

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻  
平成20年度博士課程 入学  
氏名 綾部 信哉  
指導教員名 尾崎 博

論文題目 肝および肺の線維芽細胞活性化におけるプロスタグランジンの役割に関する研究

### 【緒言】

多くの組織に存在する線維芽細胞は、持続的な炎症や障害により異常な活性化が起こると、瘢痕形成や組織の線維化、がんの支持などの病態形成に関与する。肝硬変や特発性肺線維症は、肝臓や肺で線維化が慢性的に継続したのちに起こる進行性線維症の終末状態である。肝臓の線維芽細胞は胆管や中心静脈、門脈周囲に存在しており、肝硬変モデル動物では炎症の初期段階においても組織内で速やかに活性化する。血管収縮性物質に対して強い収縮性を示すことから、線維芽細胞の収縮が血管径を減少させて肝内圧の上昇を引き起こし、肝硬変やそれに続発する門脈圧亢進症の病態形成に関与していると言われている。肺では、線維芽細胞は肺の間質に存在し、基底膜が破壊されるような激しい炎症や損傷を受けて活性化する。コラーゲンを始めとした細胞外マトリックスを放出して上皮の正常な修復機構を阻害し、肺胞構造を崩壊させる。

アラキドン酸を前駆物質とするプロスタグランジンは、組織の炎症に際して局所的に放出される。PGE<sub>2</sub>はEP1からEP4までの4つの受容体、PGD<sub>2</sub>はDP受容体とCRTH2受容体の2つの受容体に結合するが、それぞれのプロスタグランジンは共通したプロスタン酸骨格を持っていて構造が類似していることから、これら以外の受容体へ結合することも報告されている。7回膜貫通型受容体であるそれぞれの受容体は、異なるGタンパクを介したさまざまな情報伝達経路が報告されており、プロスタグランジンの作用は各組織で多様

である。

肝臓においては、肝細胞や常在型マクロファージであるクッパー細胞などからプロスタグランジンが放出され、肝細胞自身や類洞周辺の肝星細胞に作用することが報告されている。本研究室での先行研究によって、PGD<sub>2</sub>がトロンボキサン受容体である TP 受容体を介して細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、細胞収縮を誘起することが報告されたが、PGD<sub>2</sub>の本来の受容体である DP 受容体を介した作用や、PGE<sub>2</sub>による作用は明らかにされていない。肺においても、上皮細胞やマクロファージからプロスタグランジンが産生され、EP2、EP4 受容体を介して PGE<sub>2</sub>が線維芽細胞の活性を抑制することが報告されている。しかし、PGD<sub>2</sub>が肺の線維芽細胞に及ぼす影響や、その情報伝達経路については報告がない。

これらの背景をふまえ、本研究ではコラーゲンゲルを用いた細胞収縮測定法、および直接 ELISA 法による培養上清中コラーゲン測定法を用いて、肝臓の線維芽細胞の収縮作用、および肺の線維芽細胞のコラーゲン産生作用に対する PGE<sub>2</sub>および PGD<sub>2</sub>の役割を明らかにするとともに、肺線維症モデル動物を用いて、肺線維化に対する PGD<sub>2</sub>の病態生理機能を明らかにすることを目的とした。

### 【結果および考察】

本研究では、まずラット肝臓から線維芽細胞を単離培養した。肝臓の線維芽細胞は、4種類の EP 受容体に加えて、COX や PGE 合成酵素も発現していたことから、線維芽細胞自身も肝臓における PGE<sub>2</sub>産生に関与する可能性が示唆された。この線維芽細胞をコラーゲンゲル上に播種して、ゲル面積を経時的に測定することで細胞収縮力の評価を行った。その結果、線維芽細胞に対して PGE<sub>2</sub>は 0.1–10 μM の濃度で収縮作用を示し、10 μM の高濃度では特に強い収縮作用を示した。この作用は EP3 受容体作動薬でのみ再現され、EP3 受容体作動薬 ONO-AE-248 は 0.1–10 μM の濃度で収縮作用を示した。EP3 受容体作動薬および 1 μM までの PGE<sub>2</sub>による収縮作用は、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇を伴わず、Ca<sup>2+</sup>非依存的な PKC である PKCδ および PKCε を介した経路であることが示唆された。一方で 10 μM PGE<sub>2</sub>は FP 受容体と交叉反応を示し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇を伴うことでより強い細胞収縮を引き起こすことが示唆された。

PGD<sub>2</sub>が肝臓の線維芽細胞に対して、TP 受容体への交叉反応を介した収縮作用を誘起することは既に報告されているが、線維芽細胞に存在する DP 受容体を介した情報伝達経路は明らかになっていなかった。本研究では、血管収縮性物質であるブラジキニンによって誘起された細胞収縮に対する DP 受容体作動薬の作用を検討した。その結果、DP 受容体作動薬 BW245C は 0.1–10 μM の濃度で線維芽細胞の細胞収縮を抑制した。ブラジキニン刺激で誘起される細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は BW245C の前処置によって抑制されたが、完全に抑制することはできなかった。BW245C 刺激によって線維芽細胞内の cAMP 量が増加し、アデニル酸シクラーゼ活性化薬である forskolin や cAMP アナログである dibutyryl-cyclic AMP

