

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 15 年 4 月 博士課程入学

田島 剛

指導教官 尾崎 博

論文題目 LPS によるマクロファージ活性化機構におけるプロスタグランジンの役割

緒 言

生体防御機構である免疫は自然免疫系および獲得免疫系の 2 つのシステムが一体となって機能している。マクロファージ (mφ) はふだんより組織に常在する常在型 mφ と炎症などにより血液中から浸潤してくる単球由来の mφ とに分けられるが、いずれも自然免疫系の中心を担うと同時に、樹状細胞とともに獲得免疫の初期段階である抗原提示を行う重要な役割をもつ。mφ は自然免疫応答として、侵入してきた細菌などの異物を認識して貪食し、酵素や一酸化窒素 (NO) をはじめとするスーパーオキシドで消化する。このような細菌構成物質や化学物質、ウイルス遺伝子などを認識する受容体として発見されたのが Toll-like receptor (TLR) であり、細菌細胞壁構成成分であるリポ多糖類 (LPS) を認識する受容体は TLR4 である。敗血症などで体内へ細菌が侵入した際には、TLR を介して mφ が活性化され、炎症性サイトカインや NO、プロスタグランジン (PG) などの炎症メディエーターの産生が亢進する。

PG はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) および各 PG 合成酵素を介して産生される生理活性物質で、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂ および TXA₂ の分子種がある。これまでに炎症性疾患の患部において、誘導性 COX である COX-2 発現量が mφ で増加し PGD₂ および PGE₂ の産生が増加することや、PGD₂ が好酸球や Th2 細胞の遊走に関わっていること、PGE₂ が血管透過性の亢進や T 細胞でのサイトカイン分泌を調節することが報告され、PG およびその産生の律速段階である COX が自然免疫の制御因子となる可能性を示唆している。

これらの背景から、LPS 刺激によって mφ から産生されるであろう PGD₂ や PGE₂ が、mφ 自身を含む周囲の細胞群の機能に影響することが考えられるが、その詳細は検討されていない。そこで本研究では、

mφが LPS によって活性化する過程において、PGD₂ や PGE₂ が mφ の細胞遊走能および NO 産生能におよぼす影響について検討するとともに、その情報伝達機構を解明し、PG が自然免疫系の制御に果たす役割について明らかにすることを目的とした。

結果および考察

1. PG と mφ 遊走能

本項目では mφ の LPS 刺激に対する遊走に PGD₂ および PGE₂ がおよぼす影響について検討した。実験にはマウス由来株化 mφ である RAW 264.7 細胞とマウスから採取した腹腔 mφ を供した。

mφ での PGD₂ および PGE₂ 産生能について検討した。RAW264.7 細胞を LPS (1 μg/ml) で 0-8 時間刺激したところ、COX-2 および PGD₂ 合成酵素 H-PGDS、PGE₂ 合成酵素 mPGES-1 の mRNA 発現が時間依存的に増加し、培地中に含まれる PGD₂ ならびに PGE₂ 量が増加していた。次に、mφ における PGD₂、PGE₂ 受容体の発現について確認した。PGD₂ の受容体には DP1、DP2 が、PGE₂ の受容体には EP1、EP2、EP3、EP4 があるが、RAW264.7 細胞では DP2 および EP2、EP3、EP4 受容体が、腹腔 mφ では DP1、DP2、EP1、EP2、EP3 および EP4 受容体が発現することが確認された。よって mφ において LPS 刺激により PGD₂ および PGE₂ が産生され、autocrine 的に作用しうることが示唆された。

続いて pore insert を用いた migration assay を行い、mφ の LPS 刺激に対する遊走と PG の関与の有無を検討した。RAW264.7 細胞を LPS (1 μg/ml) で刺激したところ、3-8 時間後に遊走細胞数が時間依存的に増加したことが観察され、COX-2 阻害薬 CAY10404 1 μM の 30 分間前処置でこの遊走は減少したことから、LPS 刺激に対する遊走には PG が関与することが確認された。

そこで LPS 刺激に対する遊走にどの PGD₂、PGE₂ 受容体が関与するかを検討した。RAW264.7 細胞では DK-PGD₂ (DP2 アゴニスト) および ONO-AE1-329 (EP4 アゴニスト) 刺激に対する遊走が観察され、H-PGDS あるいは DP2 KO マウスの腹腔 mφ では LPS 刺激に対する遊走が野生型に比べ低下していた。よって mφ における LPS 刺激に対する遊走には DP2 および EP4 受容体が関与することが示唆された。

RAW264.7 細胞の F-actin を観察したところ、DP2 および EP4 刺激後 30 分で、細胞前縁部において細胞遊走時に特異的にみられる構造である lamellipodia や filopodia が既に形成されており、これらの刺激が mφ に直接遊走を誘導することが示唆された。また、DP2 および EP4 刺激しておこる遊走は ERK、PI3K、PKC、Rho 各阻害薬のいずれによっても減少した。一方、EP4 刺激により mφ の遊走に関与する代表的なケモカインである MCP-1 の mRNA 発現量が刺激 2 時間後から時間依存的に増加したが、DP2 刺激では変化しなかった。

これらの結果から、LPS 刺激による mφ の遊走活性化経路には mφ 自身が産生した PGD₂ および PGE₂ が DP2 および EP4 受容体を活性化し、ERK、PI3K、PKC および Rho を介した MCP-1 非依存性の経路と、EP4 受容体を介した MCP-1 依存性の経路の両方を動かすことが考えられた。

