

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590361

研究課題名(和文)新規マクロファージ活性化制御分子EPRAPの機能解析

研究課題名(英文)Role of EP4 receptor-associated protein in regulating macrophage activation

研究代表者

南学(Minami, Manabu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90511907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マクロファージにおける新規活性化調節因子EPRAPの、慢性炎症性疾患の病態における機能的意義を解明することを目的とした。すなわち、我々が開発したEPRAP遺伝子欠損マウスやマクロファージ特異的EPRAP強制発現マウスを用いて、ヒト炎症性腸疾患モデルや肺線維症モデルを作製し、EPRAPが、病変組織のマクロファージの過剰な活性化を抑制する、鍵となる重要な役割を果たし、病態の進行を防ぐ働きをしていることを明らかにした。さらにそのメカニズムとして、EPRAPが、病変部に浸潤したマクロファージにおいて、MEK-ERK経路の活性化を負に制御していることを証明した。

研究成果の概要(英文)：In this study we aimed to dissect the significance and pathophysiological roles of EP4 receptor-associated protein, EPRAP, a novel cytoplasmic regulator of macrophage activation. We generated EPRAP-deficient mice as well as transgenic mice with enforced expression of EPRAP specifically in macrophages. We used these mice and created animal models of human inflammatory bowel diseases and pulmonary fibrosis. In both experiments, EPRAP deficiency markedly increased infiltrated macrophage activation and local inflammation, resulting in significant decrease in survival rates. In addition, we figured out that EPRAP mitigated the MEK-ERK pathway activation and inhibited macrophage activation in the inflamed lesions. Our results indicated that EPRAP plays crucial roles in the pathogenesis and outcome of various inflammatory diseases by regulating macrophage activation in vivo.

研究分野：医歯薬学

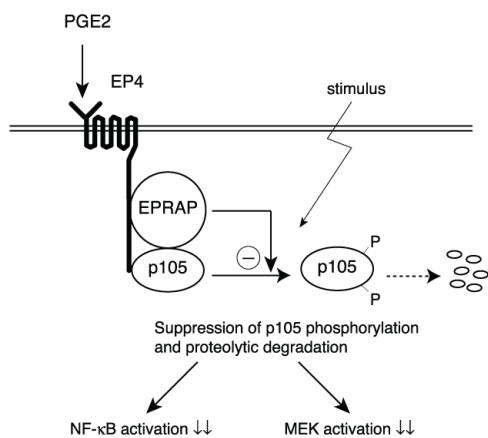
科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学 マクロファージ 慢性炎症 細胞内シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

EPRAP/FEM1A は、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の EP4 受容体の細胞内ドメイン結合蛋白として同定された新規のシグナル調節因子である。我々は以前、EPRAP が、EP4 受容体を介した PGE<sub>2</sub> によるマクロファージの古典的活性化抑制作用=抗炎症作用において中心的な役割を果たしていることを、培養マクロファージを用いた系で明らかにした。すなわち、EPRAP は、細胞質内において MAP キナーゼ経路や NF-κB 経路の抑制性スキャフォールド蛋白である NF-κB1 p105 と結合し、炎症刺激後の p105 のリン酸化とそれに引き続く加水分解を抑制することによって、細胞内 (マクロファージ) におけるこれら炎症性シグナル経路の過剰な活性化を抑制している (Minami M, et al. J Biol Chem, 2008. 下図)。

図 1: EPRAP を介した PGE<sub>2</sub>-EP4 受容体シグナルによるマクロファージ活性化抑制作用の分子メカニズム



マクロファージの過剰な活性化は、炎症性疾患だけでなく、2 型糖尿病や動脈硬化性疾患、悪性腫瘍など、様々な難治性慢性疾患の病態生理に深く関わっており、マクロファージの活性化制御は、これら疾患の治療標的となりうる。EPRAP は、炎症性刺激後の活性化を自らに制御する、言わば内在する「ブレーキ」に相当し、EPRAP が介在する細胞内シグナル伝達機構の解明は、マクロファージの活性化メカニズムの理解に重要であるだけでなく、これら慢性疾患の新たな治療標的としても期待が大きいと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規のマクロファージ活性化制御分子 EPRAP の、難治性慢性疾患の病態生理における生体での機能的意義を明らかにし、さらに EPRAP によるマクロファージ活性化制御の慢性疾患治療応用への可能性を探究することである。

