

博 士 論 文

マクロファージ細胞において炎症応答を
抑制するシグナル調節機構の解析

伊 藤 政 明

目次

略語	ii
第 1 章 緒言	1
第 2 章 マウスマクロファージJ774細胞におけるプリン作動性シグナルと プロスタグランジンシグナルのクロストークに関する解析	
第 1 節 序論	5
第 2 節 実験方法	9
第 3 節 実験結果	12
第 4 節 考察	20
小括	23
第 3 章 Gq-ホスホリパーゼC-Ca ²⁺ シグナルに対するPGE ₂ シグナルの抑制機構 に関する解析	
第 1 節 序論	25
第 2 節 実験方法	29
第 3 節 実験結果	33
第 4 節 考察	51
総括	57
謝辞	62
参考文献	63

略語表

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた。

AGS	activator of G protein signaling
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ADP	adenosine 5'-diphosphate
AGPC	acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction
AMP	adenosine 5'-monophosphate
BSA	bovine serum albumin
BzATP	benzoylbenzoyl-ATP
cAMP	adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP)
cDNA	complementary DNA
COX	cyclooxygenase
cPLA2	cytosolic phospholipase A2
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	diacylglycerol
dbcAMP	N(6), 2'-O-dibutyryl-adenosine 3',5' cyclic monophosphate
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
ECL	enhanced chemiluminescence
EP receptor	prostaglandin E ₂ G-protein-coupled receptor
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FCS	fetal calf serum
FK	forskolin
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAP	GTPase-activating protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GPCR	G protein-coupled receptor
GTP	guanosine 5'-triphosphate
H89	N-[2-(p-Bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide
HRP	horseradish peroxidase

IBMX	3-isobutyl-1-methyl-xanthine
IgG	immunoglobulin G
IL-8	Interleukin-8
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate
KRH	Krebs Ringer HEPES
MIP-1 α	macrophage inflammatory peptide-1 alpha
MMLV	moloney murine leukemia virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
PCA	perchloric acid
PCR	polymerase chain reaction
PG	prostaglandin
PDE	phosphodiesterase
PIP2	phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PKG	protein kinase G
PLC	phospholipase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PTX	pertussis toxin
PVDF	polyvinylidene difluoride
RGS	regulator of G protein signaling
Ro20-1724	4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline containing Tween 20
TCA	trichloroacetic acid
TP	thromboxane A ₂ receptor
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
Triton X-100	polyoxyethylene (10) octylphenyl ether
TXA ₂	thromboxane A ₂
U73122	1-[6-[[17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione
UDP	Uridine 5'-diphosphate
UTP	Uridine 5'-triphosphate
XAC	N-(2-Aminoethyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]-acetamide hydrochloride

第 1 章 緒言

虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞）あるいは脳血管疾患による死亡率は全体の 30% を占め、悪性新生物の死亡率に匹敵する状況が続いている。これらの疾患の原因は共通して動脈硬化による血管障害であると考えられている。動脈硬化症の発症・進展には、いわゆるメタボリックシンドロームが関与するが、その基盤病態として近年、全身の軽度の炎症反応が重要であると認識されるようになってきた（Dandona et al., 2004）。

炎症は、自然免疫系担当細胞や T 細胞が組織に集積して血管拡張や血管透過性の亢進を引き起こし、腫脹や疼痛をもたらした状態であり、全身性には発熱も起こす。炎症反応は、各種血球系細胞（血小板、単球／マクロファージ、リンパ球など）が血管内皮細胞と相互に関連し、血管床を舞台として起こる傷害に対する防御機構であり、その制御には、免疫細胞から産生される多くのケミカルメディエーターであるヒスタミンや、ロイコトリエン、プロスタグランジンなどが関与する（Samuelsson et al., 1987）。また、サイトカインはこれらの免疫担当細胞の増員と活性化の制御をおこなうと同時に、炎症の性質を決定する。例えばインターフェロン（IFN） γ が主体である Th1 型の免疫応答ではマクロファージを中心とした炎症、すなわち遅延型過敏症を起こし、Th2 型の応答ではインターロイキン（IL）-4 や IL-5 が主体であれば好酸球性炎症である花粉症などのアレルギーを起こす。さらに IL-17 や IL-21 が主体となる Th17 型応答では好中球を中心とした炎症となる（Charles et al., 2008）。炎症は病原体の排除には必須の応答であるが、自己に反応したり、暴走したりすると身体に有害な疾患に繋がる。慢性炎症の場合は絶えず自然免疫系細胞が供給され、かつ B 細胞からの抗体産生や T 細胞からのサイトカインがこれを活性化し続ける。また、T 細胞による直接的な細胞障害も認められる。

炎症を促進するサイトカインには主にマクロファージや樹状細胞から産生されるものと、ヘルパー T 細胞などのリンパ球から産生されるものがある。感染時には主に菌体外毒素（LPS）などの微生物成分により刺激を受けたマクロファージなどから炎症性サイトカインやケモカインが放出され、好中球を感染部位にリクルートする。また、主要なケミカルメディエーターであるプロスタグランジン E_2 （PGE₂）はシクロオキシゲナーゼの主要な代謝産物の 1 つであり、炎症組織に蓄積し多様な生理応答を示す（Narumiya S, 2007）。近年の臨床における知見から、心筋梗塞や脳梗塞は動脈硬化巣のプラークが不安定化して破裂することが原因となるが、プラークが破裂しやすい人では動脈硬化巣に浸潤しているマクロファージにおいて PGE₂ の受容体である EP4

遺伝子発現量の増加ならびに PGE_2 産生の亢進が起こっていることが報告された (Cipollone et al. 2005)。すなわち、マクロファージにおける PGE_2 シグナルの増強が虚血性疾患発症の引き金となっていることを示唆している。

一方、異物の排除など一定の役割を果たした後は、炎症反応が収束する必要がある、炎症を負に制御する分子も重要である。IL-10 は抗炎症性サイトカインとして知られ、Th2 細胞や制御性 T 細胞から産生される。この IL-10 には、活性化マクロファージや樹状細胞からの $\text{TNF}\alpha$ 産生や IL-12、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制する作用がある (Butcher et al., 2005)。また $\text{TGF-}\beta$ も免疫抑制性サイトカインとして知られている。 $\text{TGF-}\beta$ は T 細胞をはじめ全身の多くの細胞から産生され、免疫寛容に働く。その作用には IL-2 や $\text{IFN}\gamma$ などのサイトカインの産生抑制が重要である (Bommireddy et al., 1996)。その他、IL-27 や IL-35 など免疫や炎症を抑制するサイトカインとして知られるようになった (Villarino et al., 2006; Collison et al., 2007)。

しかし、炎症性と抗炎症性の物質的な境は、それほど明確ではない。すなわち、 $\text{TGF-}\beta$ や PGE_2 はある状態では炎症促進に、またある状態では抗炎症性に働く。IL-10 も炎症促進に働く場合も報告されている (Sharif et al., 2004)。つまり状況に応じて 1 つの分子が炎症促進と抗炎症とに働く。実際、 PGE_2 は上記したように急性炎症応答の主要なメディエーターで LPS による炎症性反応を媒介するが、その一方で免疫系の反応、特にマクロファージ機能発現においては抑制的に作用することが知られている (Jing et al., 2003; Takayama et al., 2002)。アポトーシスは炎症を伴わない細胞死として知られているが、アポトーシス細胞を貪食したマクロファージは $\text{TGF-}\beta$ とともに PGE_2 を産生し、自らの炎症性サイトカインの放出を抑制して細胞を処理することが報告されている (Fadok et al., 1998)。さらに、 PGE_2 は気道のアレルギー疾患性炎症の軽減 (Torres et al., 2015)、デキストラン硫酸誘発大腸炎の軽減 (Kabashima et al., 2002)、脳梗塞に対する保護効果 (McCullough et al., 2004) など報告されている。また Th2 応答への誘導、維持により、IL-1 β 、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-12 など Th1 サイトカイン産生抑制、IL-10 などの Th2 サイトカイン産生促進などももたらす (MacKenzie et al., 2013)。これらの様々な因子が複雑に免疫系を調整する事で、宿主を守って感染から隔て、損傷部分の修復を促進するための免疫応答の範囲を決定し、免疫系のホメオスタシスを維持している。しかし、この正と負の応答のバランスがうまく調節されないと、慢性的な炎症が起こることになる。すなわち慢性炎症には、環境因子、さまざまな免疫細胞小集団、さらに細胞のセンサーと細胞が作り出すメディエーターの相互作用などの多数の動的性質が関わっている。

こうした複雑な調節過程に取り組むため、炎症応答の中心的な役割を果たすマクロファージに着目した。マクロファージは主要な自然免疫担当細胞の 1 つであり、その

食作用により殺菌、抗体の産生のための抗原提示を行うなど、重要な恒常性維持機構の一角を担っている。しかし、過剰な活性化などのマクロファージ機能の異常は慢性的な炎症の原因となる。例えば、血管壁に蓄積した変性コレステロールが処理しきれないほど多く存在する場合、血管壁の下に潜りこんだまま泡沫化し、その場に沈着することによりアテローム性動脈硬化が進行する (Cipollone et al. 2005)。また、炎症性マクロファージの脂肪組織への集積が肥満によるインスリン抵抗性の惹起をもたらすことが広く知られるようになった。(Kanda et al., 2006)。その他、腫瘍の形成・転移など多くの病気に関わっている (Laoui et al., 2014)。

炎症巣では、侵害刺激により上記した様な各種ケミカルメディエーターやサイトカインが遊離するとともに組織より大量のアデノシン三リン酸 (ATP) が放出されている。ATP は「生体のエネルギー通貨」と言われ、あらゆる生物において、エネルギーを要する生物体の化学反応過程には必ず使用される。近年、この ATP が様々なストレス応答、すなわち炎症反応やシェアストレス、細胞障害等により大量に細胞外に放出され、エネルギー物質としての側面以外のさまざまな生理応答を引き起こすことが広く知られている (Abbracchio et al., 1998; Burnstock G., 2006)。細胞外には ATP 以外にもウリジン三リン酸 (UTP) などが放出され、これらは細胞外ヌクレオチドと称される。また、細胞外には多様なヌクレオチド分解酵素群 (ecto-nucleotidases) が存在しており、三リン酸体が二リン酸体、一リン酸体あるいはヌクレオシドに速やかに分解代謝される (Zimmermann et al., 2012)。これは、ATP や UTP といった細胞外ヌクレオチド分子の生理応答が終結するとともに、ADP やアデノシン、UDP など新たなシグナリング分子の生成による多様な情報伝達の変換を意味する。このように細胞外ヌクレオチドは多種多様な情報伝達を行っていると考えられるようになってきた。細胞外ヌクレオチドの作用を媒介する受容体は、イオンチャネル型受容体の P2X 受容体と GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) 共役型受容体の P2Y に大別され、さらにアデノシンの作用を媒介する P1 受容体もある (Burnstock G., 2007; Communi et al., 1997; Surprenant et al., 1996)。それらの多様な受容体を介する情報伝達系はプリン作動性シグナルと称される。ATP は肥満細胞やマクロファージ、中枢神経系においてはミクログリアの化学遊走を引き起こすことが知られている。ミクログリアにおいては、細胞外 ATP は P2Y₁₂ を介して、百日咳毒素感受性経路の活性化により ATP 濃度勾配に向かって化学遊走するメカニズムが報告されている (Honda et al. 2001)。さらに、ごく最近、脳神経細胞傷害時には傷害細胞より UDP が放出され、それがプリン受容体 P2Y₆ を介してミクログリアの食作用を活性化して脳内の不要物を片付けることが報告され、脳神経系の修復機構へのプリン作動性シグナルの関与も示唆されている (Koizumi et al., 2007)。また、単球において UDP が P2Y₆ を介して炎症性サイトカインの産生・分

泌を亢進することが報告され、調節因子として益々注目されている(Cox et al., 2005)。さらに、ATP 分子には、その細胞外分解酵素によって ADP やアデノシンに代謝されることにより、アデノシン受容体である P1 受容体を含む他の受容体を介して、血小板凝集や血管径の調節など広範な生理反応を惹起するという情報転換機構が存在している (Matsuoka et al., 2002)。しかしながら、炎症反応において多彩な役割を果たすマクロファージとその機能調節における ATP をはじめとする細胞外ヌクレオチドの影響については十分に解明されておらず、マクロファージにおけるプリン作動性シグナルの解明は、循環系をはじめ慢性炎症を基盤とする各種疾患の原因究明につながる重要な課題であると考えられる。

