

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15283

研究課題名（和文）炎症性疾患におけるマクロファージに局在するプロスタサイクリン合成酵素の機能解析

研究課題名（英文）Analysis on the function of prostacyclin synthase expressed in macrophages in inflammatory diseases

研究代表者

落合 翔 (Ochiai, Tsubasa)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：20943559

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症におけるPGI合成酵素（PGIS）の機能について解析するため、PGIS遺伝子欠損（KO）マウスを用いてLPS誘導敗血症モデルを作成した。PGIS KOマウスでは野生型（WT）マウスと比較し、下痢などのLPSによる全身症状が増悪し、生存率も有意に低下していた。定量的PCRにて腹腔細胞中の炎症性サイトカインの遺伝子発現量を解析した結果、PGISの欠損によりTNF- α やIL-6の有意な増加がみられた。PGIS KOマウスにPGI2受容体（IP）選択的刺激薬であるselexipagの投与を行ったところ、LPSによる症状は大幅に緩和され致死率にも改善がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで当研究室では、PGI合成酵素（PGIS）により産生されるPGI2が炎症反応の促進に関与することを報告してきた。本研究により、これまでの報告と異なり、PGISの炎症反応における抑制的な役割を見出すことに成功した。本研究で疾患モデルとした敗血症は、感染症に対する全身反応により致命的な臓器障害を引き起こされる病態である。敗血症の死亡率は、過去20年間で抗生物質や多臓器支持療法などにより徐々に減少したが、現在でも世界における死亡率の約20%を占めるとみられており、治療薬の開発が求められている。本研究により、PGI2受容体選択的刺激薬が、敗血症に対する創薬ターゲットとなりえる事が確認された。

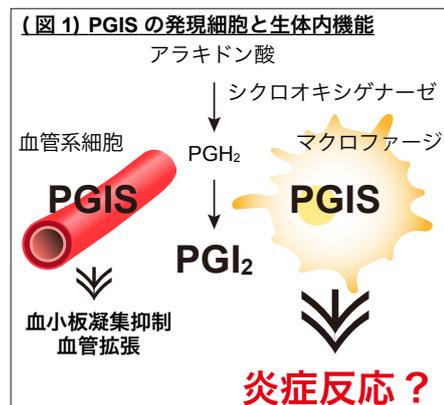
研究成果の概要（英文）：Prostacyclin (PGI₂) is a bioactive lipid produced by PGI synthase (PGIS) and is known to play important roles in inflammatory reactions as well as cardiovascular regulation. However, little is known about the roles of PGIS and PGI₂ in systemic inflammatory responses such as septic shock. To analyze the role of PGIS in systemic inflammation, lipopolysaccharide (LPS) was administered to wild type (WT) or PGIS knockout (KO) mice. Intraperitoneal injection of LPS induced diarrhea, shivering and hypothermia. These symptoms were more severe in PGIS KO mice than in WT mice. The expression of Tnf and Il6 genes was notably increased in PGIS KO mice. In contrast, over 95% of WT mice survived 72 h after the administration of LPS, whereas all of the PGIS KO mice had succumbed by that time. The mortality rate of LPS-administrated PGIS KO mice was improved by selexipag, a selective PGI₂ receptor (IP) agonist, administration.