### 3. 研究の方法

我々が開発した遺伝子改変動物、すなわち EPRAP 遺伝子欠損マウス及びマクロファージ特異的 EPRAP 強制発現マウスを用いて慢性炎

症モデル動物を作製し、表現型およびメカニズムの解析を行った。本研究期間内には、特に以下のモデルにおける EPRAP の機能解析を詳細に検討した。

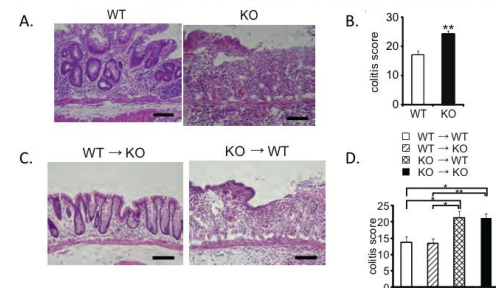
- (1) デキストラン硫酸誘発マウス大腸炎モデル
- (2) プレオマイシン誘発マウス肺臓炎モデル

### 4. 研究成果

#### (1) デキストラン硫酸誘発マウス大腸炎モデル

炎症性腸疾患モデルである、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 経口投与による腸炎発症を検討したところ、EPRAP 遺伝子欠損マウス (EPRAP KO) では腸炎の著しい悪化と粘膜下浸潤マクロファージの炎症性活性化亢進を認めしたが、これらの表現型は、骨髄移植により、マクロファージ特異的に EPRAP を発現させることにより回復した (図 1)。

図 1 マクロファージの EPRAP 欠損は DSS 腸炎の病態を悪化させる

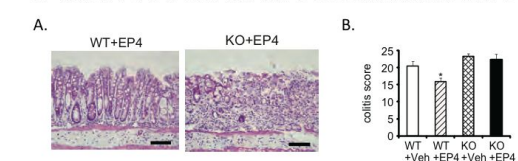


【上】EPRAP 遺伝子欠損マウス (KO) は野生型 (WT) と比較し、有意に腸炎が悪化した。【下】KO マウスに WT 骨髄細胞を移植すると腸炎は改善した (WT → KO) が、WT に KO マウス骨髄細胞を移植する (KO → WT) と腸炎は悪化した。A, C. 病理組織像, B, D., 腸炎スコアによる評価

EP4 受容体シグナル活性化による腸管炎症の抑制はすでに報告があり、我々も EP4 受容体選択的アゴニストを投与しその効果を検討したところ、野生型では DSS 腸炎の表現型改善を認めしたが、EPRAP KO マウスでは効果を示さなかった (図 2)。

図 2

EP4 受容体シグナルは EPRAP を介して DSS 腸炎の病態を改善する



野生型 (WT) と EPRAP 遺伝子欠損マウス (KO) に、EP4 受容体選択的アゴニスト (EP4) または vehicle (Veh) を投与し、DSS 経口投与による腸炎を誘導した。WT では EP4 アゴニスト投与により腸炎が有意に改善したが、KO マウスでは効果が認められなかった。A. 病理組織像, B. 腸炎スコアによる評価

以上の事実から、EP4 受容体シグナルによる腸管炎症制御には、下流分子として EPRAP が必須であることが示された。

さらに我々は、蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーを用いた詳細な検討を行い、EPRAP KO マウスでは、野生型と比較し、腸炎粘膜下浸潤マクロファージにおいて MEK-ERK の過剰な活性化 (リン酸化亢進) が認められ