以上のように炎症組織等においては細胞外ヌクレオチドとともにプロスタノイドのような種々のケミカルメディエーターも放出されるため、病巣には様々な制御因子が一堂に会していることが想定され、それらが相互に影響し合い細胞障害の初期応答因子として働くと考えられるが、それらの相互作用について着目した報告は少なく不明な点が多い。そこで本研究では、第 2 章においてマクロファージを取り巻くプリン作動性シグナル伝達を明らかにし、炎症病態におけるマクロファージ機能制御に関わるプリン作動性シグナルの役割について解析した。またその過程で、プリン作動性シグナルと PGE₂ シグナルの相互作用が認められたことから、第 3 章では、細胞内シグナル伝達機構を中心にその調節機構を解析した。

第2章 マウスマクロファージJ774細胞におけるプリン作動性シグナルとプロスタグランジンシグナルのクロストークに関する解析

第1節 序論

マクロファージは、細菌やウイルス感染細胞の貪食や障害を受けた組織の貪食により、生体の感染防御や組織修復に重要な働きをしている。マクロファージ機能は種々のサイトカイン、ケモカイン、ケミカルメディエーターによって調節を受ける。マクロファージは、細菌のエンドトキシンやアラキドン酸代謝物であるエイコサノイド、そしてヌクレオチドのような危険シグナルであり炎症促進性でもあるシグナルを認識する様々な受容体を発現している (Jacob et al., 2013)。これらの受容体間のクロストークは、細胞内シグナル伝達機構の異なるステップにおいて、相乗的なあるいは拮抗的な相互作用を示す。例えば、リポポリサッカライド (LPS) によるインターロイキン 1β の産生は、細胞外ヌクレオチド受容体である $P2X_7$ 受容体を介するプリン作動性シグナルが必要である (Di Virgilio F., 2001; Ferrari et al., 2006)。

細胞外ヌクレオチドは、神経伝達物質として機能する事や血管張力や機械的刺激の情報変換、自律神経機能を調節するなど、重要な細胞外シグナル伝達分子として認識されるようになった (Abbracchio et al., 1998; Burnstock G., 2006; Ralevic et al., 1998)。例えば、アデノシン三リン酸 (ATP) は細胞質内に高濃度 (5 mM 程度) 存在し、組織障害等により細胞外スペースに放出され、細胞外局所でその濃度は mM オーダーに達するとも考えられている (Burnstock G., 2006; Di Virgilio F., 2007)。さらに、ATP だけでなく、ウリジン二リン酸 (UDP) やその前駆体であるウリジン三リン酸 (UTP) も細胞外に放出されることが、*in vivo* 及び *in vivo* の実験系で示されている (Koizumi et al. 2007)。したがって、細胞外ヌクレオチドは生理的応答の調節において、急性炎症の初期あるいはその進展に重要な役割を果たすと考えられている。細胞外におけるアデニンヌクレオチドやウリジンヌクレオチドの集積は、それらの受容体であるプリン作動性受容体 ($P2$ 受容体) の活性化を介して単球やマクロファージ、リンパ球といった免疫担当細胞の活性化を引き起こす (Hu et al., 1998; Humphreys et al., 1998; Marcet et al., 2007; Stokes et al., 2007;)。プリン受容体は、イオンチャネル型受容体の $P2X$ 受容体と G タンパク質共役型受容体の $P2Y$ に大別される。さらに $P2X$ 受容体は、7 種類のサブタイプ ($P2X_1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$) が同定され (表 1) (Surprenant et al., 1996; Valera et al., 1994)、 $P2Y$ 受容体は、8 種類のサブタイ

プ (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) がクローニングされ同定されている (表 2) (Burnstock G., 2007; Communi et al., 1997)。

表 1. P2X 受容体サブタイプとその特徴

Receptor		Main Distribution	Agonists	Antagonists
P2X1	ion channel	Smooth muscle, platelets, cerebellum, dorsal horn spinal neurons	BzATP > ATP, 2-MeSATP α, β -MeATP	NF 449 > TNP-ATP
P2X2		Smooth muscle, brain, pancreas, retina, chromaffin cells, autonomic and sensory ganglia	ATP, 2-MeSATP \geq 2-MeSATP $\gg \alpha, \beta$ -MeATP	RB2 > PPADS > Suramin
P2X3		Nociceptive sensory neurons some sympathetic neurons	ATP, 2-MeSATP $\geq \alpha, \beta$ -MeATP	TNP-ATP > A317491 > PPADS
P2X4		[Ca ²⁺] _i ↑ [Na ⁺] _i ↑	ATP $\gg \alpha, \beta$ -MeATP Ivermectin (potentiates)	5-BDBD \gg TNP-ATP, PPADS
P2X5		[K ⁺] _i ↑	ATP γ S, ATP $\gg \alpha, \beta$ -MeATP	BBG > PPADS, Suramin
P2X6		Brain, motor neurons in spinal cord	2MeSATP \geq ATP \gg 2MeSATP	—
P2X7		Macrophages, mast cells, microglia, pancreas, skin, endocrine organs	BzATP > ATP \geq 2-MeSATP	AZ10606120, KN 62, BBG

表 2. P2Y 受容体サブタイプとその特徴

Receptor	G protein	function	Main Distribution	Agonists	Antagonists
P2Y1	G _{q/11}	[Ca ²⁺] _i ↑	Brain, epithelial and endothelial cells, platelets, immune cells, osteoclasts	MRS2365 > 2-MeSADP \gg ADP	MRS 2500 > MRS 2279 > MRS 2179
P2Y2			Immune cells, epithelial and endothelial cells, kidney tubules, osteoblasts	UTP, MRS 2698 \geq ATP	AR-C 126313 > Suramin > RB2
P2Y4			Endothelial cells, placenta	UTP \geq ATP > 2MeSATP	RB2 > Suramin
P2Y6			Macrophages, microglia, T-cell Airway and intestinal epithelial cells,	MRS 2693 > UDP > UTP \gg ATP	MRS 2578 > RB2, PPADS
P2Y11	G _{q11} /G _s	[Ca ²⁺] _i ↑ cAMP ↑	Spleen, intestine, granulocytes	ATP γ S > ARC 67085MX \geq ATP	NF 157 > Suramin > RB2
P2Y12	G _{i/o}	cAMP ↓	Platelets, brain (glial cells), microglial cells	2MeS ADP > ADP > ADP β S	AZD 6140 > INS 50589 > RB2
P2Y13			Spleen, brain, lymph nodes, bone marrow	ADP = 2-MeSADP > ATP	ARC 67085 > MRS 2211
P2Y14			Placenta, mast cells, adipose tissue, stomach, intestine,	MRS 2690 > UDP, UDPglucose > UDP-galactose	PPTN

様々な P2 受容体サブタイプがヌクレオチドによる炎症の初期応答に寄与すると考えられている。例えば、細胞外 ATP はマクロファージ細胞の P2X₇ 受容体を介してカスパーゼ 1 の活性化によりインターロイキン 1 β の放出を促進し、NO 合成を増加させるなどして催炎症性の応答を引き起こす (Brough et al., 2003; Kahlenberg et al.,

2005)。単球においては、UDP が G タンパク質共役型受容体である P2Y₆ 受容体を活性化し白血球走化因子であるインターロイキン 8 の放出を促進する (Warny et al., 2001)。したがって、免疫担当細胞のプリン作動性シグナルの制御は、炎症性疾患に対して有望な治療標的となる可能性が考えられる。

組織障害を起こした部位では、これらのヌクレオチド関連物質に加えて、様々なケミカルメディエーターの蓄積が起こっている。プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、最も重要なケミカルメディエーターの 1 つであり、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ経路により産生され、炎症性部位で急速にその濃度が上昇する (図. 1) (Ushikubi et al., 2000)。

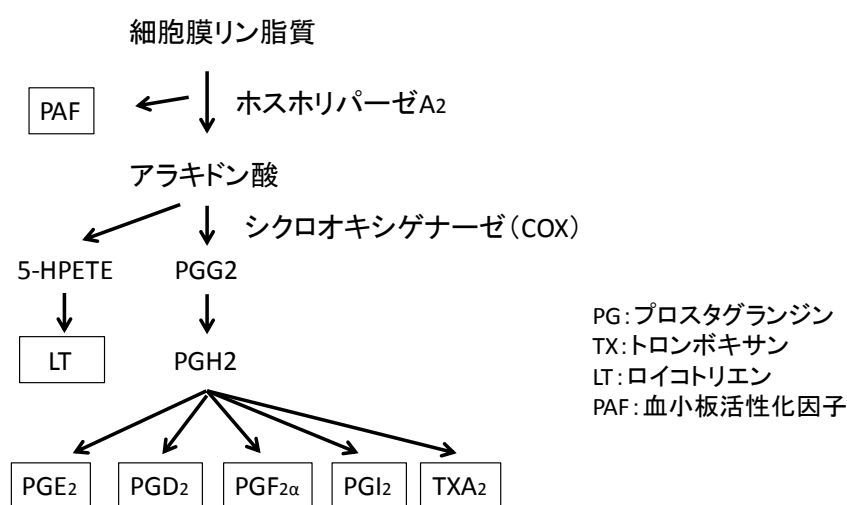


図 1. アラキドン酸カスケード

PGE₂ の生体における生物学的半減期は極めて短いため、主に産生局所で作用して生体の恒常性維持や疾患の病態形成に働くと考えられている。PGE₂ は発熱や痛覚過敏など様々な炎症応答を媒介している (Sugimoto et al., 2007)。一方、この PGE₂ が抗炎症性メディエーターとして作用するというエビデンスが、特に免疫系細胞で、増加してきている。さらに、PGE₂ は、腫瘍壊死因子 (TNF α)、インターロイキン 12 (Iwasaki et al., 2003; Ratcliffe et al., 2007)、種々のケモカインの発現を抑制し、マクロファージの炎症応答による活性化を抑制する事が報告されている (Jing et al., 2003; Takayama et al., 2002)。したがって、炎症過程において細胞ヌクレオチドによるシグナルもまた、PGE₂ により修飾される可能性が考えられる (図. 2)。

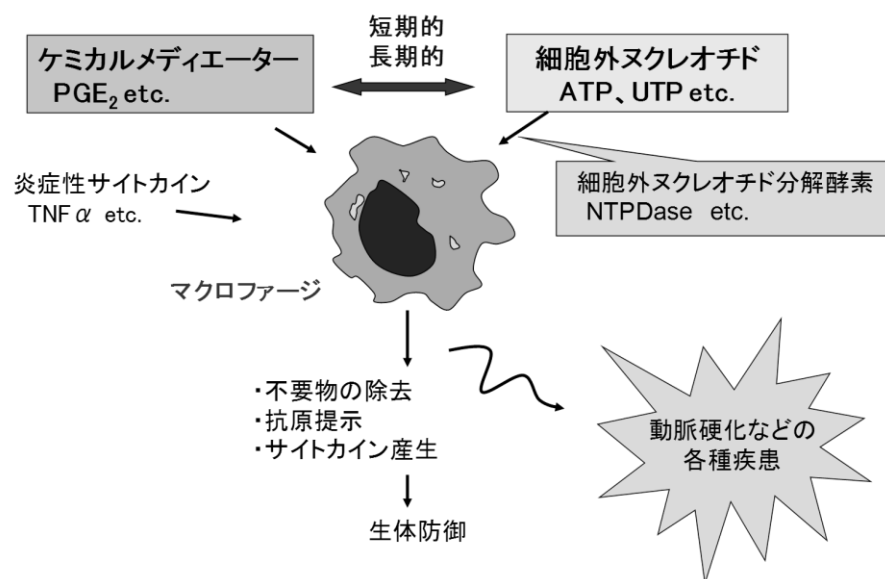


図 2. 炎症巣におけるマクロファージ機能調節におけるケミカルメディエーターと細胞外ヌクレオチドの相互作用

マクロファージは不要物の除去、抗原提示、サイトカイン産生などを介して生体防御に重要な働きをしているが、一方でその過剰な活性化は、炎症を基盤とする様々な疾患の原因にもなる。マクロファージ機能を調節する因子としては様々なものが知られているが、本研究では細胞外ヌクレオチドと主要なケミカルメディエーターであるプロスタグランジン E_2 に注目し、それらが炎症部位で相互作用により、マクロファージ機能調節を行っているという仮説を立てた。