研究分野：脂質生化学

キーワード：プロスタサイクリン プロスタグランジン最終合成酵素 リポ多糖 敗血症 セレキシパグ マクロファージ

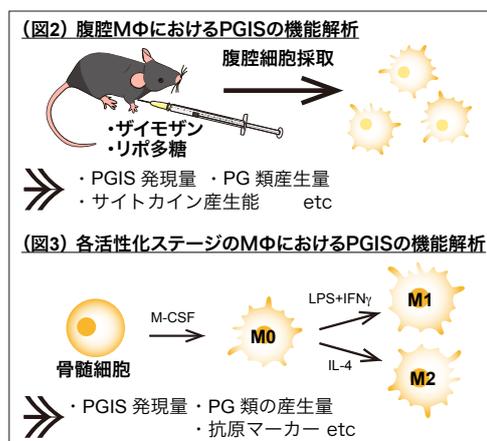
1. 研究開始当初の背景

プロスタサイクリン (PGL₂) 合成酵素 (PGIS) は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) の作用により生じたプロスタグランジン (PG) H₂を、生理活性脂質 PGI₂ に合成する酵素である。PGIS は血管内皮細胞などの血管系細胞に高発現し、心循環器系の恒常性維持において重要な役割を果たすことが知られている。PGL₂ は心循環器系に関わる作用に加え、血管透過性亢進や疼痛刺激作用なども有し、炎症反応進行への関与が考えられる¹⁾。実際、申請者らは実験動物モデルを用いた解析により、PGIS 遺伝子欠損 (KO) マウスでは、接触性皮膚炎や膀胱炎などの炎症反応や疼痛応答が減弱することを見出している^{2,3)}。一方で、PGIS はマクロファージ (MΦ) などの白血球をはじめ血管系以外の細胞にも発現が認められるが、MΦ に発現する PGIS の機能についてはほとんどわかっていない (図 1)。MΦ に発現する PGIS は炎症反応の進行を担うと考えられたため、申請者らは、野生型 (WT) あるいは PGIS KO マウスの骨髄細胞を放射線照射により枯渇させたのちに、WT あるいは KO マウスの骨髄細胞を移植するという“骨髄キメラマウス”を用い、接触性皮膚炎や膀胱炎での役割を検討した。その結果、接触性皮膚炎や膀胱炎の進行には、骨髄細胞由来の血球細胞に発現する PGIS はほとんど関与しないことを明らかにした^{2,3)}。最近になり Ipseiz らは、炎症反応において常在性 MΦ に発現する PGIS により産生される PGI₂ が、炎症反応の進行を抑制する方向にはたらくことを報告した⁴⁾。すなわち、MΦ が発現する PGIS は炎症反応において増強と抑制の両方の作用を示すことが考えられる。また、近年、MΦ には M0、M1、M2 等様々なステージの細胞が存在し、それぞれの MΦ が各々固有の機能を有することが明らかになりつつある。MΦ の活性化のステージにより、MΦ における PGIS の発現レベルが異なる可能性も考えられる。



2. 研究の目的

本研究の目的は、PGI₂ という 1 つの PG に着目し、PGI₂ がどの部位で産生されるか、そして炎症におけるどの段階で PGI₂ が産生されるかで、炎症反応における PGI₂ の作用が異なるのではないかと、今までとは異なった切り口から、PG 類と炎症反応との関連を明らかにすることである。本研究では MΦ の炎症反応における役割に着目するため、MΦ が病態の進展に関与する疾患であるザイモザン誘導腹腔炎モデルを作製し、炎症局所への白血球の遊走等の経時的変化をはじめとした、PGIS KO マウスでの表現型の変化について明らかにする。また、腹腔内 MΦ のリポ多糖 (LPS) に対する生体応答についても解析するため、PGIS KO マウスを用いて LPS をマウス腹腔内に投与する LPS 誘導敗血症モデルにより機能解析する (図 2)。さらに、MΦ の活性化のステージによる PGIS の発現レベルの違いを検討するため、骨髄由来 MΦ を作成し PGIS や抗原マーカーの発現を定量的 PCR により解析する (図 3)。実際に申請者らはこれまでに、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) による治療が困難である膀胱における炎症性疾患である出血性膀胱炎に対して、PGIS およびその受容体である IP が治療標的となることをマウスモデルで示しており^{2,3)}、炎症における PGIS および IP のさらなる解析により、新たな抗炎症薬の開発に繋がることを期待できる。



3. 研究の方法

(1) ザイモザン誘導腹腔炎モデル

ザイモザン誘導腹腔炎モデルは、8~10 週齢の C57BL/6 系雄性 WT マウスおよび PGIS KO マウスを用い、500 mg/mL ザイモザン (Wako) を 500 μL/mice で腹腔内投与することにより作成した。病態の指標として炎症局所への白血球の遊走等を確認するため、2%FCS 含有 PBS 4mL にて腹腔内液を回収し、Countess II FL (Invitrogen) を用いて回収液中の細胞数をカウントした。

(2) LPS 誘導敗血症モデル

LPS 誘導敗血症モデルは、8~10 週齢の C57BL/6 系雄性 WT マウスおよび PGIS KO マウスにリポ多糖 (LPS) 5mg/kg を腹腔内投与することにより作成した。病態の指標として直腸温および体重、ふるえ、便の形状評価を、LPS 投与前から LPS 投与後 7 日目まで経時的に行った。また、LPS 投与後のマウスの腹腔内液を 2%FCS 含有 PBS により採取し、液体クロマトグラフ質

量分析計 (LC-MS/MS; SCIEX, QTRAP5500) を用いて各種 PG 類の測定をした。このとき回収した腹腔内細胞から mRNA を抽出し、定量的 PCR (Applied Biosystems, Step One Plus real-time PCR system) にて、炎症性サイトカインおよび COX-2 や PGIS といった PG 合成酵素の遺伝子発現について検討した。腹腔常在性 MΦ は、2%FCS 含有 PBS により採取した腹腔内液を 3 時間プレートに播種し、接着細胞を MΦ として調製した。接着細胞は 1 μM A23187 (Abcam) により 1 時間あるいは 10 ng/mL LPS (Sigma Aldrich) で 3 時間刺激を行い、培養上清中の PG 類を測定した。さらに、PGI₂ 受容体 (IP) 選択的刺激薬である selexipag (Selleck Chemicals) を LPS 投与 2 時間前、LPS 投与後 12 時間毎に経口投与し、IP 受容体の敗血症への影響について検討した。

