

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659395

研究課題名（和文） 心腎ストレス応答分子としての L-PGDS の役割

研究課題名（英文） PGD2-CRTH2 pathway promotes tubulointerstitial fibrosis

研究代表者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30265798

研究成果の概要（和文）：

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)は、脳で発見され睡眠調節に関係するプロスタグランジン D₂(PGD₂)を合成する分子として報告された。近年、L-PGDS-PGD2 経路は、虚血性心疾患、動脈硬化、慢性腎臓病、メタボリック症候群の病態を修飾するメディエーターとして注目を集めている。本研究では、L-PGDS によって合成された PGD₂ が、免疫応答の調節を介して、腎臓線維化に関与していること、心筋細胞に対しては、erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)と呼ばれるストレス応答分子の活性化を介して細胞死から守る方向に作用する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Urinary excretion of lipocalin-type PGD(2) synthase (L-PGDS), which converts PG H(2) to PGD(2), increases in early diabetic nephropathy. In addition, L-PGDS expression in the tubular epithelium increases in adriamycin-induced nephropathy, suggesting that locally produced L-PGDS may promote the development of CKD. In this study, we found that L-PGDS-derived PGD(2) contributes to the progression of renal fibrosis via CRTH2-mediated activation of Th2 lymphocytes. In a mouse model, the tubular epithelium synthesized L-PGDS de novo after unilateral ureteral obstruction (UUO). L-PGDS-knockout mice and CRTH2-knockout mice both exhibited less renal fibrosis, reduced infiltration of Th2 lymphocytes into the cortex, and decreased production of the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. Furthermore, oral administration of a CRTH2 antagonist, beginning 3 days after UUO, suppressed the progression of renal fibrosis. Ablation of IL-4 and IL-13 also ameliorated renal fibrosis in the UUO kidney. Taken together, these data suggest that blocking the activation of CRTH2 by PGD(2) might be a strategy to slow the progression of renal fibrosis in CKD.

We recently demonstrated that glucocorticoids markedly upregulate the expression of cyclooxygenase (COX)-2 in cardiomyocytes and protect hearts from ischemia-reperfusion (I/R) injury by activating lipocalin-type prostaglandin D (PGD) synthase (L-PGDS)-derived PGD₂ biosynthesis. Here, we examined a downstream mechanism of cardioprotection elicited by PGD₂ biosynthesis. Acute PGD₂ treatment did not protect hearts against I/R injury. We then speculated that PGD₂ and/or its metabolite 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ₂ (15d-PGJ₂) activate gene expression networks to mediate the glucocorticoid-mediated cardioprotection. Using an unbiased approach, we identified that glucocorticoids induce a number of well-known erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) target genes in heart in an L-PGDS-dependent manner, and that the cardioprotective effect of glucocorticoids against I/R injury was not seen in Nrf2-knockout (KO) hearts. We showed relatively low expression of canonical PGD₂ receptors (i.e., DP1 and DP2) in heart, but abundant expression of the canonical PGF₂ α receptor (FP), which binds PGF₂ α and PGD₂ with equal affinity. Glucocorticoids also failed to induce the expression of L-PGDS-dependent Nrf2 target genes in FP-KO hearts. PGD₂ acted through its metabolite 15d-PGJ₂ in heart, as evidenced by the glucocorticoid-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ . In turn, glucocorticoids failed to induce the expression of L-PGDS-dependent Nrf2

target genes in hearts pretreated with PPAR γ antagonist GW9662, and glucocorticoid-mediated cardioprotection against I/R injury was compromised in FP-KO mice and GW9662-treated mice. In conclusion, PGD2 and its metabolite 15d-PGJ2 are cooperatively involved in glucocorticoid-mediated cardioprotection against I/R injury via activation of Nrf-2. This study is the first showing that FP is a functionally relevant PGD2 receptor in cardiomyocytes. In conclusions, PGD2 acts predominantly at FP receptors and not canonical PGD2 receptors (DP1 and DP2) in the heart. In addition, we propose that activation of PPAR γ by the dehydrated metabolite of PGD2 (15d-PGJ2) is another mechanism by which glucocorticoids induce its cardioprotective effects.

