管新生に関しては COX-2 の関与についての報告は数多くあるが、mPGES1 の役割を検討したものはほとんど無い。従って、本研究課題では、血管新生における mPGES1 の役割を解明し、癌や炎症性疾患の治療における新たな可能性を検討する。

本件研究における特色等を下記の (1) ~ (3) に示す。

(1) 現在、次世代の抗炎症薬として COX-2 の選択的阻害薬が臨床的に適応され効果を示している。しかし、COX-2 に由来する全てのプロスタグランジンを抑制することに対する問題点や副作用が指摘されている。一方、本申請で検討する mPGES は PGE₂ 産生のみに関与するため、mPGES の制御が可能となれば、より選択的で有用な治療法の確立につながるものと考えられる。この可能性は幾つかの総説でも指摘されている [Samuelsson B, Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 2007 59(3):207-]。

(2) mPGES の各種疾患への関与に関しては、申請者らの慢性関節リュウマチや腸炎への関与を初めとして、脳虚血や大腸癌などに関して明らかにされており、病態における重要性は非常に高い。しかし、血管新生における mPGES の役割の検討は少なく、詳細な検討を早急に行う必要がある。

(3) mPGES は癌治療の新たな分子標的となる可能性があり、本研究は新薬開発における基礎情報を提供できると考えられる。また、mPGES は、各種の癌の分子マーカーとなる可能性も秘めている。

2. 研究の目的

血管新生における膜結合型プロスタグランジン E₂ 合成酵素 (mPGES1) の役割の解明を目指して以下の (1) ~ (3) 項目を検討した。

(1) 血管新生を制御する増殖因子を産生する単核球系の炎症性細胞 (マクロファージ) を用いて COX-2 及び mPGES1 の発現と、増殖因子の産生を比較検討する。また、これらの細胞を炎症性物質で刺激した際の両酵素の発現変動も解析する。更に、mPGES1 に対する siRNA の最適化を行う。

(2) 血管新生を評価する動物モデル (ラット皮下スポンジ移植やマウス皮下マトリゲル移植など) を用いて、血管新生の過程と COX-2 及び mPGES1 の発現の有無を確認する。更に、これらのモデルに mPGES1 に対する siRNA を適応し、血管新生における影響を検討する。

(3) プロスタグランジン関連のモデルマウスなどを用いて、後肢虚血法やマトリゲル移植法などの血管新生を評価するモデルを適応し、野生型マウスと比較する。評価は、肉芽内ヘモグロビン濃度や CD31 等の血管内皮特異的マーカーで行う。また、mPGES1 の発現を *in situ hybridization* にて組織特異的に観察する。

3. 研究の方法

(1) 細胞での基礎実験と siRNA の設計・適応以下の 3 項目①~③に関して細胞系を用いて検討を行った。

①細胞系の確立

血管新生における mPGES の関与を調べるための *in vitro* での最適な細胞培養系の確立を行った。細胞は、血管新生を制御する増殖因子 (VEGF など) を産生する単核球系の炎症性細胞 (マクロファージや T リンパ球) を用いた。mPGES1 の検出は Northern blot 法や real-time RT-PCR 法を用いた。各種の検出プローブ及び検出条件は、予備実験により確立した。

②プロスタグランジン合成酵素の発現変化の解析

上記の検討を応用して、血管新生を誘導するアンジオテンシン II やキニン類で刺激した

際、COX-2 及び mPGES1 の発現を解析した。また、細胞を刺激した際には、初期に MAP キナーゼ経路や STAT 系の活性化が知られているので、これらのリン酸化シグナルの関与を検討するために、ERK や STAT3 などの抗リン酸化抗体を用いた Western blot 法を行い、増殖因子の産生に至る細胞内シグナルを解析した。

③ siRNA を用いた mPGES1 の阻害実験

上記の実験系を用いて、COX-2 や mPGES1 を特異的な siRNA を用いて阻害した際のプロスタノイドの産生に対する影響を検討した。プロスタノイドの産生量の測定は、抽出分離後に酵素免疫測定法を用いた。siRNA は、Dharmacon 社のものを用いた。また、細胞への導入方法に関しては、他の実験系のデータなどを参考にして、条件検討を詳細に行った。