(3) 骨髄由来 MΦ

マウス骨髄細胞から M-CSF 添加により分化させた M0 細胞、さらに M0 細胞を LPS+IFN γ により M1 細胞に、IL-4 により M2 細胞に分化させた骨髄由来 MΦ を作成した。培養上清中の PG 量について LC-MS/MS を用いて測定した。骨髄由来 MΦ 中の PGIS および M1, M2 マーカーの遺伝子発現については、定量的 PCR により検討した。

4. 研究成果

(1) ギイモザン誘導腹腔炎モデル

C57BL/6 系雄性 WT マウスにギイモザン誘導腹腔炎を誘発したところ、ギイモザン投与 12 時間をピークとして腹腔内細胞数は約 4 倍に増加した。次に PGIS KO マウスを用いて腹腔炎を誘発したところ、当初の予想と異なりギイモザン投与 3 時間、6 時間後共に腹腔内の細胞数において WT マウスとの間に違いは見られなかった。

(2) LPS 誘導敗血症モデル

次に WT マウスに LPS を投与したところ、LPS 投与後 24 時間で体温低下のピークを迎え、その後 7 日目までに元の体温に戻っていった。一方、PGIS KO マウスでは、LPS 投与後 3、6、12 時間において体温が WT マウスと比較して有意に低下し、全ての PGIS KO マウスは LPS 投与後 24 時間までに致死となった。PGIS KO マウスにおいて、LPS による下痢症状は LPS 投与後 3 時間後、LPS による動きの鈍化や体重低下は LPS 投与後 12 時間後に、WT マウスと比較し有意に増悪していた。次に、LPS 投与 3 時間後における腹腔内液中の PG 類を LC-MS/MS を用い測定したところ、WT マウスにおいて PGI₂ の代謝物である 6-keto PGF_{1 α} が多く検出され、次いで TXB₂、PGE₂、PGD₂、PGF_{2 α} が検出された。一方、PGIS KO マウスでは、6-keto PGF_{1 α} は検出されず、PGE₂、TXB₂、PGD₂、PGF_{2 α} の順で多く産生されており、PGE₂ においてシャンティングがみられた。またこのとき、腹腔内細胞中の PGIS の発現は LPS 投与により減少し、COX-2 の発現は LPS 投与により上昇したが、PGIS の欠損により COX-2 の遺伝子発現はさらに上昇した。LPS 投与 12 時間後の腹腔細胞中の炎症性サイトカインを測定したところ、WT マウスでは LPS 投与により *Tnf*、*Il6* の有意な上昇が認められた。一方、PGIS 欠損マウスではこの上昇が WT マウスよりも顕著となった。次に、腹腔常在性 MΦ が産生する PG 類について測定したところ、腹腔内液と同様 6-keto PGF_{1 α} が最も多く検出された。腹腔常在性 MΦ が産生する 6-keto PGF_{1 α} は、Ca イオノフォアや LPS 刺激により有意に上昇することが分かった。最後に PGIS KO マウスに IP 選択的刺激薬である selexipag の投与を行ったところ、LPS によるふるえの症状や体温低下、下痢症状が大幅に緩和され、致死率も 100% から約 50% まで改善した。以上のことから、LPS 誘導性敗血症モデルでは、PGIS 由来の PGI₂ が IP 受容体を介して、敗血症の病態形成に対し抑制的に関与していることが示唆された⁵⁾。

(3) 骨髄由来 MΦ

マウス骨髄細胞から分化させた骨髄由来 MΦ を用い、PGIS の発現について定量的 PCR により検討したところ、M2 細胞において M0 細胞、M1 細胞と比較し PGIS の発現が有意に上昇していた。培養上清中の PG 類を LC-MS/MS により測定したところ、予想外なことに PGI₂ の代謝物である 6-keto PGF_{1 α} は検出限界であった。次に骨髄由来 MΦ 中の M1 細胞、M2 細胞マーカーの発現について、PGIS 欠損による影響があるかを検討した。M1 マーカーである *Ccl2* および *iNOS*、M2 マーカーである *Arginase* および *Ym1* は、PGIS 欠損により遺伝子発現量に変化が見られなかった。このことから、M2 細胞分化により PGIS の発現は増加するが、MΦ 分化において PGIS 寄与については小さいことが考えられた。