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：内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

これまで PGD2 の生物学的意義に関する研究としては、血行動態に対する影響や、気道粘膜や皮膚組織におけるアレルギー反応における機能を解析したものがほとんどである。炎症に関しては pro-inflammatory、anti-inflammatory 双方の機能が報告されており、未だ controversial といえる。我々の研究室では、グルココルチコイドによる PGD2 合成酵素(L-PGDS) の誘導が、虚血再還流心筋障害に対して心筋保護的に作用することをみいだした。L-PGDS は心臓以外にも腎臓の尿細管上皮細胞で発現していることが報告されている。糖尿病性腎症や高血圧性腎症で尿中の L-PGDS が増加することが報告され、腎障害を早期に検出するためのバイオマーカーとなりうる可能性が報告されている(Hirawa N. Hypertension. 2002, Hamano K. Nephron. 2002)。

我々は、最近、L-PGDS 由来の PGD₂ が CRTH2 受容体を介した Th2 リンパ球の活性化を介して腎臓線維化に関与してことを明らかにした(J Am Soc Nephrol. 2012;23(11):1797-809)。片側尿管閉塞(UUO)後に尿細管上皮細胞でL-PGDSが合成されることをマウスで確認した。L-PGDS ノックアウトマウスと CRTH2 ノックアウトマウスは、UUO後の腎線維症、皮質へのTh2リンパ球の浸潤、Th2 サイトカイン IL-4 および IL-13 の産生が野生型に比べて減少していた。さらに、CRTH2 アンタゴニストを UUO3 日後に経口投与を開始すると、腎線維症の進行が抑制された。IL-4 ノックアウトマウスと IL-13 ノックアウトマウスでは、UUO後の腎線維症が减弱していた。以上の結果から、CRTH2 の活性化を阻止する治療が、CKD の腎線維症の進行を遅らせるための有効な戦略であることが

示唆された。

2. 研究の目的

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)は、脳で発見され睡眠調節に関係するプロスタグランジン D₂(PGD₂)を合成する分子として報告された。近年、L-PGDS-PGD₂ 経路は、虚血性心疾患、動脈硬化、慢性腎臓病、メタボリック症候群の病態を修飾するメディエーターとして注目を集めている。L-PGDS によって合成された PGD₂ は、免疫応答の調節を介して、あるいは実質細胞に直接的に作用して、多彩な生理作用を発揮していると考えられる。本研究は、心不全の原因として臨床的に最も頻度の高い心筋梗塞後リモデリングと慢性腎不全の最終共通経路である腎間質線維化における L-PGDS-PGD₂ 経路の病態生理学的役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腎臓線維化における L-PGDS-PGD₂ 経路の役割
片側尿管結紮モデルにおいて、近位尿細管上皮細胞でL-PGDSの発現が誘導され、尿中のPGD₂の代謝産物の排泄量が増加薄すること、L-PGDS ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて、尿管結紮後10日目の間質線維化の程度が有意に抑制されていた。尿管結紮後に間質に浸潤してくるマクロファージの数は、L-PGDS ノックアウト、野生型マウス間で差異を認めなかった。大変興味深いことに、TH2 リンパ球の数が尿管結紮後10日目のL-PGDS ノックアウトマウスの腎臓で有意に減少していた。PGD₂ 受容体の CRTH2 受容体は、Th2 リンパ球に発現しており、Th2 リンパ球の遊走やサイトカイン(IL-4, IL-13)の産生を刺激することが知られ