しかし、悪玉・善玉の二面性を有する PGE_2 がプリン作動性シグナルに対してどのような影響を及ぼすか、その正確な役割は明らかにされていない。本章では、マクロファージを取り巻くプリン作動性シグナル伝達を明らかにし、炎症病態におけるマクロファージ機能制御に関わるプリン作動性シグナルの役割について解析した。さらに、マクロファージ J774 細胞におけるプリン作動性シグナルに対する PGE_2 シグナルの影響を解析した。

第 2 節 実験方法

2-1 実験材料

プロスタグランジン (PG) E₂ は、小野薬品工業(株) (大阪) より供与いただいた。Adenosine 5'-triphosphate (ATP)、uridine 5'-diphosphate (UDP)、benzoylbenzoyl-ATP (Bz-ATP)、U73122、Ivermectin は、Sigma Aldrich Japan より購入した。Fura 2-AM は Dojindo より購入した。PTX はフナコシより購入した。SYBR premix EX Taq、ランダムプライマー及び RNase 阻害剤はタカラバイオより購入した。moloney murine leukemia virus (MMLV)及び RNase free DNase はインビトロジェンより購入した。その他の試薬については市販の特級試薬あるいはそれに準ずるものを用いた。

2-2 細胞培養

マウスマクロファージ由来 J774.1 細胞 (J774 細胞) は、RIKEN BRC 細胞バンクより入手し、RPMI1640 培地に 10% fetal calf serum (FCS)及び penicillin 100 U/ml、streptomycin 100 µg/ml を添加し、100 mm ペトリディッシュを用いて 5% CO₂、37 °C で培養した。

2-3 遺伝子発現量解析

Total RNA は、6 well plate に培養した J774 細胞から Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC)法により抽出した ((Chomczynski and Sacchi, 1987))。cDNA の合成は、この total RNA 1 µg を鋳型として、random primer 1 µl、滅菌水 3 µl を混合し、95°C で 2 分間処理した後に 4°C で冷却した。続いてこのサンプルに 5 x RT buffer 2 µl、5 mM dNTPs mixture 1 µl、100 mM dithiothreitol 1 µL、RNase inhibitor (40 units/ml) 0.5 µl、moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (100 units/ml) 0.5 µl を混合したものを加え、37°C で 60 分間反応させることで行った。さらに、99°C で 5 分間処理することにより酵素を失活させ、氷冷後 -20°C で保存した。用時 20 倍希釈して PCR template とした (Ohkubo et al., 2001)。また、マウス脳より cDNA を作成し、PCR 反応の positive control template として用いた。

PCR 反応は、この cDNA を鋳型として、特異的なプライマーセットを用いて目的とする遺伝子の発現量を解析した。1 cycle の条件は、95°C 10 sec を 1 cycle、95°C 10 sec, 57°C 20 sec, 72°C 20 sec とし 30 cycle 増幅した。PCR 産物は 1.5 %アガロース

ゲルで分離してエチジウムブロマイドで染色後、photo image analyzer (LAS3000; FUJIFILM, Tokyo)で撮影した。また、作成した cDNA を鋳型として SYBR Premix *Ex Taq* II を用いて realtime PCR system (Mx3000P; STRATAGENE, Japan) により、目的とする遺伝子の発現量を測定した。発現遺伝子の相対量は、各サンプルの GAPDH mRNA 発現量を 1000 として算出した。

各プリン受容体に特異的なプライマーは、Genome Net Database サービスにおけるヌクレオチド配列を基に、GENETIX ソフトウェアを用いて設計した。以下に使用したプライマーのシークエンスと予想される PCR 産物の大きさを示した。

target	5'-forward-3'	5'-reverse-3'	products (bp)
P2X1	TCTTCTTCATGAGGCTGAGA	ACTGGTAGATGGGTTTGCAG	296
P2X2	GAATCAGAGTGCAACCCCAA	TCACAGGCCATCTACTTGAG	358
P2X3	AAGTACCGCTGTGTGTCTGA	ATCTAGCCGAGTGAAGGAAT	462
P2X4	TTACCACCTCCTACCTCAAG	CTGCTCGTAGTCTTCCACAT	515
P2X5	ACACACACAATCCATCTCCT	GCTTCATGTTACGAAGG	485
P2X6	TAAGGAGCTGGAGAACCG	TATGTGTTGTCCCAGGTTA	411
P2X7	GAAGACCTGTGAAGTCTCTG	CATGATTCCTCCCTGAACTG	280
P2Y1	CTGATCTTGGGCTGTTGG	GCTGTTGAGACTTGCTAGAC	258
P2Y2	GGTTTATTACTACGCCCGGG	AAGGAGTAGTAGAGGGTGCG	546
P2Y4	CCTCGTCTACTACTATGCTGCC	CCATGATTGTGGAAGTGAAG	347
P2Y6	GTAGTGTGTGGAGTCGTGTG	CTGTAAGAGATCGTGGGGTT	516
P2Y12	CCAAAGTTCCTCAAGAAAAAG	CATTCTACATTGGGGTCTCC	317
GAPDH	TGCTGAGTATGTCGTGGAGT	CATACTTGGCAGGTTTCTCC	493

2-4 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化は蛍光性 Ca^{2+} 指示薬である Fura 2 の蛍光変化を指標として、37°Cにおいて Fluorescence SpectroPhotometer (F-2500 HITACHI) を用いて測定した(Ito and Matsuoka, 2008)。J774 細胞は、培養液のピペッティングで回収し、0.1% bovine serum albumin (BSA) を含む Krebs Ringer HEPES (KRH) buffer (130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 4 mM NaHCO_3 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 11.5 mM glucose, 1.8 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH7.4) に懸濁した。Fura-2 acetoxymethyl ester (AM)を最終濃度 1 μM となるよう添加して 37°Cで 15 分インキュベートすることで細胞内に取り込ませた後、取り込まれなかった fura-2 を洗浄し、 $1\sim 2 \times 10^6$ cells/mL となる様に 0.1% BSA KRH で再懸濁し、室温に静置した。Fura-2 の蛍光強度は、励起波長 340 および 380 nm における蛍光波長 510 nm の変化を経時的に測定し、薬物刺激の影響を観察した。測定の最後に 0.1% Triton X-100 処

理で最大蛍光強度を、また 10 mM EDTA 処理で最小蛍光強度を求め、fura-2 と Ca^{2+} の解離定数を 224 nM として $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を算出した(Grynkiewicz et al., 1985)。

2-5 マクロファージ炎症性タンパク質 (MIP) -1 α 分泌量の測定

48 well plate に培養した J774 細胞を無血清の RPMI1640 培地で 2 回洗浄し、種々の試薬を含む同培地で 1 時間刺激した。その培養液を回収し、300 g で 4°C、5 分間遠心し、上清をサンプルとした。サンプルの MIP-1 α 量は、ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて定量した。また、各 well のタンパク質量を Protein Assay dye (Bio-Rad Laboratories, Tokyo) を用いて測定し、MIP-1 α 分泌量を補正した。

2-6 データ解析

実験結果については平均値 \pm 標準誤差 (S.E.M.) で示した。有意差検定は二群間の比較には Student's t-test を、多重比較には Dunnett's 多重比較法を用い、 P 値は 0.05 より小さい場合に統計的に有意であるとみなした。

第3節 結果

3-1 マウスマクロファージ由来の J774.1 細胞株におけるプリン受容体の発現

マウスマクロファージ由来の J774.1 細胞株（以後、J774 細胞と省略）におけるプリン受容体の遺伝子発現を解析した。RT-PCR の結果から、イオンチャネル型の P2X₄ と P2X₇ 受容体および G タンパク共役型の P2Y₂ と P2Y₆ 受容体の遺伝子発現が認められた（図 3 の A 下段）。また、これら 4 つの受容体遺伝子の **real-time RT-PCR** 解析から、特に P2Y₆ 受容体遺伝子の発現量が他のプリン受容体の 8~10 倍と顕著であることが示された（図 3 の B）。なお、ポジティブコントロールとしてマウス脳より作成した cDNA を鋳型に PCR を行い、用いたプライマーが標的とする各遺伝子配列を特異的に増幅することを確認した（図 3 の A 上段）。

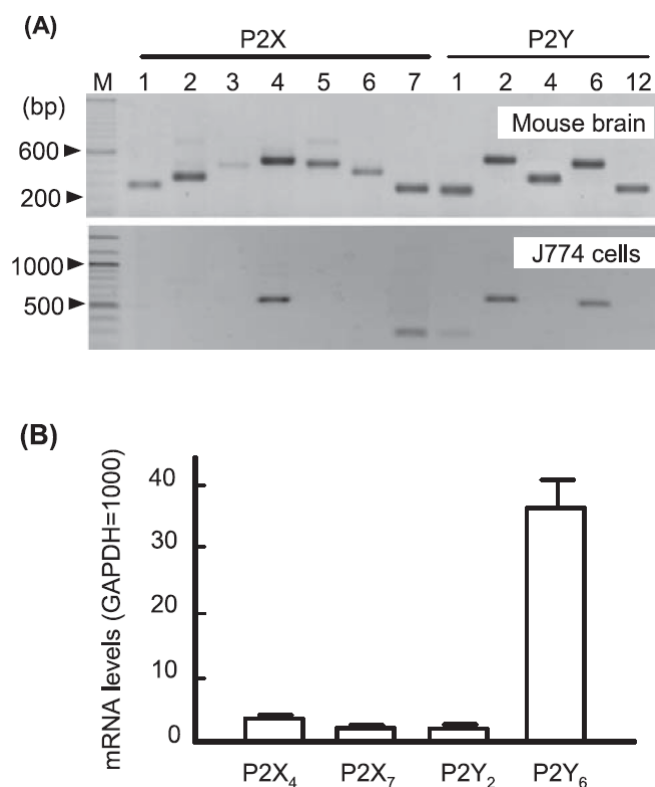


図 3. マウスマクロファージ由来の J774 細胞株におけるプリン受容体遺伝子の発現

A: サブタイプ特異的なプライマーによる RT-PCR 産物のアガロース電気泳動のエチジウムブロマイド染色例を示した。上段はコントロールとしてマウス脳組織の cDNA を用い、下段は J774 細胞から採取した cDNA を用いた。

B: 定量的 PCR による J774 細胞における P2X₄、P2X₇、P2Y₂ 及び P2Y₆ 受容体 mRNA レベルの測定。値は GAPDH mRNA レベルで補正し、平均値 ± 標準誤差で示した (n=3)。

3-2 J774細胞におけるヌクレオチド誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇へのプリン受容体の関与

図3の検討でJ774細胞に発現が認められたプリン受容体の P2X_4 , P2X_7 , P2Y_2 及び P2Y_6 受容体が機能的に発現しているか確認した。何れの受容体も活性化により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を上昇させる事が報告されている。そこで、 Ca^{2+} 蛍光試薬である Fura-2 を取り込ませた J774 細胞におけるヌクレオチドによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化への影響を検討した。その結果、 P2X_4 と P2Y_2 受容体にアゴニスト作用を示す濃度である ATP (10 μM) 刺激により、一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた (図4のA)。一方、 P2X_7 受容体の選択的アゴニストである BzATP (500 μM) は、ゆっくりとした応答ではあるが、持続的で非常に強い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を示した (図4のC)。また、選択的 P2Y_6 受容体アゴニストである UDP (10 μM) 刺激により、強く持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた (図4のB)。次に ATP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇における P2X_4 受容体の関与を明らかにするために、 P2X_4 受容体のアロステリック活性化剤である ivermectin (Khakh et al., 1999) の影響を評価した。ivermectin (5 $\mu\text{g/mL}$) は J774 細胞の basal の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベルには影響せず、前処理により、1、3 及び 10 μM の ATP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を有意に増強した (図4のD、F)。一方、UDP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対しては、ivermectin の増強作用は認められず (図4のE)、むしろ持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇相が抑制されたことから、その増強作用は ATP 応答に選択的であった。したがって、ivermectin は PLC を介する Ca^{2+} 応答には影響せずに、 P2X_4 受容体のインチャネル活性を選択的に修飾することが示された。