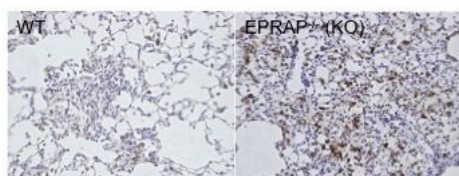
ることを明らかにした（以上は連携研究者との共同研究。論文投稿中）。

## (2) プレオマイシン誘発マウス肺臓炎モデル

引き続き我々は、プレオマイシン経気管投与による肺臓炎モデルも作製し、マクロファージのEPRAP遺伝子欠損が、肺胞マクロファージの炎症性活性化亢進とともに、生存率や肺臓炎病理組織像を著明に悪化させること（図3）、EP4受容体アゴニスト投与は野生型と異なりEPRAP KOマウスでは改善効果を示さないなど、DSS腸炎と同様の結果を得た。

図3

EPRAP欠損は、プレオマイシン誘発性肺臓炎を悪化させる。



プレオマイシン誘発性肺臓炎の病理像  
(F4/80陽性マクロファージの免疫染色結果)  
(左)野生型、(右)EPRAP欠損マウス肺組織

ここでも、EPRAP KOマウス肺胞マクロファージにおいて、MEK-ERKのリン酸化亢進が認められた。一方、マクロファージ特異的なEPRAP過剰発現マウスでは、野生型と比較し、プレオマイシン誘発肺臓炎肺組織の炎症像は著明に改善しており、肺胞マクロファージにおけるMEK-ERKのリン酸化も抑制されていた。（論文投稿準備中）。

以上より、慢性炎症の病態において、EPRAPが、EP4受容体下流にあって、マクロファージの炎症性活性化を負に制御する内因性の重要な抑制分子であることを、本研究において我々は明らかにした。

## 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7件)

Uza, N, H. Nakase, S. Yamamoto, T. Yoshino, Y. Takeda, S. Ueno, S. Inoue, S. Mikami, M. Matsuura, T. Shimaoka, N. Kume, M. Minami, S. Yonehara, H. Ikeuchi, T. Chiba. SR-PSOX/CXCL16 plays a critical role in the progression of colonic inflammation. *Gut*. 2011 Nov;60(11):1494-505. doi: 10.1136/gut.2010.221879. (査読有)  
Nakanishi, Y., M. Nakatsuji, H. Seno, S. Ishizu, R. Akitake-Kawano, K. Kanda, T. Ueo, H. Komekado, M. Kawada, M. Minami, T. Chiba. COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2

to M1 in ApcMin/+ mouse polyps.

*Carcinogenesis*. 2011

Sep;32(9):1333-9. doi:

10.1093/carcin/bgr128. (査読有)

Tamura, Y., T. Murayama, M. Minami, M.

Yokode, H. Arai. Differential effect

of statins on diabetic nephropathy in

db/db mice. *Int J Mol Med*. 2011

Nov;28(5):683-7. doi:

10.3892/ijmm.2011.769. (査読有)

Tamura, Y., T. Murayama, M. Minami, T.

Matsubara, M. Yokode, and H. Arai.

Ezetimibe Ameliorates Early Diabetic

Nephropathy in db/db Mice. *J*

*Atheroscler Thromb*.

2012;19(7):608-18. PMID: 22498767 査

読有)

Nakanishi Y, Seno H\*, Fukuoka A, Ueo

T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N,

Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura

A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M,

Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM,

Yonehara S, Chiba T. Dcl1

distinguishes between tumor and

normal stem cells in the

intestine. *Nat Genet*. 2013

Jan;45(1):98-103. doi:

10.1038/ng.2481. (査読有)

(\*Corresponding author)

Akitake-Kawano R, Seno H\*, Nakatsuji

M, Kimura Y, Nakanishi Y, Yoshioka T,

Kanda K, Kawada M, Kawada K, Sakai Y,

Chiba T. Inhibitory role of Gas6 in

intestinal tumorigenesis.

*Carcinogenesis*. 2013

Jul;34(7):1567-74. doi:

10.1093/carcin/bgt069. (査読有)

(\*Corresponding author)

An international survey of physicians

regarding clinical trials: a

comparison between Kyoto University

Hospital and Seoul National

University Hospital.

