

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20890111

研究課題名(和文)EPRAP を中心とする、炎症性シグナル伝達系に拮抗する新規分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Role of a novel anti-inflammatory signaling mediated by EPRAP

研究代表者

南 学(MINAMI MANABU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90511907

研究成果の概要(和文)：

局所に浸潤したマクロファージの活性化は慢性的な炎症刺激を周囲に及ぼし、悪性腫瘍や動脈硬化などの難治性慢性疾患の増悪・進展において中心的な役割を果たしている。我々は、これまで、プロスタグランジン E_2 が、EP4 受容体および EP4 受容体の新規細胞内結合分子 EPRAP を介して、炎症刺激によるマクロファージの活性化を特異的にかつ強力に抑制することを見いだしている。本研究では、活性化マクロファージを標的とした上記難治性慢性疾患の新たな治療法の開発に向け、EPRAP の機能と病態生理学的意義の解明に取り組んだ。その結果、

- (1) EPRAP の組織・細胞内分布検討に向け抗体の作製をすすめ、ヒト EPRAP を特異的に認識する抗体を得た。
- (2) ヒト EPRAP リコンビナント蛋白を精製し、新規 EPRAP 結合蛋白の同定に向けた実験を開始した。
- (3) 動脈硬化など生体における EPRAP の病態生理学的意義の解明のため、EPRAP 遺伝子改変マウスの作製をすすめた。

以上より、新規の内因性マクロファージ活性化制御系である、EP4 受容体-EPRAP シグナルに関して、更なる機能解析に必要な準備が整えられた。今後これらの成果をもとに、EPRAP の機能およびこれを中心とした抗炎症分子ネットワークを、*in vitro*、*in vivo* 両面で詳細に検討し、活性化マクロファージを標的とした難治性慢性疾患の治療法開拓につなげたい。

研究成果の概要(英文)：

Macrophages participate in the pathogenesis of many chronic inflammatory diseases including atherosclerosis and cancer. Thus, the regulation of macrophage activation holds a key to understanding the pathophysiology and rational treatment of these conditions.

We previously reported that PGE_2 markedly suppressed inflammatory activation of human and mouse primary macrophages through EP4 receptor and EPRAP, novel EP4 receptor-associated protein. To clarify the molecular mechanisms of EPRAP-mediated anti-inflammatory signaling in macrophages as well as to know the roles of EPRAP in human chronic diseases including atherosclerosis, we have been working on these projects: (1) production of the rabbit polyclonal antibody against human EPRAP, (2) purification of recombinant human EPRAP protein, and (3) generation of EPRAP mutant mice.

Our study would add new insights into the mechanisms that may mitigate unchecked macrophage activation at sites of inflammation, and EP4-EPRAP signaling could be a novel target for the treatment of chronic inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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

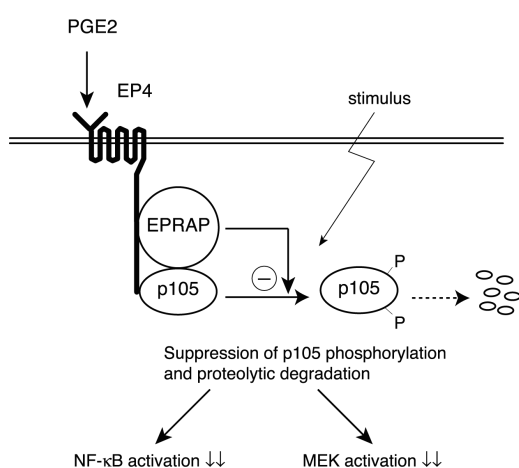
キーワード：(1) シグナル伝達, (2) 炎症・免疫, (3) マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

病巣局所に浸潤したマクロファージの活性化は、慢性的な炎症刺激を周辺組織に及ぼし、悪性腫瘍や動脈硬化などの難治性慢性疾患の増悪・進展において中心的な役割を果たしている。

近年我々は、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) が、EP4 受容体、および EP4 受容体の新規細胞内結合分子としてクローニングされた EPRAP を介して、炎症刺激によるマクロファージの活性化を強く抑制することを明らかにした。さらにその分子メカニズムの一つとして、EPRAP が NF-κB1 p105 と結合し、PGE₂ および EP4 受容体依存的に、炎症刺激後の p105 のリン酸化と引き続く加水分解を抑制することを見いだした (図 1)。

図 1



EP4 受容体-EPRAP シグナルは、動脈硬化症など慢性炎症性疾患の進展制御に重要な役割を果たしていると考えられる。実際 EPRAP はヒト動脈硬化病変の新生内膜のマクロフ

ァージに一致して強い発現を認めるが、その病態生理学的意義は不明である。さらに、我々のこれまでの検討から、EPRAP の抗炎症作用発現には p105 以外の複数の分子の関与が示唆されているが、その分子メカニズムについても未解明の点が多い。EP4 受容体-EPRAP およびその下流シグナルは、活性化マクロファージにおいて特異的に作用すると考えられることから、副作用の少ない治療法開発の標的となる可能性が期待される。