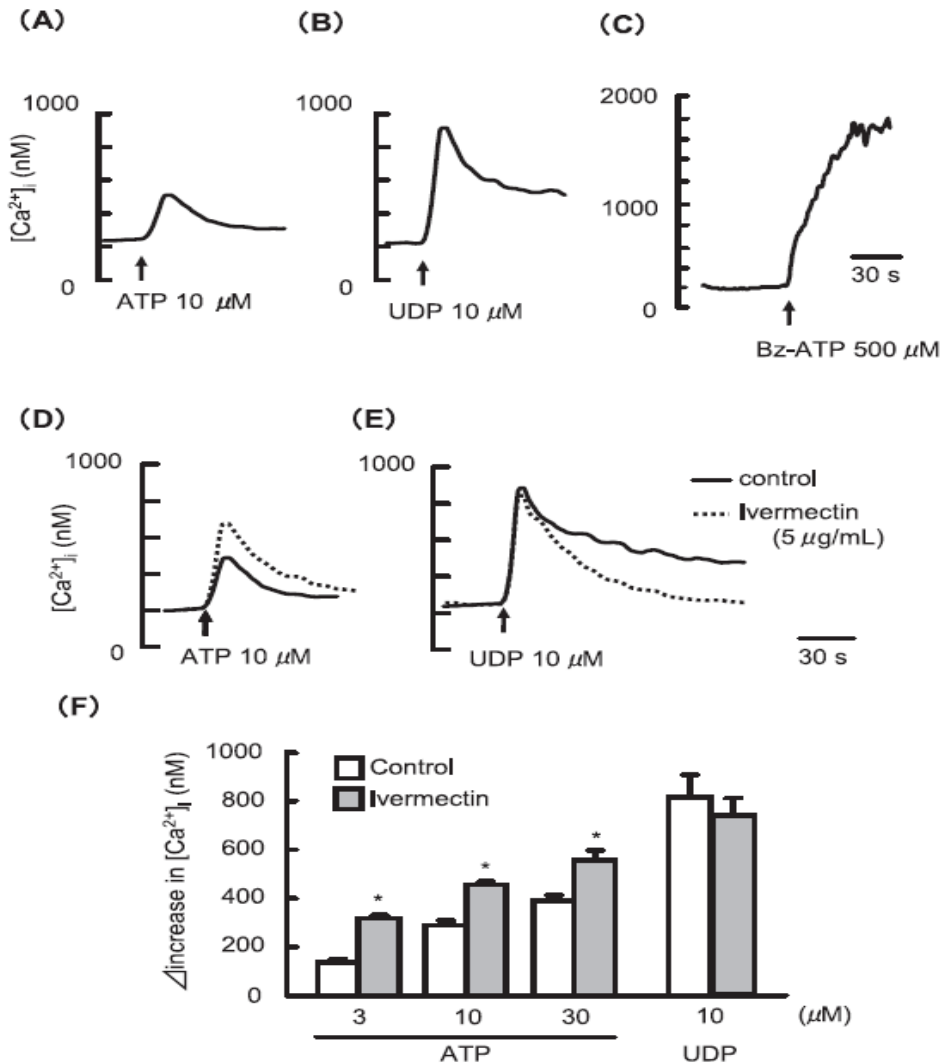


図 4. 細胞外ヌクレオチドの J774 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に対する影響

J774 細胞に Fura-2 をロードし、様々な細胞外ヌクレオチドで刺激した。10 μM ATP (A), 10 μM UDP (B) および 500 μM BzATP (C) 刺激による典型的な $[Ca^{2+}]_i$ 変化のトレースを示した。また、10 μM ATP (D) あるいは 10 μM UDP (E) 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対する ivermectin 前処理 (5 $\mu g/mL$ for 2 min) の影響を示した。Ivermectin 存在下を点線、非存在下を実線で示した。F: (D) と (E) における $[Ca^{2+}]_i$ 変化のピーク値を定量しその結果を平均値 \pm 標準誤差で示した ($n=3$)。* $P < 0.05$ vs コントロール

ATP (10 μM) や UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、phospholipase C (PLC) 阻害剤である U73122 (1 μM) の前処理によって有意に抑制された (図 5)。しかし、BzATP (500 μM) による $[Ca^{2+}]_i$ 応答は U73122 による影響を受けなかった。これらの結果は、ATP (10 μM) および UDP (10 μM) 刺激が、それぞれ P2Y₂ や P2Y₆ 受容体を介して PLC を活性化していること、BzATP が P2X₇ 受容体を介して作用していることを支持するものである。

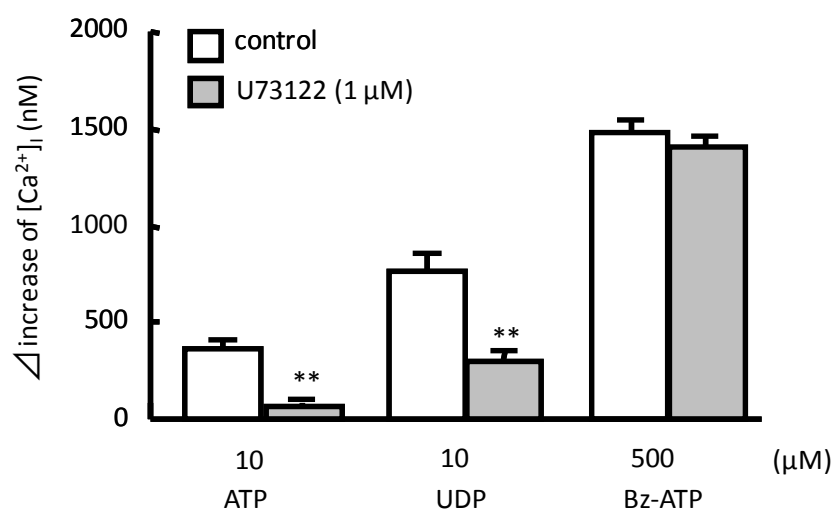


図 5. ATP および UDP による J774 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対する U73122 の影響

PLC 阻害剤の U73122 (1 μ M) の存在下、非存在下における ATP (10 μ M) および UDP (10 μ M) および BzATP (500 μ M) による $[Ca^{2+}]_i$ 変化のピーク値を示した。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した ($n=3$)。** $P<0.01$ vs コントロール

3-3 マクロファージ J774 細胞におけるプリン受容体を介する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対するプロスタグランジン E_2 の影響

プロスタグランジン E_2 (PGE_2) は主要なケミカルメディエーターの一つであり、炎症応答や痛みなど多様な生理応答に深く関与しており、状況に応じて炎症促進にも抗炎症にも働くと考えられている。 PGE_2 は、単独では J774 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ レベルには影響せず、アゴニスト刺激の 1 分前処理により、ATP (10 μ M) および UDP (10 μ M) による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答を強く抑制した (図 6 の A、B)。また、その抑制作用は濃度依存的であり、ATP 及び UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のピークだけでなく、UDP による持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇相も抑制し、 IC_{50} 値は約 30 nM であった (図 6 の D、E)。しかし、 $P2X_7$ 受容体選択的アゴニストである Bz-ATP による反応は PGE_2 で抑制されなかった (図 6 の C)。したがって、 PGE_2 はイオンチャネル型 $P2X_4$ 受容体と G タンパク共役型 $P2Y_2$ および $P2Y_6$ 受容体の機能を共に抑制することが示された。なお、 PGE_2 以外にもアラキドン酸、 PGA_2 、ロイコトリエン (LT) E_4 、 LTF_4 、5-Hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE)、12-HETE、15-HETE、5,12-HETE など、アラキドン酸ならびにその代謝物についても検討したが、明確な作用は認められなかった (データ未掲載)。

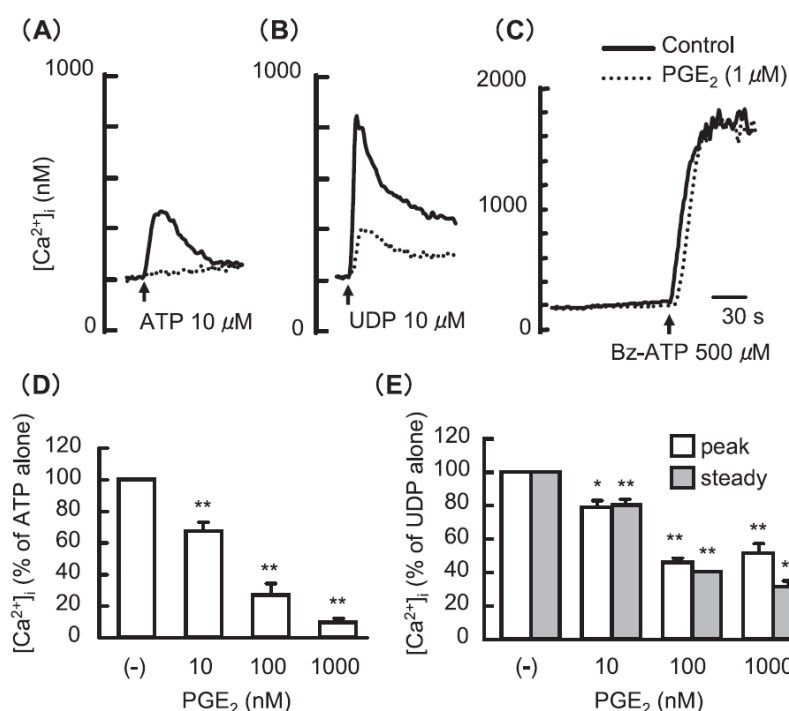


図 6. ATP および UDP による J774 細胞の[Ca²⁺]_i変化に対する PGE₂の影響

PGE₂ (1 μM) の存在下 (点線)、非存在下 (実線) における 10 μM ATP (A) および 10 μM UDP (B) および 500 μM BzATP (C) による[Ca²⁺]_i変化の典型的なトレースを示した。PGE₂はアゴニスト刺激の 1 分前に処理した。ATP (10 μM) による[Ca²⁺]_i変化のピーク値 (D) および UDP (10 μM) による[Ca²⁺]_i変化のピークならびに定常値に対する PGE₂の濃度依存的な影響 (E) を示した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)。**P*<0.05、***P*<0.01 vs コントロール

3-4 ivermectin 感受性の[Ca²⁺]_i上昇に対する PGE₂の影響

先の図 4 の D と F および図 5 の結果から、J774 細胞の 10 μM ATP 誘発[Ca²⁺]_i上昇応答には 2 つの異なる成分、すなわち U73122 感受性の P2Y₂受容体を介するものと、ivermectin 感受性の P2X₄受容体を介するものが含まれる。そこで、P2X₄受容体を介する[Ca²⁺]_i応答を薬理的に分離し、PGE₂の影響を検討した。U73122 (1 μM) 処理により P2Y₂受容体を介する PLC 活性化の経路を遮断した状態で、ivermectin は ATP (10 μM) による[Ca²⁺]_i上昇応答を有意に増強した。PGE₂は、ivermectin によってプライミングされた[Ca²⁺]_i上昇応答を有意に抑制した (図 7. A)。また、ATP (10 μM) 処理により生じる一過性の[Ca²⁺]_i上昇が basal レベルに回復した後、すなわち P2Y₂受容体が脱感作している状態で、ivermectin を処理すると P2X₄受容体を介すると考えられる[Ca²⁺]_i上昇が認められ、PGE₂はこの応答を明確に抑制した (図 7. B)。