(db-cAMP) は BW245C と同様にブラジキニンによって誘起される細胞収縮を抑制した。その一方で、BW245C の場合と同様に forskolin も細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を完全に抑制することはできなかった。このことから、DP 受容体刺激による収縮抑制作用は cAMP を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な経路と、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存的な経路の両方を介した経路であることが示唆された。BW245C による収縮抑制作用は PKA 阻害薬によって解除され、cAMP を介した PKA の活性化が DP 受容体を介した収縮抑制作用に関与する可能性が示唆された。

次に、肺の線維芽細胞のコラーゲン産生における PGE<sub>2</sub> および PGD<sub>2</sub> の役割を検討した。定常状態の線維芽細胞を用いた報告では、PGE<sub>2</sub> は EP2 および EP4 受容体を介してコラーゲン産生を抑制することがすでに報告されている。ヒト胎児肺線維芽細胞株 IMR-90 細胞を用いた検討の結果、肺の線維化を促進する TGF-β の刺激に対しても、PGE<sub>2</sub> はこれらの受容体を介してコラーゲン産生を抑制した。さらに、PGE<sub>2</sub> のみならず PGD<sub>2</sub> も、0.1–10 μM の濃度で線維芽細胞のコラーゲン産生を抑制した。DP 受容体もしくは CRTH2 受容体の作動薬を用いたところ、CRTH2 受容体作動薬の刺激が影響を及ぼさなかったのに対して、DP 受容体作動薬 BW245C は 0.01–1 μM の濃度で TGF-β 刺激によるコラーゲン産生を抑制したことから、PGD<sub>2</sub> の抑制作用は DP 受容体を介した作用であることが示唆された。肝臓の線維芽細胞と同様に、肺の線維芽細胞においても PGD<sub>2</sub> もしくは BW245C の刺激によって細胞内 cAMP 量が増加し、forskolin や db-cAMP は TGF-β によって誘起されるコラーゲン産生を抑制した。DP 受容体刺激による抑制作用は PKA アナログによって再現されたが、PKA 阻害剤では抑制作用が部分的にしか解除されなかった。このことから、PGD<sub>2</sub> によるコラーゲン抑制作用は DP 受容体を介した cAMP 量の上昇による作用と考えられるが、PKA 依存的な経路と非依存的な経路の両方を介している可能性が示唆された。

さらに、肺線維化に対する PGD<sub>2</sub> の病態生理機能を明らかにするため、PGD<sub>2</sub> 合成酵素の 1 つである H-PGDS の欠損マウスを用いてブレオマイシン誘導性肺線維症モデル動物を作製した。その結果、H-PGDS KO マウスでは肺におけるコラーゲン遺伝子の発現量やコラーゲン蓄積量が増加し、線維化が増悪した。肺の線維化に際しては、H-PGDS は上皮細胞や炎症性細胞に発現していたことから、これらの細胞から產生された PGD<sub>2</sub> が病巣に集積した線維芽細胞に作用する可能性が示唆された。その一方で、H-PGDS KO マウスでは線維の蓄積に先立って肺血管の透過性が亢進しており、TNF-α や CCL2 の mRNA 発現量も増加していた。このことから、線維芽細胞に対するコラーゲン産生抑制作用に加えて、血管内皮細胞や炎症性細胞などに対する作用も同時に失われた結果として、H-PGDS KO マウスで肺の線維化が増悪することが示唆された。

### 【結語】

PGD<sub>2</sub> は交叉反応によって TP 受容体を介した肝臓の線維芽細胞収縮を誘起するが、PGE<sub>2</sub> も EP3 受容体を介して収縮を誘起した。高濃度の PGE<sub>2</sub> は、FP 受容体に交叉反応を示すこ

とさらに強力な収縮を誘起した。その一方で、PGE<sub>2</sub>とPGD<sub>2</sub>は、肺の線維芽細胞においてはそれぞれの本来の受容体であるEP2、EP4、およびDP受容体を介して、ともにコラーゲン産生を抑制した。すなわち、肝臓や肺の線維芽細胞に対するPGE<sub>2</sub>やPGD<sub>2</sub>の作用は、プロスタグランジンの種類によるのではなく、作用する組織によって異なることが明らかになった。このような作用の違いは、それぞれの線維芽細胞で活性化されるGタンパク質およびその下流の情報伝達系が、PGE<sub>2</sub>とPGD<sub>2</sub>の間で類似していることに起因すると考えられる。

その一方で、DP受容体は、肝臓の線維芽細胞においてもcAMP-PKAシグナルを活性化させることで細胞収縮を抑制した。また、肺の線維芽細胞においてはFP受容体を介した刺激はコラーゲン産生を促進することが報告されている。本研究も含めたこれらの知見は、線維芽細胞におけるプロスタグランジンの各受容体を介した作用の複雑さが、線維化の病態形成におけるCOX-2の関与をより複雑なものにしている可能性を示している。

さらに、H-PGDS欠損マウスを用いた検討から、H-PGDSから産生されるPGD<sub>2</sub>が線維芽細胞を含めた多くの細胞に作用して肺線維症に抑制的に作用することが示唆され、H-PGDSおよびPGD<sub>2</sub>の作用を明らかにすることが肺線維症の治療薬開発につながるものと考えられた。