

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田島 剛

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

マクロファージは侵入してきた細菌などの異物を認識して貪食や消化を行い自然免疫系の中心を担うと同時に、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と考えられている。敗血症などで体内へ細菌が侵入した際には、TLRを介してマクロファージが活性化され、炎症性サイトカインや一酸化窒素(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。このときLPS刺激によってマクロファージから産生されるPGD₂やPGE₂がマクロファージ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。本研究は、マクロファージがLPSによって活性化する過程において、PGD₂やPGE₂が細胞遊走能および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て行われた。

1. マクロファージのPGD₂、PGE₂産生能と発現する受容体

LPS刺激により、RAW264.7細胞でのCOX-2およびPGD₂合成酵素H-PGDS、PGE₂合成酵素mPGES-1のmRNA発現の増加と、培養上清中のPGD₂、PGE₂量の増加が観察された。RAW264.7細胞ではDP2およびEP2、EP3、EP4受容体が、C57BL/6Jマウス腹腔マクロファージではDP1、DP2およびEP1、EP2、EP3、EP4受容体のmRNAが発現していた。

2. PGによるマクロファージの細胞遊走活性化機構

RAW264.7細胞でMigration assayをおこない、マクロファージのLPS刺激に対する遊走とPGの関与の有無を検討した。LPS刺激後に遊走細胞数が増加し、これがCOX-2阻害薬CAY10404の前処置で減少したことから、LPS刺激に対する遊走にはPGが関与することが示唆された。DP2アゴニストDK-PGD₂およびEP4アゴニストONO-AE1-329刺激に対する遊走が観察された。また、H-PGDS KOあるいはDP2 KOマウスの腹腔マクロファージではLPS刺激に対する遊走が野生型に比べ低下していた。よってマクロファージにおける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。DP2およびEP4刺激により、RAW264.7細胞前縁部でのlamellipodiaやfilopodia形成が観察された。また、DP2およびEP4刺激による遊走は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MCP-1のmRNA発現量が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刺激によるマクロファージの遊走活性化経路にはマクロファージ自身が産生したPGD₂およびPGE₂が関与しており、DP2受容体およびEP4受容体を介し、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 依存性の経路が存在することが示唆された。

3. PG によるマクロファージの NO 産生活活化機構

LPS 刺激により、RAW264.7 細胞の iNOS mRNA 発現量、蛋白発現量と NO 産生量が時間依存的に増加した。iNOS 発現は CAY10404 前処置により抑制された。PGE₂、EP2 アゴニスト ONO-AE1-248 および ONO-AE1-329 刺激により iNOS mRNA 発現が増加した。DP1 アゴニスト BW245C および DK-PGD₂ 刺激では iNOS 発現の増加はみられず、H-PGDS KO、L-PGDS KO ならびに DP1、DP2 KO マウス腹腔マクロファージでは LPS 刺激に対する iNOS 発現が野生型と同程度みられた。このことから、LPS 刺激により誘導される iNOS 誘導には COX-2 由来の 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。膜透過性 cAMP アナログ db-cAMP および cAMP 合成促進薬 forskolin 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 を前処置すると LPS 刺激による iNOS mRNA 発現が濃度依存的に減少した。このことから LPS 刺激により誘導される iNOS 合成には cAMP および PKA が重要であることが示唆された。

4. PG によるマウス回腸常在型マクロファージの NO 産生誘導

C57BL/6J (B6) マウスおよび M-CSF を欠損し常在型マクロファージを欠く *op/op* マウスの回腸から筋層標本を作成し LPS で刺激したところ、B6 マウスでは calbachol 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が、*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。免疫染色により、B6 マウス回腸常在型マクロファージが LPS 刺激によって COX-2 および iNOS を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マクロファージが産生する NO が重要であることが示唆された。

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 発現の減少は CAY10404 の前処置により回復した。EP2、EP4 刺激により iNOS mRNA 発現量が増加した。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 calbachol に対する収縮抑制は回復した。以上のことから、回腸常在型マクロファージにおいても LPS 刺激により COX-2 を介して産生された PGE₂ が EP2/EP4 受容体を介して PKA 依存性の経路で iNOS mRNA 発現を誘導する機構が存在することが示唆された。

以上のように本研究は、感染などの生体侵襲に対する初期反応において、マクロファージから産生された PGD₂ や PGE₂ が、炎症部周辺の細胞に拡散してマクロファージ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情報伝達物質として機能していることを明らかにしたものであり、学術上寄与するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位に値するものと判断した。