これらの結果は、PGE₂が、P2X₄受容体を介する[Ca²⁺]_iシグナルを抑制することを示している。

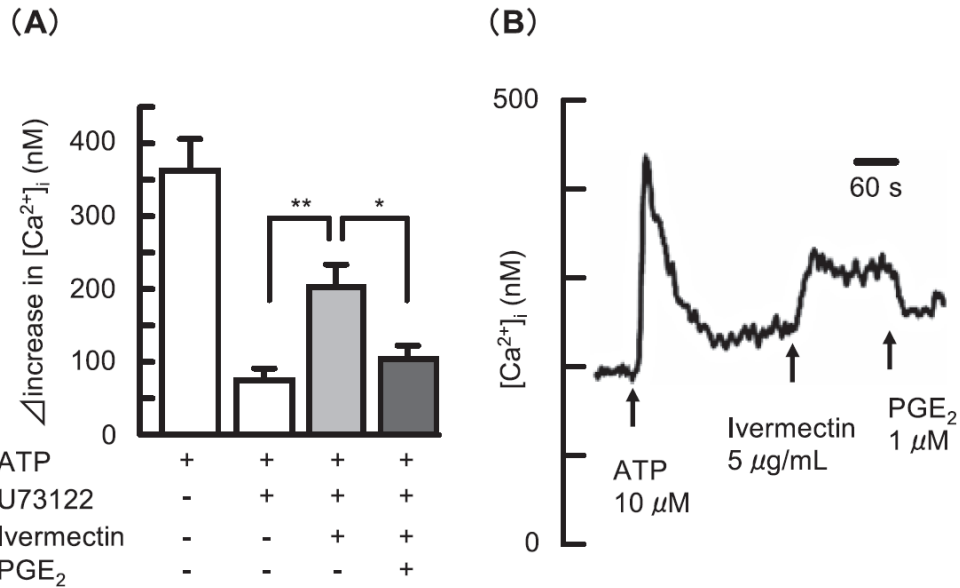


図 7. J774 細胞において ivermectin によって増強される ATP 誘発[Ca²⁺]_i 上昇に対する PGE₂ の影響

A: 細胞を図に示すように U73122 (1 μM)、ivermectin (5 μg/mL) あるいは PGE₂ (1 μM) の 1 分間前処理し、続いて ATP (10 μM) で刺激した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)。
 B: ATP (10 μM) 存在下において ivermectin によって増強される [Ca²⁺]_i 上昇とそれに対する PGE₂ (1 μM) の阻害作用の典型的なトレースを示した。**P*<0.05、***P*<0.01 vs 各群

3-5 マクロファージ J774 細胞による MIP-1α 産生におけるプリン受容体アゴニスト及び PGE₂ の影響

プリン受容体を介する Ca²⁺シグナルに対する PGE₂ の抑制作用が、マクロファージ機能に与える影響について検討するために、J774 細胞からのマクロファージ炎症性タンパク質(MIP)-1α の放出を測定した (図 8)。J774 細胞を細胞外ヌクレオチドで 1 時間刺激した後、培養上清における MIP-1α の量を ELISA 法により測定した。ATP (10 μM)、UDP (10 μM)あるいは BzATP (500 μM) の刺激により、培養上清への MIP-1α の分泌が亢進した。PGE₂ は単独で J774 細胞の basal における MIP-1α 分泌を抑制するとともに、UDP (10 μM)刺激による MIP-1α の分泌亢進に対しても強く抑制した。一方、BzATP (500 μM) 刺激による MIP-1α 分泌応答にはほとんど影響しなかった。すなわち、その程度はそれぞれのプリン受容体アゴニストによる [Ca²⁺]_i 応答に対する PGE₂ の抑制作用の程度と関係していると考えられた。

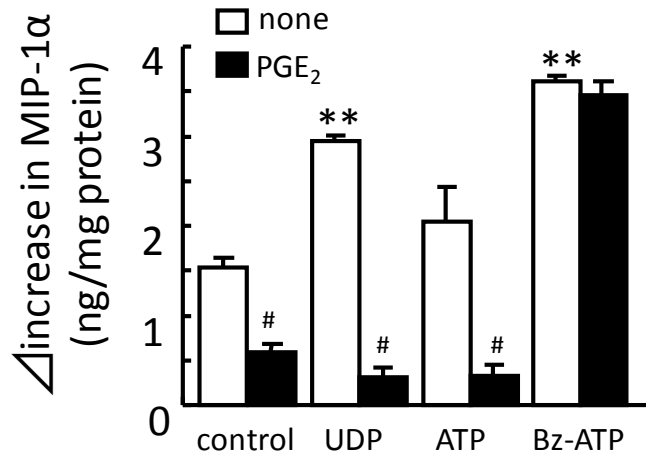


図 8. ATP、UDP 及び BzATP による J774 細胞からの MIP-1α 分泌に対する PGE₂ の影響

細胞は PGE₂ (1μM) の存在下、非存在下において、ATP (10 μM)、UDP (10 μM) あるいは BzATP (500 μM) で 1 時間刺激した。その後、培養上清を回収して ELISA 法により MIP-1α 濃度を測定した。また各 well のタンパク質濃度を求めて、値を補正した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=6)。***P*<0.01 vs コントロール、#*P*<0.05 vs PGE₂ 非存在下の値

3-6 マクロファージ J774 細胞における細胞外ヌクレオチド以外のアゴニスト刺激による [Ca²⁺]_i 上昇に対する PGE₂ の影響

本研究で用いたマクロファージ J774 細胞には UDP 以外にも血小板活性化因子 (PAF) やロイコトリエン (LT) D₄ などに対する Gq 共役型受容体が発現しており、リガンド刺激に対して Ca²⁺ 応答を示した (図 9. 上段)。そこで、これら細胞外ヌクレオチド以外のアゴニスト刺激による [Ca²⁺]_i 上昇に対する PGE₂ の影響を検討した。その結果、PAF や LTD₄ によるコントロールの応答に対して、PGE₂ を 1 分間前処理することにより、それらの Ca²⁺ 応答が顕著に抑制された (図 9. 下段)。また、図 9 の B に示すように、各リガンド応答に対する PGE₂ の抑制作用は用量依存的であった。これらの結果から、PGE₂ はマクロファージにおいて Gq タンパク質と共役する受容体の応答を広く抑制することが示された。

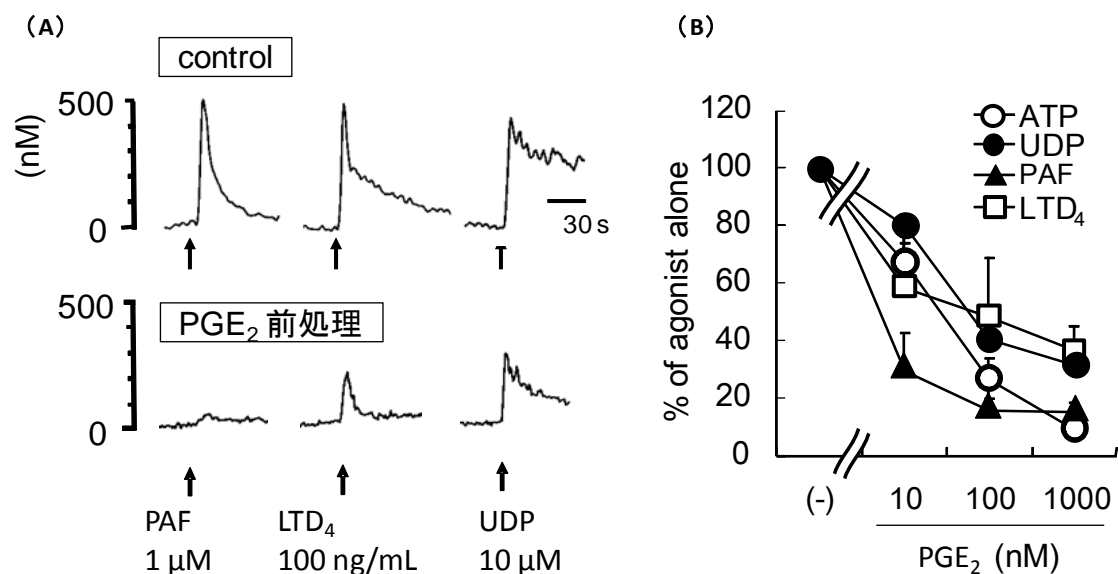


図 9. J774 細胞の細胞外ヌクレオチド以外のアゴニスト刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE₂ の影響

J774 細胞に Fura-2 をロードし、様々なアゴニストで刺激した。1 μ M PAF、100 ng/mL LTD₄ および 10 μ M UDP の刺激による典型的な $[Ca^{2+}]_i$ 変化のトレース ((A)上段)。PGE₂ の 1 分間前処理による、同アゴニスト刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化への影響を示す代表的なトレース ((A)下段)。B: PGE₂ 非存在下における各アゴニストの $[Ca^{2+}]_i$ 変化のピーク値を 100%として、各濃度の PGE₂ による影響を平均値 \pm 標準誤差で示した (n=3~5)。

第 4 節 考察

本章は、マウスマクロファージ細胞におけるプリン作動性シグナルとプロスタノイドシグナル間のクロストークの探索を行った。まず、マウスマクロファージ由来の J774 細胞においてプリン受容体の遺伝子発現を解析し、4 種の異なるサブタイプ、すなわちイオンチャネル型の P2X₄ と P2X₇ 受容体および G タンパク共役型の P2Y₂ と P2Y₆ 受容体の遺伝子発現を同定した。これらの発現プロファイルは、単離された肺胞や末梢のマクロファージ (Bowler et al., 2003; Coutinho-Silva et al., 2005) 及び神経系におけるミクログリア (Inoue et al., 2003) で認められるものと一致していた。本研究ではヌクレオチドアゴニストを用いた薬理的なアプローチにより、遺伝子転写レベルで認められたそれら 4 つのプリン受容体サブタイプが、ヌクレオチドアゴニストによる Ca²⁺ 応答を機能的に媒介していることを明らかにした。すなわち、ATP (10 μ M) による P2Y₂ 受容体刺激および UDP による P2Y₆ 受容体刺激が、PLC 依存的に [Ca²⁺]_i 上昇応答をもたらし、P2X₇ 受容体の活性化剤である BzATP が、PLC 非依存的に強く持続的な [Ca²⁺]_i 上昇を引き起こした。一方、P2X₄ 受容体を介する機能は非常に弱く、P2Y₂ 受容体を介する Ca²⁺ 応答にマスクされていたが、P2X₄ 受容体のアロステリック活性化剤の ivermectin (Khakh et al., 1999) により、ATP 誘発の [Ca²⁺]_i 上昇は増強された。ivermectin の P2X₄ 受容体機能調節への特異性は、UDP による Gq-PLC 依存的な [Ca²⁺]_i 上昇に対しては ivermectin が増強作用を示さないことで確認した。また、U73122 により PLC を介する [Ca²⁺]_i 上昇経路を阻害した後、ATP 誘発の [Ca²⁺]_i 上昇は ivermectin により増強したことから、J774 細胞において P2X₄ 受容体は機能的に発現しており、弱いながらも ATP による [Ca²⁺]_i 上昇に関与していることが明らかにされた。さらに本章では、異なるプリン受容体アゴニストによる Ca²⁺ 応答が、結果的に炎症促進作用ケモカインであるマクロファージ炎症性タンパク質 (MIP)-1 α の放出を引き起こすことが明らかとなった。UDP や BzATP は、J774 細胞からの MIP-1 α の放出を有意に促進したが、ATP 刺激による MIP-1 α の放出はわずかであった。ATP による [Ca²⁺]_i 上昇応答は、一過性で弱いことから、MIP-1 α の放出にはより持続的な [Ca²⁺]_i 上昇が必要である可能性が考えられた。以上の結果から、プリン作動性シグナルは、マクロファージを活性化する可能性が示唆された。

PGE₂ は、発熱 (Ushikubi et al., 1998) や痛覚の過敏 (Minami et al., 2001)、炎症性の滲出 (Yuhki et al., 2004) などをもたらす主要なメディエーターである。しかしながら、PGE₂ は、このマクロファージの活性化を伴う炎症過程において、早期のみならず遅発期においても抑制性の作用を示すことが報告されている。また、PGE₂

