

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659130

研究課題名（和文） プロスタノイドの免疫制御における役割解明

研究課題名（英文） Roles of the prostanoids in the regulation of immunological responses

研究代表者

牛首 文隆 (USHIKUBI FUMITAKA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：50243035

研究成果の概要（和文）：本研究は、8系統の各プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた腎間質線維化および T 細胞依存性肝炎モデルを解析ターゲットとし、これら疾患の病態形成にどのプロスタノイドがどの程度重要な役割を果たすのか、またその作用機構を明らかにする。これにより、プロスタノイドの免疫制御における役割解明の基礎固めを行う。

本研究により、腎間質線維化の病態形成におけるプロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub>系の役割とその作用機構の詳細を明らかにした。また、Con A 誘発免疫依存性肝炎モデルを用いプロスタノイドとその受容体、特にPGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub>系の肝炎病態形成における役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To clarify the roles of the prostanoids in the regulation of immunological responses, we employed two animal models showing pathophysiology dependent on immunological responses; renal interstitial fibrosis and Con A-induced hepatitis. Through the analysis of these animal models, we found novel roles and action mechanisms of the PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> system in the development of renal interstitial fibrosis and Con A-induced hepatitis.<sup>4</sup>

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：プロスタノイド、プロスタグランジン、トロンボキサン、腎間質線維化、Con A 誘発肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成る生理活性脂質であり、各々特異的な受容体を介して作用を発揮する。実際、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub> の受容体として DP、EP、FP、IP、TP があり、EP には EP<sub>1</sub>～EP<sub>4</sub> の 4 種類のサブタイ

プが存在する。従来、プロスタノイドには炎症のメディエーターとしての役割が良く知られている。しかし、その免疫制御での役割には不明な点が多く、当該分野の研究は遅れている。このような状況の下、我々は従来の研究過程で、プロスタノイドの免疫系における役割を示唆する以下の結果を得ている。

● 抗原提示細胞であるマクロファージは、免疫刺激に応じて多量の PGE<sub>2</sub> や TXA<sub>2</sub> を産生する。

(Narumiya S, *et al. Physiol Rev*, 79: 1193-1226, 1999)

● PGE<sub>2</sub> が、マクロファージからの IL-6 や TNF- $\alpha$  などのサイトカイン産生を制御している。

(Shinomiya S, *et al. Biochem Pharmacol*, 61: 1153-1160, 2001)

● 胸腺や末梢 T 細胞に、TXA<sub>2</sub> 受容体が高発現している。

(Ushikubi F, *et al. J Exp Med*, 178: 1825-1830, 1993)

● PGD<sub>2</sub> が、抗原刺激に伴う気道上皮でのケモカインの発現に関与している。

(Matsuoka T, *et al. Science*, 287: 2013-2017, 2000)

● TXA<sub>2</sub> が、抗原提示細胞である樹状細胞と T 細胞との相互作用を制御している。

(Kabashima K, *et al. Nat Immunol*, 4: 694-701, 2003)

これらの研究成果を基に、プロスタノイドの免疫制御における役割解明を着想した。

## 2. 研究の目的

従来、プロスタノイドの作用解析では、その産生を阻害する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) や特異性が限定された各受容体アゴニストが用いられてきた。しかし、これらの手段では、特定のプロスタノイドの作用を正確に評価することができなかった。本研究では、各プロスタノイド受容体欠損マウスを用い、免疫制御におけるプロスタノイドの役割解明を目指すところに特色がある。また本研究は、未解明なプロスタノイドの免疫制御

における役割を、免疫系の関与が確立された片側尿管結紮による腎間質線維化モデルと Con A 誘発免疫依存性肝炎モデルを用いて明らかにしようと試みるところに特色がある。そこで本研究は、8系統の各プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた腎間質線維化および T 細胞依存性肝炎モデルを解析ターゲットとし、これら疾患の病態形成にどのプロスタノイドがどの程度重要な役割を果たすのか、またその作用機構を明らかにする。これにより、プロスタノイドの免疫制御における役割解明の基礎固めを行う。

## 3. 研究の方法

### 腎間質線維化モデルを用いた解析

腎間質線維化モデルは、尿管結紮により尿管上皮に圧力負荷が加わり始まる。ついで、尿管上皮がケモカインを産生し、間質にマクロファージが動員される。マクロファージは成長因子などを介して間質でのミオフィibroblastの増殖と基質の分泌を促進し、腎間質の線維化に至る。この解析系は、自然免疫系反応を基本病態とする疾患モデルと考えられる。そこで片側尿管結紮により腎間質線維化を惹起し、マクロファージの浸潤、ミオフィibroblastの増殖、間質線維化の程度を各受容体欠損マウス間で比較検討する。