(2) 動物モデルでの検討

① Majima らにより確立されているスポンジ皮下移植等の血管新生モデル [Trends Pharmacol Sci (2003) 24(10):524-] や Tamarat らのマウス皮下マトリゲル移植モデル [Lab Invest. (2002) 82(6):747-] を用いて、血管新生における mPGES の関与を検討した。これらの方法は、血管新生の評価が容易であり、また、薬物投与や生体サンプルの回収に優れていた。

移植後のスポンジやゲルのマトリクス周辺の肉芽組織の増殖及び、血管内皮マーカーである PCAM-1 や血液凝固第 8 因子などの変動と mPGES1 の発現を比較した。また、NS-398 や celecoxib 等の COX-2 選択的阻害薬の投与や siRNA の in vivo 適応などによる新生血管の形成に対する影響も検討した。前述の様に血管新生には、PG 受容体サブタイプの EP3 が関与することが報告されているので、このモデルに対する EP3 受容体アゴニストの適応も試みた。

② ターゲティングマウスを用いた検討

申請者は、これまで EP3 受容体ノックアウトマウスを用いて、炎症性病態における解析を行ってきた。そこでこれらのマウスに加えて mPGES1 ノックアウトマウスを用いて後肢虚血法やマトリゲル移植法などの血管新生を評価するモデルを適応し、野生型マウスと比較する実験を予定していた。

血管新生の評価は、組織学的観察や肉芽内のヘモグロビン濃度により行い。また、血管内皮に特異的に発現する von Willebrand factor や PCAM-1 の量を追跡調査する。更に、mPGES1 や COX-2 及び EP3 の発現を DGI-AP を用いてシグナルを増強した in situ hybridization にて組織特異的に観察する予

定であった。しかし、上記 (2) の②の検討は、実験設備の関係などで研究助成機関内に着手することが出来なかった。

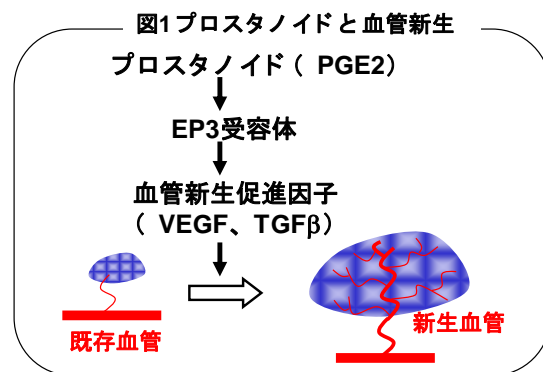
(3) 癌性の血管新生に関する検討

大腸癌などにおいてプロスタグランジンの関与が注目されており、非ステロイド性抗炎症薬によるポリープ発生に減少と大腸癌の死亡率の低下が報告されている。そして、癌細胞の増殖や癌の再発に血管新生が密接に関わることは周知の事実である。そこで、この研究成果を応用し、癌性の血管新生に検討を進展させた。

前述のマウスの皮下に Sarcom180 細胞等を移植し、形成される肉芽組織における血管新生を評価する。癌腫瘍の周辺の stroma における mPGES1、EP3 や各種増殖因子の発現を調べ、腫瘍と宿主における各分子の果たす役割の解明を目指した。

4. 研究成果

本研究は mPGES1 の発現制御を中心検討しているが、その背景にはプロスタノイドの受容体を介した作用と血管新生促進因子による新生血管の形成作用が密接に関わっている (図 1)。



(1) 病態においてプロスタグランジンの供給細胞と考えられるマクロファージを用いて、mPGES1 の活性化を導く環境条件を検討した。具体的には、IFN γ や IL-23 等のサイトカインの存在下での炎症性刺激や癌病巣を想定した低酸素条件下でのプロスタグランジン合成酵素群の発現変化を検討した。また、同時に転写調節因子 Egr-1 の活性変動やそのコリプレッサーである NAB2 の発現も検討した。その結果、幾つかの条件の組み合わせにより NAB2 による転写抑制の解除と Egr-1 の活性化とそれにより誘導される mPGES1 の発現上昇が認められた。しかし発現誘導を引き起こすサイトカインの濃度などの条件は不安定であり、実験例数を増やすことやより詳細な環境設定の検討が必要と考えられた。