は $\text{TNF-}\alpha$ や IL-12 をはじめ様々なケモカインの産生を抑制する (Ikegami et al., 2003; Jing et al., 2003)。近年、ヒトの非代償性肝硬変病態においても、より重症度の高い患者では循環血中の PGE_2 レベルが増大しており、それにより $\text{TNF-}\alpha$ の産生抑制と抗炎症作用を示すサイトカインの IL-10 の増大が生じ、免疫系の抑制をもたらしている可能性が報告された (Alastair et al., 2014)。 PGE_2 によるこれらのサイトカイン抑制作用ならび免疫抑制作用に関する報告は、主に細菌の外毒素であるリポポリサッカライド (LPS) による免疫細胞の活性化に対して示唆されている。しかし、 PGE_2 がプリン作動性シグナルに対してどのように影響するかは明らかにされていない。本研究の結果は、 PGE_2 が、 P2Y_2 や P2Y_6 受容体といった G タンパク質共役受容体のみならず、インチャネル型の P2X_4 対しても強力に抑制することが明らかとなった。これらの知見は、以下の結果により裏付けられる。第一に、 PGE_2 は ATP ($10 \mu\text{M}$) や UDP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を濃度依存的に抑制した。また、 ATP ($10 \mu\text{M}$) や UDP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、 PLC 阻害剤の U73122 によっても抑制されることから、 PGE_2 が、 P2Y_2 や P2Y_6 受容体を介する Gq-PLC 経路を抑制している可能性がある。第二に、 PGE_2 は、 PLC 阻害剤の U73122 存在下において、 ivermectin により増強される ATP ($10 \mu\text{M}$) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇応答を抑制した。すなわち、 Gq-PLC 経路を阻害した状態における ivermectin による ATP 応答の増強成分は、 P2X_4 受容体の活性化に由来すると考えられる。最後に、図 7 で示したように ivermectin により増強される ATP ($10 \mu\text{M}$) 誘発 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE_2 の抑制作用は、 P2Y_2 受容体を介する Ca^{2+} 応答の脱感作後により明確であった。 PGE_2 は、 Bz-ATP による P2X_7 受容体を介する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇応答に対しては影響しなかったことから、マクロファージにおける全てのプリン作動性シグナルを抑制したわけではないと考えられた。この Ca^{2+} 応答における PGE_2 の作用の傾向は、 $\text{MIP-1}\alpha$ 放出に対しても同様に認められた。すなわち、 PGE_2 は、 Bz-ATP による P2X_7 受容体を介する放出応答には影響せずに、 UDP による応答に対しては強く抑制した。これらの結果から、マクロファージ細胞におけるプリン作動性シグナルは、 PGE_2 によって受容体サブタイプ特異的に制御されている可能性が示唆された。

マクロファージ関連細胞は、 P2X_4 、 P2X_7 、 P2Y_2 及び P2Y_6 受容体といった非常に多様なプリン受容体サブタイプを発現しており (Bowler et al., 2003; Coutinho et al., 2005; Hu et al., 1998)、特に P2X_7 受容体の機能解析が進められており、 ATP 誘発の炎症性サイトカイン産生を媒介する事が知られている (Ferrari et al., 1997; Guerra et al., 2003; Labasi et al., 2002; Suh et al., 2001)。本研究の結果から、 PGE_2 は P2X_7 受容体を介する炎症応答にはほとんど影響しなかった。しかし、 P2X_7 受容体以外にも様々な P2 受容体が免疫担当細胞の生理的応答を媒介している。例えば、中

中枢神経系におけるマクロファージ様細胞であるミクログリアでは、P2X₄受容体の活性化が神経因性疼痛の発症に重要な役割を果たした (Tsuda et al., 2003)。さらに、P2Y₆受容体は食慾機能に関与することが報告された (Koizumi et al., 2003)。したがって、J774 細胞で認められた、PGE₂による P2Y₆受容体を介する MIP-1 α 放出の抑制以外にも、他の免疫担当細胞の P2X₄、P2Y₂及び P2Y₆受容体による病態生理学的応答における PGE₂の影響を明らかにすることは重要であると考えられる。

PGE₂の生物活性を媒介する E プロスタノイド受容体 (EP) としては、EP1 から EP4 の 4 つのサブタイプが知られている (Sugimoto et al., 2007)。マクロファージ細胞では主に EP2 と EP4 受容体サブタイプが発現しており、それらは共に Gs タンパク質共役型受容体であり、細胞内 cyclic AMP 濃度上昇を引き起こす (Katsuyama et al., 1998; Sugimoto et al., 2007)。cyclic AMP 依存性シグナルはマクロファージ機能を抑制することが報告されている (Iwasaki et al., 2003; Takayama et al., 2002)。したがって、PGE₂は EP2 あるいは EP4 受容体を介して cyclic AMP シグナル経路を活性化してプリン作動性シグナルを抑制している可能性が考えられた。しかし、cyclic AMP シグナル経路の関与について否定的な知見が得られたことから、次章において、その詳細について解析を行うこととした。

小括

本章ではまず、マクロファージ細胞の細胞外ヌクレオチドによる機能調節について明らかにした。解析の結果、J774 マウスマクロファージ細胞において、P2Y₂, P2Y₆ や P2X₄, P2X₇ のプリン受容体サブタイプが発現しており、それらの受容体刺激を介する細胞内 Ca²⁺濃度[Ca²⁺]_i 上昇応答とマクロファージ炎症性タンパク質(MIP)-1 α 産生亢進が認められた。このタンパク質は炎症反応に関与する C-C ケモカインの一つであり、T 細胞や B 細胞、好塩基球など種々の免疫細胞の遊走を促進することが知られている (Zhang et al., 2010)。したがって、ATP や UDP をはじめとする細胞外ヌクレオチドは、マクロファージ機能を活性化し炎症を促進する作用があると考えられた。

一方、炎症応答の調節には様々な因子が関与するが、中でもプロスタノイド、特に PGE₂ は、状況に応じて 1 つの分子が炎症促進と抗炎症とに働く非常に興味深いメディエーターである (Cazevaille et al., 1994; Iadecola et al., 2001; Kawano et al., 2006; McCullough et al., 2004)。実際、PGE₂ は上記したように急性炎症応答の主要なメディエーターで LPS による炎症性反応を媒介するが、その一方で免疫系の反応、特にマクロファージ機能発現においては抑制的に作用することが知られている (Ratcliffe et al., 2007; Iwasaki et al., 2003; Jing et al., 2003)。そこで本実験では、J774 細胞に発現が確認されたプリン受容体と PGE₂ 受容体の刺激作用が MIP-1 α の産生にどのように影響するか検討した。解析の結果から、炎症反応において主要な働きを担う PGE₂ が、これらの細胞外ヌクレオチドによる[Ca²⁺]_i 上昇応答や MIP-1 α 産生の亢進作用を抑制し、マクロファージ機能を抑制して抗炎症作用をもたらす可能性が示唆された。さらに、マクロファージ細胞は細胞外ヌクレオチド以外にも血小板活性化因子 (PAF) やロイコトリエン (LT) D₄ などに応答して[Ca²⁺]_i 上昇作用を示し、PGE₂ はそれら Gq 共役型受容体を介する反応も用量依存的に抑制した。すなわち、PGE₂ は Gq タンパク質と共役する受容体の応答に対して広く抑制することが示された (図 10)。マクロファージ機能の制御は、各種炎症性疾患の病態解明ならびにそのコントロールに極めて重要と考えられる。

そこで次章では、その調節機構を明らかにすることを目的とし、マクロファージ細胞において、より明確な応答を示した P2Y₆ 受容体を介する炎症応答シグナルに対する PGE₂ の抑制機構に焦点を絞りその分子メカニズムを検討することとした。

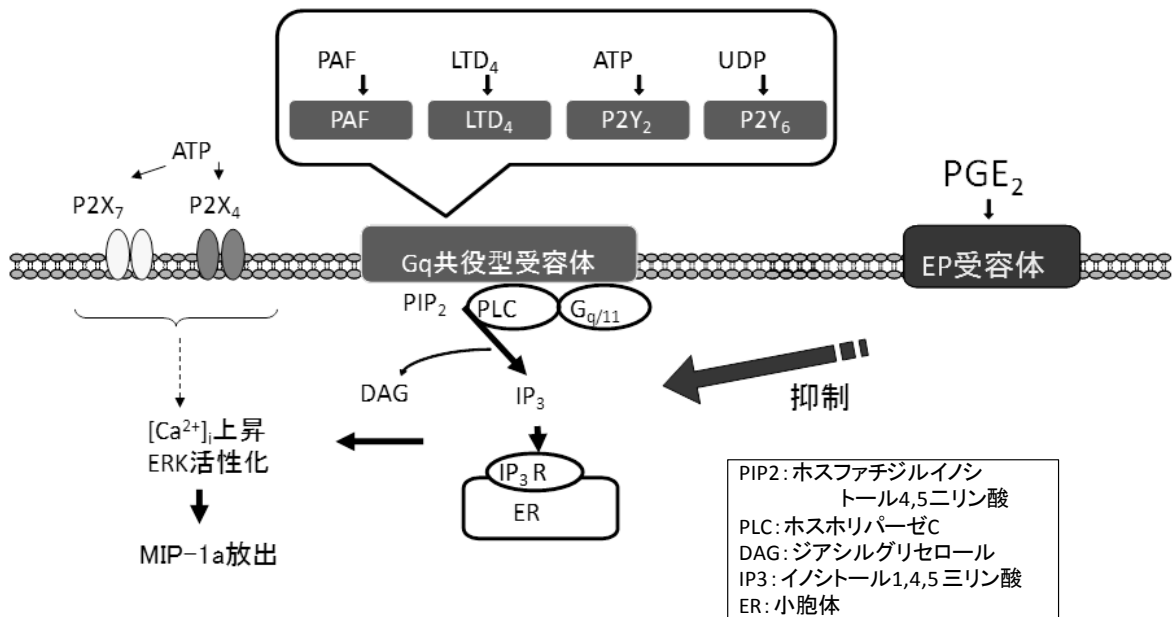


図 10. マクロファージ細胞における細胞外ヌクレオチドのシグナル伝達と PGE_2 による抑制作用の概念図

マウスマクロファージ J774 細胞には、 P2Y_2 、 P2Y_6 や P2X_4 、 P2X_7 のようなプリン受容体サブタイプが発現しており、その活性化は細胞内 Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇応答ならびにケモカイン（MIP-1 α ）の産生を亢進する。炎症性ケミカルメディエーターの PGE_2 は、これらの応答を抑制する。さらに PGE_2 は、細胞外ヌクレオチドによるシグナル伝達のみならず、 Gq/PLC シグナルを介する PAF や LTD_4 による応答に対しても広範な抑制作用を示す。

第3章 Gq-ホスホリパーゼC-Ca²⁺シグナルに対する PGE₂シグナルの抑制機構に関する解析

第1節 序論

第2章の研究から、J774 マウスマクロファージにおいて、PGE₂は P2Y₂, P2Y₆や P2X₄ のようなプリン受容体サブタイプを介する細胞内 Ca²⁺濃度[Ca²⁺]_i 上昇応答を抑制する事を示した(Ito and Matsuoka, 2008)。また、PAF や LTD₄ などの Gq タンパク質共役型受容体による[Ca²⁺]_i 上昇応答も抑制したことから、それらの受容体シグナルに共通する Gq-ホスホリパーゼ C (PLC) シグナルを抑制する可能性が推察された。

マクロファージで発現が認められた P2 受容体のうち、P2Y₆ 受容体が高発現していた。P2Y₆ 受容体は Gq タンパク質と共役しており、細胞外 UDP によって選択的に活性化され (Bar et al., 2008)、免疫細胞の走化性因子である Interleukin (IL) -8 のようなケモカイン産生を促進する事が示されている (Cox et al., 2005; Zhang et al., 2011)。さらに、P2Y₆ 受容体シグナルが多く炎症性病態と関与することが報告されている。すなわち、TNF- α による血管内皮細胞障害 (Riegel et al., 2011)、痛風において尿酸による炎症応答 (Uratsuji et al., 2012)、喘息における気道炎症と組織リモデリング (Vieira et al., 2011) などに P2Y₆ 受容体が関与する。したがって、PGE₂ による P2Y₆ 受容体シグナルの抑制は様々な炎症性疾患の寛解に寄与する可能性が考えられる。

PGE₂ は、最も普遍的なシクロオキシゲナーゼ (COX) 代謝物の 1 つであり、ミクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素の誘導により炎症組織で増加する。プロスタグランジン E 合成酵素は誘導型の酵素で、COX-2 と共局在する (Lazarus et al., 2002)。PGE₂ の細胞膜受容体は、EP1、EP2、EP3、EP4 の 4 つのサブタイプに分類されており、EP1 は Gq タンパク質共役受容体であり、[Ca²⁺]_i 上昇応答を示す。EP2 と EP4 は、Gs 共役型受容体であり、アデニル酸シクラーゼを活性化する。EP3 は主に Gi タンパク質と共役しており、アデニル酸シクラーゼを阻害する。また、それぞれの受容体サブタイプ特異的なアゴニストが開発されている (表 3)。PGE₂ はそれらの受容体を介して実に多様な生理作用を示す (Narumiya et al., 1999; Sugimoto and Narumiya, 2007)。例えば、血管、気管、消化管、子宮など様々なタイプの平滑筋に対する収縮弛緩反応である。また、プロスタノイドには、神経伝達物質の遊離を促進または抑制する作用もある。知覚神経においては侵害刺激に対する感受性を亢進する事で末梢神経系の活動を調節する。また、発熱や睡眠・覚醒、視床下部にける神