参考文献

- 1) Ochiai T, Honsawa T, Sasaki Y, Hara S. Prostacyclin Synthase as an Ambivalent Regulator of Inflammatory Reactions. *Biol. Pharm. Bull.* **45**: 979–984. (2022)
- 2) Ochiai T, Sasaki Y, Kuwata H, Nakatani Y, Yokoyama C, Hara S. Coordinated action of microsomal prostaglandin E synthase-1 and prostacyclin synthase on contact hypersensitivity. *Biochem Biophys Res Commun.* **546**:124-129. (2021)
- 3) Ochiai T, Sasaki Y, Yokoyama C, Kuwata H, Hara S. Absence of prostacyclin greatly relieves cyclophosphamide-induced cystitis and bladder pain in mice. *FASEB J.* **35**: e21952. (2021)
- 4) Ipseiz N *et al.* (2020) *EMBO J.* **39**: e103454
- 5) Ochiai T, Honsawa T, Yamaguchi K, Sasaki Y, Yokoyama C, Kuwata H, Hara S.

Prostacyclin synthase deficiency exacerbates systemic inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced septic shock in mice. *Inflamm Res.*, Online ahead of print. (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ochiai Tsubasa, Honsawa Toshiya, Sasaki Yuka, Hara Shuntaro	4. 巻 45
2. 論文標題 Prostacyclin Synthase as an Ambivalent Regulator of Inflammatory Reactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 979 ~ 984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsubasa Ochiai, Toshiya Honsawa, Keishi Yamaguchi, Yuka Sasaki, Chieko Yokoyama, Hiroshi Kuwata, Shuntaro Hara	4. 巻 -
2. 論文標題 Prostacyclin synthase deficiency exacerbates systemic inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced septic shock in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00011-024-01902-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山口慧士、落合翔、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 マクロファージに発現するプロスタサイクリン合成酵素の機能解析
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口慧士、落合翔、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 分化したマクロファージにおけるプロスタサイクリン合成酵素の機能解析
3. 学会等名 フォーラム2022: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 落合翔、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 大腸発がんにおける長鎖アシルCoA合成酵素-4の機能解析
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsubasa Ochiai, Hiroshi Kuwata, Shuntaro Hara
2. 発表標題 Role of acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 in colorectal carcinogenesis
3. 学会等名 2022 Japan/Korea joint symposium in pharmaceutical health science and environmental toxicology: poster session (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsubasa Ochiai, Yuka Sasaki, Hiroshi Kuwata, Chieko Yokoyama, Shuntaro Hara
2. 発表標題 Prostacyclin-IP signaling exacerbates cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis
3. 学会等名 17th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 落合 翔、桑田 浩、原 俊太郎
2. 発表標題 大腸での炎症性疾患形成における長鎖アシルCoA合成酵素-4の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 落合翔、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 大腸がんの発症・進展における長鎖アシルCoA合成酵素-4の機能解析
3. 学会等名 第65回脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本沢駿弥、落合翔、横山知永子、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 敗血症の病態形成におけるプロスタサイクリン合成酵素の機能解析
3. 学会等名 フォーラム2023: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 落合翔、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 腸上皮細胞に発現した長鎖アシルCoA合成酵素4の腸炎誘導大腸がん進展における機能解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本沢駿弥、落合翔、山口慧士、桑田浩、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 リポ多糖誘導敗血症におけるプロスタサイクリン合成酵素の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第144回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田宮結、落合翔、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 長鎖アシルCoA合成酵素-4 (ACSL4) は大腸疾患形成に対し促進的に関与する
3. 学会等名 日本薬学会第144回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 桑田浩、中谷絵理子、冨塚祐希、落合翔、佐々木由香、依田恵美子、原俊太郎
2. 発表標題 長鎖アシルCoA合成酵素4の欠損がリポ多糖により惹起される炎症応答に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第144回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木由香、落合翔、遠藤勇気、鈴木康友、近藤幸尋、原俊太郎
2. 発表標題 環境化学物質による膀胱がんにおける膜結合型プロスタグランジンE合成酵素 (mPGES)-1の役割
3. 学会等名 日本薬学会第144回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tsubasa Ochiai, Hiroshi Kuwata, Shuntaro Hara
2. 発表標題 Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) links inflammation and carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated cancer
3. 学会等名 2023 Japan/Korea joint symposium in pharmaceutical health science and environmental toxicology: poster session (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toshiya Honsawa, Tsubasa Ochiai, Chieko Yokoyama, Hiroshi Kuwata, Shuntaro Hara
2. 発表標題 Prostacyclin synthase negatively regulates the inflammatory reactions caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in vivo
3. 学会等名 2023 Japan/Korea joint symposium in pharmaceutical health science and environmental toxicology: poster session (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関