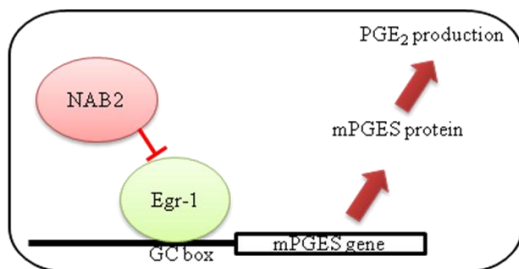
(2) Egr-1 の転写調節活性を制御する新たな因子の検索を行った。抗 Egr-1 抗体を用いた免疫沈降や転写活性を調べるゲルシフトアッセイでの抗体適用などから、Egr-1 と特異的な親和性を有する約 10 種類の蛋白質が検出された。これらの蛋白質のうち、3 種類がエンドトキシンなどの刺激により発現量や Egr-1 との親和性の変化を引き起こすことが見いだされた。この 3 種類の蛋白質のうち、一つは、昨年までに関与が明らかとなった NAB2 であることがサウスウエスタンブロットにより確認できたが、残りの 2 種に関しては、同定にまでは至らなかった。今後、この 2 種類に関して、精製や分析による同定が必要である。

また、昨年までには得られた、Egr-1 のコリプレッサーである NAB2 による転写抑制を培養癌細胞などに応用し、病態での関与を検討した。Egr-1 と NAB2 の両者を発現する細胞株では、両者の発現は相関する傾向が認められた。このことは、NAB2 が Egr-1 の負のフィードバックとして機能している可能性を示唆するものと考えられた。

(3) 血管新生を評価する動物モデル（ラット皮下スポンジ移植やマウス皮下マトリゲル移植など）を用いて、血管新生の過程と COX-2 及び mPGES の発現の有無を検討した。更に、これらのモデルに mPGES に対する siRNA を適応し、血管新生における影響を検討した。その結果、肉芽内ヘモグロビン濃度や CD31 等の血管内皮特異的マーカーと mPGES の発現に相関が認められる特定の条件が明らかとなった。また、mPGES の発現を組織特異的に観察したが、これでは、有効な条件は見いだされなかった。

癌性の血管新生に関しては、Sarcoma 等の株化細胞の移植実験を行い、プロスタグランジン合成酵素群の役割の解明を継続している。

これまでの検討から、NAB2 が Egr-1 の抑制を介して、mPGES1 の発現を負に制御し、新生血管の形成などの生理現象にも関わることを推測させるものと考えられる（下図）。



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)

1. Watanabe M, Naraba H, Sakyō T, Kitagawa T. DNA damage-induced modulation of GLUT3 expression is mediated through p53-independent extracellular signal-regulated kinase signaling in HeLa cells. *Mol Cancer Res.* (査読あり) 8(11) 2010 1547-1557.
2. Yuhki K, Ushikubi F, Naraba H, Ueno A, Kato H, Kojima F, Narumiya S, Sugimoto Y, Matsushita M, Oh-Ishi S. Prostaglandin I2 plays a key role in zymosan-induced mouse pleurisy. *J Pharmacol Exp Ther.* (査読あり) 325(2) 2008 601-609.

[学会発表] (計 4 件)

1. 佐京 智子 糖輸送タンパク質 (GLUT1、GLUT3) の細胞膜局在 第 83 回日本生化学会大会 2010 年 12 月 9 日 神戸
2. 渡辺 勝 HeLa 融合細胞における p53 非依存的な糖輸送タンパク質 GLUT 遺伝子の発現制御 日本がん標的治療学会 2010 年 7 月 6 日 東京
3. 渡辺 勝 Regulation of the GLUT gene expression associated with the DNA damage induced by genotoxic stress. 第 82 回日本生化学会 日本生化学会 神戸
4. 佐京 智子 糖輸送タンパク質の非極性細胞における細胞膜分布 第 81 回日本生化学会大会 2008 年 12 月 9 日 横浜

[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

奈良場 博昭 (NARABA HIROAKI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：90296517

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：