経内分泌系への影響など、中枢神経系への作用も知られている。

表 3. PGE₂ 受容体サブタイプとその特徴

受容体	G protein	signalling	selective agonist
EP1	Gq	[Ca ²⁺]I ↑	ONO-DI-004
EP2	Gs	cAMP ↑	ONO-AE1-259-01
EP3	G _{i/o} , Gq	cAMP ↓、[Ca ²⁺]I ↑	ONO-AE-248
EP4	Gs	cAMP ↑	ONO-AE1-329

さらに腸管の蠕動運動や消化液の分泌、胃粘膜保護作用や胃酸の分泌抑制、腎臓における水輸送の調節作用を示す。血小板機能においては、血管のホメオスタシス維持や止血にも重要な役割を果たす。細胞のアポトーシス、分化・増殖あるいは発がんなどにも関与する。このようにプロスタノイドの作用は全ての臓器に及ぶと言っても過言ではない。これらの多様な生理応答の作用機構の一部について、各種 EP 受容体欠損マウスの解析から、以下の事が明らかにされている。発熱応答において、内因性発熱物質による作用あるいは LPS などの外因性発熱物質による作用は最終的に PGE₂ による EP3 受容体を介して起こる (Ushikubi et al., 1998)。また、正常マウスに PGE₂ を静脈内投与すると血圧が低下し、EP2 受容体欠損マウスでは逆に血圧上昇が見られることから、EP2 受容体は PGE₂ による血圧低下作用を媒介している一方で、EP1 や EP3 は血圧上昇に関与している可能性が考えられている。EP2 受容体欠損マウスでは、食塩負荷による顕著な高血圧応答も認められている (Kennedy et al., 1999)。さらに EP2 受容体欠損マウスでは、出産直前の胎児数が平均 1.5 と、野生型マウスの平均値の 7.1 に比較して極端に低下しており、これは子宮内での卵を取り囲んで保護するとともにその成熟に関与する卵丘細胞の機能障害による顕著な受精障害が原因であることが知られている (Hizaki et al., 1999)。また、近年では、PGE₂/EP2 シグナルの抑制により大腸癌の微小管環境の炎症応答や腫瘍細胞の増殖抑制が認められている (Ma X et al., 2015)。ヘルパー T 細胞の Th1 への分化や Th17 細胞の活性制御においては、EP2/EP4 受容体を介する調節の可能性も明らかにされつつある (Yao et al., 2009)。肥満細胞においても PGE₂/EP3 シグナルが脱顆粒応答を促進し、ヒスタミンを遊離させる事で血管透過性を亢進させるなど、急性炎症に関与することが報告されている (Kawahara et al., 2015)。一方では、ハウスダストであるダニアレルゲンによるアレルギー性気管支炎モデルマウスの気道過敏性ならびに気道炎症が、肥満細胞の PGE₂/EP2 シグナルを活性化する事で抑制されるとの相反する報告 (Torres et al.,

2015) もあり、PGE₂ の肥満細胞制御や炎症応答制御における役割については混沌としている。しかしながら、マクロファージ細胞の EP 受容体についての知見は乏しい状況であり、その解析は重要な課題と考えられる。

PGE₂ による免疫応答の抑制は、EP2、EP4 を介する cAMP-プロテインキナーゼ A シグナル機構による可能性が示唆されている (Takahashi et al., 2002; Ikegami et al., 2001; Aronoff et al., 2004; Kubo et al., 2004) 。しかし、最近の検討から、PGE₂ によるマクロファージ Ca²⁺シグナルの抑制はプロテインキナーゼ C を介した受容体の脱感作である可能性も示唆されている ((Través et al., 2013))。したがって、第 2 章で明らかとした PGE₂ による P2Y₆ 受容体シグナルの抑制性制御は、GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) 共役型受容体 (GPCR) を介すると想定されるが、Gq タンパク質共役型受容体である P2Y₆ 受容体のシグナルを PGE₂ の GPCR を介するシグナルがどのように制御しているか、その正確なメカニズムは十分に明らかではない。

GPCR は 7 回膜貫通型で、3 量体 G タンパク質を介して複雑な細胞情報ネットワークを構築し生体機能調節に重要な役割を果たしている。GPCR に共役する三量体 G タンパク質は α 、 β 及び γ の三種類のサブユニットからなるヘテロ三量体構造をとっており、 α サブユニットの果たす機能の違いやアミノ酸配列の相同性によって Gs、Gi、Gq、及び G12 の 4 つのファミリーに分類されている。不活性状態の G タンパク質は、 α サブユニットに GDP が結合したヘテロ三量体構造をとっているが、リガンドにより活性化された GPCR によるグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の働きにより、G タンパク質は、 α サブユニットから GDP を解離し、代わりに GTP を結合して GTP 結合型 G α (活性型 G α) と $\beta\gamma$ 複合体 (G $\beta\gamma$) に解離し、様々なエフェクタータンパク質の機能を制御する。一方、活性型 G α に結合している GTP は、GTPase 活性化タンパク質 (GAP) の働きにより GDP と無機リン酸 (Pi) に加水分解され、不活性化される (図 11)。

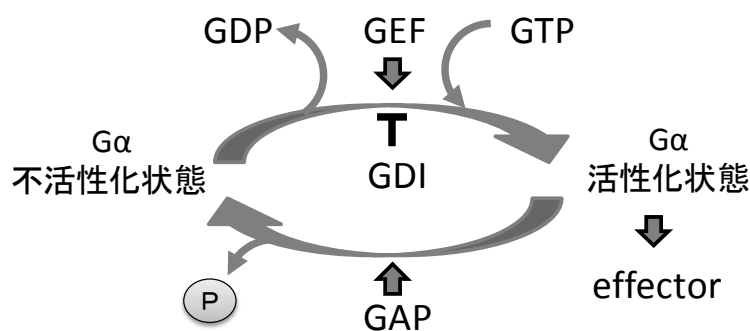


図 11. G タンパク質 α サブユニットの活性化と不活性化の機構

GEF ; guanine nucleotide exchange factor 、 GAP ; GTPase-activating protein、 GDI ; guanine nucleotide dissociation inhibitor

情報伝達の分子スイッチとして重要な G タンパク質の多様性は α サブユニットの違いに基づくと考えられており、それぞれセカンドメッセンジャーの濃度をコントロールすることで巧みに情報伝達を調節している。例えば、Gs タンパク質がアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性を促進し、これに対して Gi/o タンパク質は抑制的に働くことは広く知られている (Morris et al., 1999; Neves et al., 2002)。これらシグナル調節機構は血小板や神経細胞を始め多くの組織において生理機能調節を行っている。一方、Gq タンパク質の活性化は PLC 活性化によるイノシトール-3 リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DAG) 産生により、細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させるとともに PKC を活性化し、細胞の増殖活性など広範な生理機能を担う。これまで Gq タンパク質シグナルに対して、Gs と Gio のような関係にある抑制性の G タンパク質分子あるいは調節機構は明らかにされておらず、この機構の解明は非常に重要な課題であると考えられる (図 12)。一部、免疫系細胞においては、Gq タンパク質シグナルが cAMP 依存性に抑制されることは知られている (Takahashi et al., 2002; Aronoff et al., 2004)。

そこで第 3 章では、マウスマクロファージ細胞である J774 細胞における Gq-PLC シグナルと PGE₂ による GPCR を介するシグナルとのクロストークの詳細について、UDP/P2Y₆ 受容体に対する PGE₂ の抑制機構に焦点を絞りその分子メカニズムを検討した。

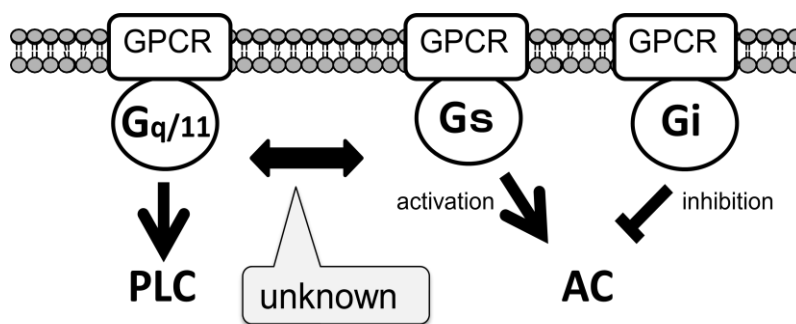


図 12. G タンパク質を介する細胞内情報伝達経路における相互作用

GPCR : G タンパク質共役型受容体、PLC ; ホスホリパーゼ C、AC ; アデニル酸シクラーゼ

第 2 節 実験方法

2-1 実験材料

[myo-1,2-³H]Inositol は American Radiolabeled Chemicals より購入した。
[2-³H]Adenine は Amersham Pharmacia Biotech より購入した。UDP、forskolin (FK)、N(6), 2'-O-dibutyryladeno-sine 3',5' cyclic monophosphate (dbcAMP)、N-[2-(p-Bromo cinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H89)、3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、and ionomycin は Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) より購入した。PGE₂ and butaprost (an EP2 agonist) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。抗 cAMP response element-binding protein (CREB) 抗体、抗 phospho-CREB (Ser133) 抗体、及び抗 cAMP-dependent protein kinase (PKA) リン酸化基質抗体は、Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA) より購入した。Fura2-AM は Dojindo (Kumamoto, Japan) より購入した。抗 β -actin 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。抗 Gs 抗体は、伊藤広 教授 (奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科) より分与いただいた。ONO-DI-004 (selective EP1 agonist)、ONO-AE1-259-01 (selective EP2 agonist)、ONO-AE-248 (selective EP3 agonist)、及び ONO-AE1-329 (selective EP4 agonist) は、小野薬品工業 (Osaka, Japan) より供与いただいた。その他の試薬については市販の特級試薬あるいはそれに準ずるものを用いた。

2-2 細胞培養

J774 細胞の培養は、第 2 章の方法に準じて行った。

2-3 細胞内 Ca²⁺濃度測定

J774 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度は、Fura-2 法により第 2 章の方法に準じて行った。

2-4 イノシトールリン脂質代謝測定

細胞内イノシトールリン酸の水解反応は Matsuoka らの方法を一部改変して行った (Matsuoka et al., 1995)。J774 細胞を 12-well プレートに播種し、[2-³H] myo-inositol を 2~3 μ Ci/mL となるように加えて 18 から 24 時間培養して細胞のリン脂質を標識した。百日咳毒素 (PTX) で処理する場合には [³H] myo-inositol と共に PTX を 20 ng/mL となるように加えて、18 時間培養した。標識した J774 細胞を

KRH 液で 2 回洗浄し、10 mM LiCl を加えた KRH 液に置換して 37°C で 10 分プレインキュベーションした後、薬物刺激により反応を開始した。LiCl はイノシトール-1-リン酸ホスファターゼの活性を阻害し、生成したイノシトールリン酸を蓄積させるために用いた。反応の停止は、反応液を除去後 2.5% perchloric acid (PCA) を 1 mL/well 添加することで行った。PCA 抽出物を 20,000×g で 1 分間遠心し、その上清に 4.2M の水酸化カリウムを 9 分の 1 容量添加して potassium perchlorate の沈殿を形成させて遠心し、上清を反応液として回収した。

総イノシトールリン酸の分離は陰イオン交換樹脂 (Dowex AG 1X-8, 100-200 mesh, formate form, Bio-Rad) 0.8 mL を詰めたエコノカラムを用いて行った。すなわち、カラムを 1 M ギ酸 8 mL で平衡化し蒸留水 8 mL で 2 回洗浄した後、サンプルをアプライした。続いて、カラムを蒸留水 8 mL で洗浄して非吸着成分を、更に 50 mM ギ酸アンモニウム 8 mL でグリセロホスフォイノシトールを溶出させた。続いて 1 M ギ酸/0.1 M ギ酸アンモニウム 5 mL で総イノシトールリン酸を分取した。この画分をシンチレーションカクテル (DPO 4 g、POPOP 0.1 g、トルエン 1 L、TritonX-100 500 mL/1.5 L) 10 mL と混合して液体シンチレーションカウンターで³Hの放射活性を測定した。