ている。一方で、IL-4, IL-10などのサイトカインは肝臓や肺において線維芽細胞を刺激して、線維化を促進することが知られている。そこで、我々は、ストレスを受けた尿細管でL-PGDSを介して産生されたPGD₂がTh2リンパ球の遊走と活性化を引き起こし、このTh2リンパ球から分泌されるIL-4, IL-13などのTh2サイトカインが、慢性炎症とそれに続く間質線維化進展過程に重要な役割を果たしているという仮説をたてた。この仮説を検証するために、CRTH2受容体ノックアウトマウスに尿細管結紮を行ったところ、予想通り、腎臓間質の線維化が抑制された。さらに、尿細管結紮後に、CRTH2受容体アンタゴニストを経口投与することによっても、腎臓間質の線維化が抑制されることを確認した(特許申請中)。本研究ではCRTH2受容体拮抗薬の腎臓間質線維化抑制作用の分子機序を解明するとともにCRTH2受容体拮抗薬が他の腎疾患モデル動物でも有効であることを確認し臨床応用を目指す。腎臓間質線維化抑制効果の分子機序の解明を進める。IL-4, IL-13はTH2リンパ球が産生する主要なサイトカインである。野生型マウスと比較するとL-PGDSKOやCRTH2KOではUUOをかけた後に腎皮質間質でのIL-4, IL-13発現レベルは低下していた。そこで、IL-4KO, IL-13KO(IL-13プロモーター変異マウス)に尿細管結紮を施して腎臓間質線維化の程度を野生型マウスと比較し、腎臓間質線維化におけるIL-4, IL-13の関与を明らかにする。CRTH2拮抗薬投与によってUUO後の腎臓線維化が抑制されるか否かを検討する。

他の腎臓線維化モデルL-PGDS-PGD₂-CRTH2経路が普遍的に腎臓の線維化に関与していることを示す。

(2) 心筋保護におけるL-PGDS-PGD₂経路の意義

我々は、グルココルチコイドDexamethasone(DEX)の投与によってL-PGDS-PGD₂経路が活性化され、心筋虚血再灌流障害や急性心筋炎後のリモデリングが抑制されることを報告してきた(J Clin Invest. 2009;119(6):1477-88, J Cardiol. 2013;61(3):237-42.)。L-PGDS-PGD₂経路による心筋保護の分子機序を解明するために、野生型マウス、L-PGDSノックアウトマウスをDEXで刺激して遺伝子発現様式を網羅的に比較検討した。その結果、DEX投与によってL-PGDS依存性にerythroid-derived 2-like 2(Nrf2)の標的抗酸化分子が誘導されることを発見した。また、Nrf2ノックアウトマウスでは、DEXによる心筋保護効果は観察されなかったことから、Nrf2の活性化を介してL-PGDS-PGD₂経路による心筋保護を発揮していると考えられた。

PGD₂の受容体にはDP1, CRTH2が存在するが、そのどちらも培養心筋細胞ではほとんど

発現していなかった。しかし、PGD₂刺激で培養心筋細胞は著名な肥大を呈することから、DP1, CRTH2以外の受容体、もしくは、PGD₂代謝産物の15-deoxy- Δ 12,14-PGJ₂(15d-PGJ₂)を介していると考えられた。

まず、マウスにDEXを投与した後に、心臓を取り出して、PGD₂, 15d-PGJ₂を質量分析で計測した。

これまでの報告から、PGD₂はDP1と同様FP受容体にも同程度の親和性で結合できることが知られている。そこで、DP, CRTH2, FPノックアウトマウスをDEXで刺激し、虚血灌流障害に対する抵抗性を比較検討した。

さらに、PGD₂→15d-PGJ₂を介した経路の関与を検討するために、DEX刺激によりperoxisome proliferator-activated receptor(PPAR γ)(PPAR γ : 15d-PGJ₂はPPAR γ の内因性アゴニストとして作用する)が活性化するか否かを検討する。さらに、DEX刺激による心筋保護効果がPPAR γ antagonist GW9662で抑制されるか否かも検討する。