2. PG と NO 産生能

Mφでは LPS 刺激により誘導性 NO 合成酵素である iNOS の発現が増加して NO 産生が促進される。本項目では PGD₂ および PGE₂ が mφ の NO 産生能におよぼす影響について RAW264.7 細胞を用いて検討した。

はじめに LPS 刺激が RAW264.7 細胞の NO 産生能におよぼす影響を確認したところ、LPS (1 μg/ml) 4-24 時間処置により iNOS mRNA 発現量、蛋白質発現量が時間依存的に増加し、蛍光法を用い培養液中への NO 産生量が時間依存的に増加したことが確認された。これらはすべて CAY10404 1 μM 30 分間前処置により抑制されたことから、LPS 刺激により誘導される iNOS 誘導には COX-2 由来の PG が関与する可能性が示唆された。PGE₂ 1 μM、ONO-AE1-259 (EP2 アゴニスト; 1 μM) および ONO-AE1-329 (1 μM) 4 時間処置により iNOS mRNA 発現および蛋白質発現が増加したが、BW245C (DP1 アゴニスト; 1 μM) および DK-PGD₂ 処置ではみられなかった。よって LPS 刺激により産生された PGE₂ が EP2 および EP4 受容体を介して iNOS 発現の誘導に関与することが示唆された。

EP2 および EP4 受容体はいずれも Gs 蛋白と共役していることから、iNOS 合成誘導経路における cAMP ならびに PKA の関与について検討した。ELISA 法により LPS 4 時間処置により細胞内 cAMP 量が増加することが確認された。また膜透過性 cAMP アナログ db-cAMP (1-10 μM) および cAMP 合成促進薬 forskolin (1-10 μM) 処置によって濃度依存的に iNOS mRNA 発現が増加し、PKA 選択的阻害薬 KT-5720 (0.1-10 μM) を 30 分前処置すると LPS 刺激でおこる iNOS mRNA 発現が濃度依存的に減少した。これらのことから cAMP および PKA は LPS 刺激により誘導される iNOS 合成に重要であることが示唆された。

3. 消化管筋層常在型 mφ と PG

マウスの回腸には筋層部に常在型 mφ が存在し、回腸の運動調節を司る神経細胞やカハールの介在細胞の近傍に位置している。そのため常在型 mφ は炎症時にみられる回腸収縮能低下に関与すると考えられている。そこで本項目では回腸常在型 mφ においても PG による mφ 機能調節機構が存在することを、NO 産生とそれに引き続いておこる回腸平滑筋収縮力の減弱を指標として明らかにすることを目的とし、マウス回腸遠位部から粘膜層を剥離して作成した筋層標本を用いて以下の実験を行った。

C57BL/6J (B6) マウスおよび M-CSF を欠損し常在型 mφ を欠く *op/op* マウスの回腸から筋層標本を作成し LPS (100 μg/ml) で 4 時間刺激したところ、B6 マウスでは carbachol に対する収縮力の抑制がみられ、この抑制は NO 合成阻害薬 L-NMMA 前処置によりほぼ完全に回復した。*op/op* マウスでは、収縮抑制が軽度であり、L-NMMA での回復はほとんどみられなかった。また、B6 マウスの回腸筋層ホルマウント標本を免疫組織化学的に検討したところ、LPS 刺激によって COX-2 および iNOS が常在型 mφ でのみ発現していることが観察された。よって LPS 刺激による回腸収縮力の低下には回腸常在型 mφ が産生する NO が重要であることが確かめられた。

B6 マウス回腸標本において LPS 刺激に対してみられた iNOS mRNA 発現の減少と carbachol 収縮の抑制は CAY10404 1 μM の前処置により回復した。また、ONO-AE1-259 および ONO-AE1-329 処置により iNOS mRNA 発現量の増加と carbachol 収縮の抑制がみられた。また KT-5720 前処置により、B6 マウス回腸標

本で LPS 刺激によりみられた carbachol に対する収縮抑制は回復した。以上のことから、回腸常在型 mφ においても LPS 刺激により COX-2 を介して PGE₂ の産生が増加し、mφ に存在する EP2/EP4 受容体介して PKA を活性化し iNOS mRNA 合成を促進する機構が存在することが示唆された。

総 括

本研究により、細菌細胞壁構成要素である LPS を認識する TLR を介した mφ の活性化により、COX-2 を介した PGD₂ や PGE₂ の産生が亢進すること、そしてこれらの PG を介して LPS が mφ 自身の細胞遊走活性を増加させることが明らかになった。その分子機構として、PGD₂ は DP2 受容体を介して細胞骨格系を直接的に活性化して細胞遊走をひきおこし、PGE₂ は EP2/EP4 を活性化し MCP-1 の産生を誘導し、PGD₂ の細胞遊走活性化に遅れて MCP-1 による細胞遊走をひきおこすことが示唆された。さらに、PGE₂ は PKA 依存性の経路を介して iNOS 発現を誘導して NO 産生を増加させるが、これは消化管筋層常在型 mφ においても確認され、消化管筋層常在型 mφ では産生された NO は異物の侵襲に対する自然免疫機能としてはたらくだけでなく、周囲の消化管平滑筋細胞にも作用して消化管運動機能を低下させることが示唆された。

感染などの生体侵襲に対する初期反応において、mφ から産生された PGD₂ や PGE₂ は情報伝達物質として機能し、炎症部周辺の細胞に拡散して mφ をはじめとする免疫担当細胞の侵襲部位への集約と細胞内消化機構の活性化を通し自然免疫機構を活性化させる可能性が考えられた。この知見は敗血性ショックなどの LPS に起因する過剰な免疫応答に対し、PG が新たな治療の標的となりうることを示唆している。