Ito-Ihara T, Hong JH, Kim OJ, Sumi E,

Kim SY, Tanaka S, Narita K, Hatta T,

Choi EK, Choi KJ, Miyagawa T, Minami

M, Murayama T, Yokode M. *BMC Med Res*

*Methodol*. 2013 Oct 25;13:130. doi:

10.1186/1471-2288-13-130. (査読有).

〔学会発表〕(計8件)

Minami, M. and M. Yokode : Role of

bioactive eicosanoid signaling in

atherosclerosis and insulin

resistance. (シンポジウム指定講演)

第19回日本血管生物医学学会, 12.9, 2011,

東京

南学: がん化学療法の進歩と心血管合

併症-分子標的治療時代の循環器マネー

ジメントのあり方-. (モーニングレク

チャー) 第 77 回日本循環器学会, 3.17,2013, 横浜

Yasui, M., M. Minami, M. Yokode : Role of EP4-EPRAP signaling in obesity and diabetes (Oral presentation) 第 86 回日本薬理学会年会, 3.23,2013, 博多 (福岡)

Fujikawa R., M. Minami, S. Higuchi, M. Yasui, M. Yokode : The role of EP4 receptor associated protein in brain (Oral presentation) 第 15 回ブレインサイエンス研究会, 6.1,2013, 博多(福岡)

安井 美加, 南 学, 樋口 聖, 横出 正之 : Role of EP4-EPRAP signaling in obesity and diabetes-肥満や 2 型糖尿病における EP4 受容体および EPRAP の機能解析-(Poster presentation) 第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 7.19,2013, 東京

Yasui, M., M. Minami, M. Yokode. : Role of EP4 signaling in obesity-related inflammation -肥満に伴う慢性炎症における EP4 受容体の機能解析-(Poster presentation) 第 36 回日本分子生物学会, 12.4,2013, 神戸  
樋口 聖, 南 学, 中辻 正人, 藤川 理沙子, 安井 美加, 村山 敏典, 横出 正之 : EP4 receptor-associated protein (EPRAP) in macrophages protects against bleomycin-induced pulmonary inflammation in mice. (Oral presentation) 第 87 回日本薬理学会年会, 3.19,2014, 仙台(宮城)

藤川 理沙子, 南 学, 樋口 聖, 安井 美加, 池堂 太一, 永田 学, 横出 正之 : EP4 receptor-associated protein (EPRAP) in microglia promotes inflammation in the central nervous system. (Poster presentation) 第 87 回日本薬理学会年会, 3.19,2014, 仙台 (宮城)

〔図書〕(計 9 件)

南 学, 横出 正之 : 高齢者における脂質管理・動脈硬化学会からのメッセージ Geriatric Med 49(10):1097-1102, 2011

南 学 : 肥満・動脈硬化の発症における新規マクロファージ活性化調節因子 EPRAP/Fem1a の機能解析 Therapeutic Research 33(6):821-23, 2012

南 学 : 特集 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 Update, シリーズ危険因子「家族歴」動脈硬化予防 11(4):119-120, 2013

南 学, 横出 正之 : 特集 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012, 4. 動脈硬化性疾患の包括的管理 The Lipid 24(1):42-47, 2013

南 学 : 動脈硬化性疾患予防ガイドライ

ン 2012 改訂のポイント 前編 都薬雑誌 35(3):4-8, 2013

南 学 : 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 改訂のポイント 後編 都薬雑誌 35(4):10-13, 2013

南 学 : 脂質異常症治療薬の特徴と薬剤使用に際しての留意点～服薬指導へのアドバイス～ 都薬雑誌 35(5):12-16, 2013

南 学 : 特集 脂質異常症-基礎・臨床研究の最新知見-, 動脈硬化予防における多面的アプローチ 日本臨床 増刊号 71(3):36-40, 2013

南 学 : 増加する癌外来化学療法-循環器系の副作用に注意を-, 日経メディカル 2013 年 6 月号特別編集版 :18-19, 2013

〔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  
[http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~rinsho/research/research\\_minami/](http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~rinsho/research/research_minami/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 学 (MINAMI, Manabu)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 9 0 5 1 1 9 0 7

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

妹尾 浩 (SENO, Hiroshi)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号 : 9 0 3 3 5 2 6 6