4. 研究成果

(1) PGD₂-CRTH2経路は腎臓線維化を促進する

我々は、腎臓間質線維化の動物モデルとしてすでに確立しているマウス片側尿管結紮unilateral urethral obstruction(UUO)モデルにおいて、L-PGDSがUUOによって尿細管上皮細胞に誘導されることを確認した。L-PGDSノックアウトマウスでは、野生型より急性期の尿細管腔拡大の程度は強かったが、慢性期の腎臓間質の線維化の程度は、野生型マウスより抑制されていた。慢性期の腎臓間質線維化抑制は、PGD₂のCRTH2受容体のノックアウトマウスでも観察された。以上の結果から、局所で産生されるPGD₂が、CRTH2受容体を介して、Th2リンパ球を呼び込み、活性化して、間質線維化を促進すると考えられた。腎臓間質の線維化は、さまざまな原因による腎不全発症の最終共通経路で、現在、腎臓間質の線維化に対する治療薬は存在しない。

CRTH2受容体拮抗薬は、UUOモデルにおいて、腎障害早期に投与すると腎臓間質の線維化を抑制することから、腎臓間質の線維化の抑制に臨床上也も有効である可能性が示唆さ

れた。

(2) L-PGDS-PGD₂経路は、PGD₂-FP経路と15d-PGJ₂を介して、転写因子Nrf2を活性化することによって心筋保護作用を発揮する。我々は、グルココルチコイドDexamethasone (DEX)の投与によってL-PGDS-PGD₂経路が活性化され、心筋虚血再灌流障害や急性心筋炎後のリモデリングが抑制されることを報告してきた(J Clin Invest. 2009;119(6):1477-88, J Cardiol. 2013;61(3):237-42.)。ここでは、PGD₂による心筋保護の分子機序を解明するために研究を進めた。DEX投与によってL-PGDS依存性にerythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)の標的抗酸化分子が誘導されることを発見した。また、Nrf2-ノックアウトマウスでは、DEXによる心筋保護効果は観察されなかった。PGD₂の受容体にはDP1, CRTH2が存在するが、そのどちらも心筋細胞ではほとんど発現していなかった。我々は、心筋細胞においてはFP(本来はPGF2 α の受容体)がPGD₂の主たる受容体であることが明らかにした。PGD₂は15-deoxy- Δ 12,14-PGJ₂(15d-PGJ₂)に分解され、15d-PGJ₂はNrf2やperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ を活性化することが知られている。DEX投与によってPPAR γ の活性化が起こること、DEX刺激による心筋保護効果がPPAR γ antagonist GW9662で抑制されたことから、PGD₂ \rightarrow 15d-PGJ₂を介した経路も心筋細胞保護に関与している可能性が示唆された。

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2件)

1. Nakamura H, Kunitsugu I, Fukuda K, Matsuzaki M, Sano M. Diverse stage-dependent effects of glucocorticoids in a murine model of viral myocarditis. Journal of Cardiology.(2013) (Corresponding author) ;61(3):237-42、査読の有
2. Ito H, Sano M, Nagata N, Aritake K, Katsumata Y, Xiaoxiang Y, Morizane S, Matsuhashi T, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Hosoya T, Fukuda K. Lipocalin-type prostaglandin D2 synthase promotes renal interstitial fibrosis via Th2 lymphocyte activation in unilateral ureteral obstruction. J Am Soc Nephrol. (2012) 23(11):1797-809. (Corresponding author) 査読の有

[学会発表] (計1件)

Yoshinori Katsumata, Motoaki Sano, Tomohiro Matsuhashi, Keiichi Fukuda. L-PGDS-derived PGD₂ is a cardioprotective prostanoid that alleviates ischemia-reperfusion injury by activating Nrf-2-mediated antioxidant gene expression via the FP receptor, The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Hakata 2012/3/18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30265798