2. 研究の目的

活性化マクロファージを標的とした、動脈硬化症など慢性炎症性疾患の新たな治療法の開発に向け、EPRAP の機能と病態生理学的意義の解明に取り組む。特に、EPRAP による抗炎症作用発現に重要な下流分子を同定し、EPRAP を中心とした、新たな細胞活性化抑制分子ネットワークの解明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) EPRAP に対する特異抗体の作製：
EPRAP の機能・動態解析や、組織・細胞内分布の検討のため、EPRAP に対する、免疫染色やウエスタンブロット、免疫沈降等が可能な特異抗体を作製する。
- (2) ヒト EPRAP リコンビナント蛋白の精製：
EPRAP の抗炎症作用発現には複数の分子の関与が示唆されている。未知の EPRAP 結合分子を同定し、EPRAP を中心とした、既存の炎症性シグナル伝達系に拮抗する新規分子ネットワークの存在と機能を明らかにするため、タグ付き EPRAP リコンビナ

ント蛋白を精製し、アフィニティカラムを用いた、pull down 法などにより、EPRAP 結合分子を同定する。

(3) EPRAP 遺伝子改変マウスの作製：
生体における病的条件下での EPRAP の機能、すなわち、動脈硬化発症などにおける EPRAP の病態生理学的意義の解明には、EPRAP 遺伝子改変マウスの作製が必須であると考えられる。具体的には、EPRAP 遺伝子欠損マウス、およびマクロファージ特異的 EPRAP 過剰発現マウス作製を行う。

4. 研究成果

(1) 被免疫動物種としてウサギを用い、ヒト EPRAP を特異的に認識する抗体(ポリクローナル抗体)を得た。

(2) ヒト EPRAP リコンビナント蛋白を精製した。

(3) EPRAP 遺伝子改変マウスの作製をすすめた。

以上より、新規の内因性マクロファージ活性化制御系である、EP4 受容体-EPRAP シグナルに関して、更なる機能解析に必要な準備が整えられた。今後これらの成果をもとに、EPRAP の機能およびこれを中心とした抗炎症分子ネットワークを、in vitro, in vivo 両面で詳細に検討し、活性化マクロファージを標的とした難治性慢性疾患の治療法開拓につなげたい。すでに、

(1) EPRAP の組織・細胞内分布の検討、ならびに

(2) pulldown 法等による新規 EPRAP 結合蛋白の同定に向けた実験をすすめている。

さらに、

(3) EPRAP 遺伝子欠損マウスについては、すでにキメラマウスが得られており、マクロファージ特異的 EPRAP 過剰発現マウスについても、複数の系統が樹立されつつある。

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 8 件)

- ① Tamura, Y., M. Sugimoto, T. Murayama, M. Minami, Y. Nishikaze, H. Ariyasu, T. Akamizu, T. Kita, M. Yokode, and H. Arai. 2010. C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. *J Atheroscler Thromb* 17:219-228. (査読有)

- ② 南 学, 横出 正之：脂質異常のないブランク形成の機序 日本医事新報 4460(7):76-77, 2009 (査読無)

- ③ 南 学：EP4 受容体結合蛋白 EPRAP/FEM1A を中心とする新規抗炎症性分子ネットワークの心血管病発生における意義 *Therapeutic Research* 30(6):927-931, 2009 (査読無)

- ④ Shimizu, K., M. Minami, R. Shubiki, M.L. Iasaca, L. MacFarlane, Y. Asami, Y. Li, R.N. Mitchell, and P. Libby. 2009. CC Chemokine Receptor-1 Activates Intimal Smooth Muscle-Like Cells in Graft Arterial Disease. *Circulation* 120:1800-1813. (査読有)

- ⑤ 荒井 秀典, 田村 行織, 村山 敏典, 南 学, 北 徹, 横出 正之：CCR2 の薬理的阻害は食餌誘導性肥満マウスにおけるインスリン抵抗性と肝脂肪蓄積を改善する 肥満研究 14(Suppl):159, 2008 (査読無)

- ⑥ Okamoto, Y., E.J. Folco, M. Minami, A.K. Wara, M.W. Feinberg, G.K. Sukhova, R.A. Colvin, S. Kihara, T. Funahashi, A.D. Luster, and P. Libby. 2008. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *CircRes* 102:218-225. (査読有)

- ⑦ Kuge, Y., N. Kume, S. Ishino, N. Takai, Y. Ogawa, T. Mukai, M. Minami, M. Shiomi, and H. Saji. 2008. Prominent lectin-like oxidized low density lipoprotein (LDL) receptor-1 (LOX-1) expression in atherosclerotic lesions is associated with tissue factor expression and apoptosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biol Pharm Bull* 31:1475-1482. (査読有)

- ⑧ Ishino, S., T. Mukai, Y. Kuge, N. Kume, M. Ogawa, N. Takai, J. Kamihashi, M. Shiomi, M. Minami, T. Kita, and H. Saji. 2008. Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with 99mTc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque. *J Nucl Med* 49:1677-1685. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 田村 行識, 村山 敏典, 南 学, 北 徹, 横出 正之, 荒井 秀典: CCR2 阻害はマウスにおける食餌誘導性のインスリン抵抗性と肝脂肪蓄積を改善する.
第 44 回日本成人病(生活習慣病)学会, 1. 9, 2010, 東京
- ② Minami, M., M. Yokode, P. Libby: Prostaglandin E receptor type 4-associated protein (EPRAP) interacts directly with NF- κ B1 p105 and attenuates macrophage activation.
第 61 回日本細胞生物学会, 6.3, 2009, 名古屋
- ③ 南 学: マクロファージにおける炎症ストレス制御. 第 40 回日本動脈硬化学会, 7.10, 2008, つくば (シンポジウム指定講演)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~rinsho/r>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 学 (MINAMI MANABU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 90511907