### 腎間質線維化モデルでのプロスタノイドの免疫制御機構の解析

a. 尿管上皮が産生する RANTES などのケモカインがマクロファージの浸潤に、また、マクロファージが産生する CTGF などがミオフィibroblastの増殖に働く。そこで、これらの因子の動態を各受容体欠損マウス間で比較検討し、プロスタノイドの尿管上皮、マクロファージ、ミオフィibroblast

への作用を解析する。

b. 尿細管上皮細胞、マクロファージやフィibroプラストを培養し、プロスタノイドのこれらの細胞に対する作用を解析する。具体的には、各種刺激による尿細管上皮細胞やマクロファージのサイトカイン産生に対する効果やフィibroプラストの増殖に及ぼす作用を解析する。

#### Con A 誘発肝炎モデルを用いた解析

コンカナバリン (Con) A 誘発肝炎モデルは、レクチンの一種 Con A が肝臓特異的にマクロファージや T 細胞を活性化することに始まり、様々なサイトカインが免疫反応の増幅を仲介して肝炎を惹起する。このモデルは、ウイルス性肝炎などの T 細胞依存性肝炎のモデルとして確立され、近年精力的に解析が行われている。さらに、Con A 誘発肝炎モデルでは、その免疫反応の場においてプロスタノイドの産生系とその受容体の豊富な発現が認められる。そこでマウスに Con A を静注し、肝炎を誘発する。この時、肝臓からの漏出酵素の経時的測定や詳細な組織学的解析を行い、各プロスタノイド受容体欠損マウス間で、肝炎の程度や組織学的変化の差異を比較検討する。

#### Con A 誘発肝炎モデルでのプロスタノイドの免疫制御機構の解析

a. T 細胞や Kupffer 細胞が産生する TNF- $\alpha$  や IL-4 などのサイトカインがその病態形成に重要な役割を果たす。そこで、これらサイトカインの動態を各受容体欠損マウス間で比較検討し、プロスタノイドが T 細胞あるいは Kupffer 細胞の機能に与える影響を解析する。

b. 肝臓の構成細胞を分離培養し、プロスタノイドの作用を解析する。具体的には、肝

細胞や類洞内皮細胞傷害に対する効果や Kupffer 細胞などのサイトカイン産生に及ぼす作用を解析する。さらに、Kupffer 細胞と CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用に及ぼす効果を解析する。

#### 4. 研究成果

腎間質繊維化の病態形成における PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 系の役割とその作用機構の詳細を明らかにした。また、Con A 誘発免疫依存性肝炎モデルを用いプロスタノイドとその受容体、特に PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 系の肝炎病態形成における役割を明らかにした。

#### 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)

1. Khan MR, Ushikubi F, Taniguchi T, et al. M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. J Gastroenterol. In press.
2. Aburakawa Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N, et al. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. Circ J. 77: 1053–1062, 2013.
3. Toda K, Yuhki K, Ushikubi F, Saibara T, et al. 17 $\beta$ -Estradiol is critical for the preovulatory induction of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in mice. J Gastroenterol. In press. Mol Cell Endocrinol. 362: 176–182, 2012.
4. Nakagawa N, Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Ushikubi F, et al. The intrinsic prostaglandin E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> system of the renal

tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice. *Kidney Int.* 82: 158–171, 2012.

5. Kojima F, Ushikubi F, Crofford LJ, et al. Potential roles of microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatoid arthritis. *Inflamm Regen.* 31: 157–166, 2011.

6. Mitsumori T, Ushikubi F, Narumiya S, et al. Thromboxane receptor activation enhances striatal dopamine release, leading to suppression of GABAergic transmission and enhanced sugar intake. *Eur J Neurosci.* 34: 594–604, 2011.

7. Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Ushikubi F, et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular system: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther.* 129: 195–205, 2011.

〔学会発表〕（計 4 件）  
日本薬理学会総会・北部会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕  
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牛首 文隆 (USHIKUBI FUMITAKA)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50243035

### (2) 研究分担者

結城 幸一 (YUHKI KOH-ICHI)  
旭川医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80302420

柏木 仁 (KASHIWAGI HITOSHI)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60510609

(3) 連携研究者  
なし