2-5 細胞内 cAMP レベルの測定

細胞内 cAMP レベルの測定は、細胞を³Hadenine で標識し、薬物刺激により生成した³HcAMP を定量することにより行った (Ohkubo らの方法を一部改変、Ohkubo et al., 2000)。J774細胞を 12-well ディッシュに 5.0×10^5 cells/well で播種し、1 μ Ci/mL ³Hadenine を含む RPMI1640 培地 に置換し、3-4 時間 CO₂ インキュベーター内で細胞を標識した。標識細胞は KRH 液で 2 回洗浄した後、ホスホジエステラーゼ 阻害薬である IBMX 100 μ M を加えた KRH 液に置換し、37°C で薬物刺激を 10 分間行った。反応の停止は、反応液を除去後 2.5% perchloric acid (PCA) を 0.6 mL/well 添加することで行った。PCA 抽出物を 20,000×g で 1 分間遠心し、その上清に 4.2M の水酸化カリウムを 9 分の 1 容量添加して potassium perchlorate の沈殿を形成させて遠心し、上清を反応液として回収した。その上清を予め 0.1 N HCl 10 mL で活性化し、水 10 mL で 3 回洗浄しておいた Dowex 50W-8X カラム (200-400 mesh, H⁺ form, bed 18 volume 1.4 mL, Bio-Rad) に添加した。カラムを水 2 mL で洗浄した後、³HcAMP を含む画分を 8 mL の水で溶出させ。更に、この画分を予め 100 mM imidazole-HCl (pH 7.6) 10mL で洗浄しておいた活性アルミナカラム(neutral, bed volume 1.1 mL, Merck) に添加した。その後、³HcAMP を 100 mM imidazole-HCl (pH 7.6) 4 mL で溶出し、この画分をシンチレーションカクテル (組成はイノシトール

ルリン脂質代謝測定方法の項に示した) 8 mL と混合して液体シンチレーションカウンターで³H]の放射活性を測定した。放射活性を液体シンチレーションカウンターにて計測した。³H]cAMP レベルは、basal をコントロールとして表記した。

2-6 ウェスタンブロッティング

J774 細胞をサンプルバッファー (25% glycerine, 1% SDS, 62.5 mM Tris-Cl, and 10 mM β -mercaptoethanol) で溶解し、98 °C で 10 分間加熱変性した。タンパク質サンプルは 11% のアクリルアミドゲルで電気泳動し、分離したタンパク質をセミドライ・トランスファー装置 (AE-6675, ATTO) でゲルから PVDF 膜 (Hybond P, Amersham) へ転写した。PVDF 膜を 1 % スキムミルク含有 TBST (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) に浸して室温で 1 時間ブロッキングを行い、その後、1 % スキムミルク含有 TBST で希釈した一次抗体と室温で 2 時間インキュベートした。一次抗体は、抗 CREB 抗体、抗 phospho-CREB 抗体、抗 phospho-PKA substrate 抗体 あるいは抗 phospho-ERK1/2 抗体、抗 ERK1/2 抗体で、何れも Cell Signaling より購入し、1000 倍希釈で用いた。抗 Gs alpha 抗体は分与いただいたものを 500 倍希釈で使用した。TBST で 5 回洗浄後、PVDF 膜を 1 % スキムミルク含有 TBST で希釈した二次抗体に浸して、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell signaling, 5000 倍希釈) を用い、室温で 1.5 時間インキュベートした。TBST で 5 回洗浄後、化学発光検出キット ECL Prime Western blotting Detection system (GE Healthcare) を用いて、HRP と基質との反応により化学発光させ、luminescent image analyser (LAS-3000, Fujifilm, Japan) で撮影した。

2-7 遺伝子発現量解析

遺伝子発現量解析は、第 2 章の方法に準じて行った。また、用いたプライマーを以下の表に示す。

target	5'-forward-3'	5'-reverse-3'	products (bp)
EP1	CTCCCCAATACATCTGTGGT	ACAGCCAAGCAAAAGTGG	330
EP2	GCTAATGGAGGACTGCAAGA	AGCACCAATTCCGTTACCAG	204
EP3	AACCTGTCAAGTACTACCGA	CCGAACACTGTCATGGTTAG	308
EP4	GGTTGGAGGTACCATTCTCTAGA	TACCAACAAGGTGCCAGAA	283
AC7	GTATGCACTACTGCCTCTCA	TGATGGCCAGCTTCATACC	347
Gs	GCTGCCTCGGCAACAGTAA	CCGGTAGACCTGCTTGTCCTT	110
beta-actin	ATGGATGACGATATCGCTG	TCGTAGATGGGCACAGTGTG	500

2-8 siRNA の処理方法

マウス 7 型アデニル酸シクラーゼ (AC7)、 $G\alpha s$ タンパク質及びネガティブコントロール siRNA は、キアゲン FlexiTube siRNA を用いた (Qiagen, Limburg, Netherlands)。AC7 に対する siRNA として以下の 4 種類、Mm_Adcy7_5 (Cat.no. SI02666090), Mm_Adcy7_6 (Cat.no. SI02685760), Mm_Adcy7_7 (Cat.no. SI02707418), Mm_Adcy7_8 (Cat.no. SI02731400)。また、Gs-alpha protein に対する siRNA として、Mm_Gnas_1 (Cat.no. SI01053983) を用いた。J774 細胞に、細胞 5×10^6 個当り各 siRNA を 100 pmol とし、トランスフェクション試薬 (Nucleofector Kit V) を用いて Amaxa Nucleofector 2b システム (Lonza, Japan) でプロトコル T-20 により遺伝子導入した。トランスフェクションの 36~48 時間後、AC7 や $G\alpha s$ の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により解析した。また、ウエスタンブロッティングや Ca^{2+} 濃度測定実験ならびに cAMP 測定、イノシトールリン脂質水解実験に用いた。

2-9 マクロファージ炎症性タンパク質 (MIP) -1 α 分泌量の測定

J774 細胞上清の MIP-1 α 量の測定は、第 2 章の方法に準じて行った。

2-10 データ解析

実験結果は、平均値 (mean) \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。有意差検定は、2 群間の比較には Mann-Whitney U test を用いた。多重比較は、Dunnett's 法を用いて解析した。 P 値は 0.05 より小さい場合に統計的に有意であるとみなした。

第 3 節 結果

3-1 J774 細胞における UDP によるイノシトール加水分解反応に対する PGE₂ の作用

UDP が作用する P2Y₆ 受容体は Gq タンパク質を介して PLC を活性化し、ホスホイノシタイドを加水分解し、イノシトールリン酸 (IPs) を産生する。そこで本実験では、^[3H]イノシトールで代謝ラベルした J774 細胞を UDP で刺激し PLC 活性化の結果産生される ^[3H]IPs をカラムにて分離し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することで PLC 活性とし、それに対する PGE₂ の作用を検討した。

UDP (10 μM) 刺激時間に応じて、10 分間持続的な IPs 産生が認められた (図 13. A)。また、様々な濃度の UDP で刺激 (10 分間) する事で、濃度依存的な IPs 産生の増大が認められ (図 13. B)、その EC₅₀ 値は約 300 nM であった。ホスホイノシタイド加水分解に対するこれらの UDP の作用は、その [Ca²⁺]_i 上昇作用と一致していた。前章で示したように、PGE₂ は UDP による [Ca²⁺]_i 上昇を濃度依存的に抑制した (IC₅₀ 値は約 30 nM) (図 13. C)。そこで PLC 活性に対する影響を検討したところ、PGE₂ は、この UDP による PLC 活性化による ^[3H]IPs 産生を濃度依存的に強く抑制し、その IC₅₀ 値は約 30 nM であったことから (図 13. D)、UDP と PGE₂ の相互作用は [Ca²⁺]_i 変化に対する作用とよく一致していた。

また、Gq タンパク質共役型受容体の活性化による PLC の活性化には、ストア作動性の細胞外 Ca²⁺流入による経路も影響する。そこで、UDP による P2Y₆ 受容体刺激を介する PLC 活性化における細胞外 Ca²⁺の影響とそれに対する PGE₂ の作用を検討した。細胞外 Ca²⁺を除くことにより、UDP による IP 加水分解活性は細胞外 Ca²⁺存在下と比較して低下したものの、明確な増加が確認された。一方、PGE₂ (1 μM) あるいは U73122 (1 μM) の前処理は、UDP による IP 加水分解活性を完全に抑制した (図 14)。したがって、PGE₂ による UDP シグナルの抑制の作用点は P2Y₆ 受容体から PLC の間と想定された。

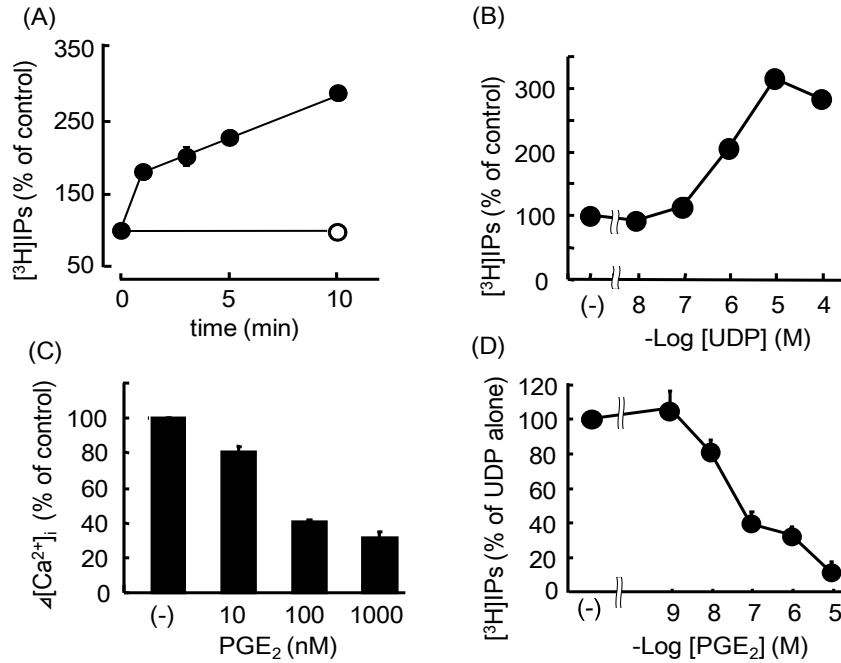


図 13. UDP による PLC 活性化に対する PGE₂ の影響

A : J774 細胞における UDP 誘発 IP 加水分解反応の経時変化。[³H]イノシトールで代謝ラベルした細胞を UDP (10 μM) で 1、3、5 及び 10 分間刺激し、総 IP 量を測定した。
 B : IP 加水分解反応に対する UDP の濃度依存的な作用。UDP 刺激は 10 分間行った。
 C : UDP による [Ca²⁺]_i 上昇に対する PGE₂ の濃度依存的な抑制作用。細胞は各濃度の PGE₂ で 1 分間前処理した後に UDP (10 μM) で刺激した。
 D : UDP による IP 加水分解反応に対する PGE₂ の濃度依存的な抑制作用。[³H]イノシトールで代謝ラベルした細胞は、様々な濃度の PGE₂ 存在下において、UDP (10 μM) で 10 分間刺激した。[³H] IPs の値は、UDP 単独に対する割合 (%) で算出した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)。

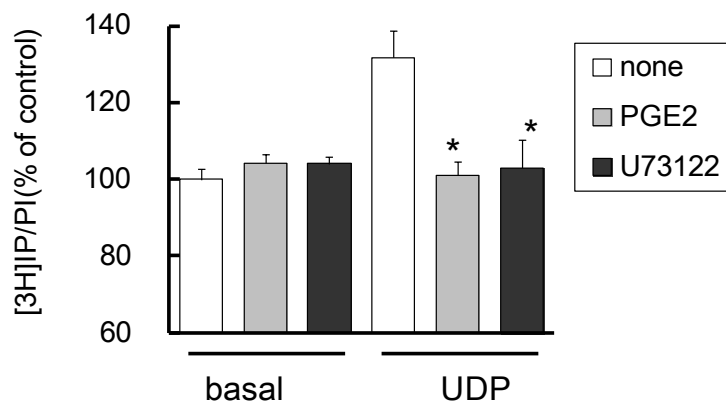


図 14. UDP による PLC 活性化における細胞外 Ca²⁺の影響とそれに対する PGE₂ の作用

細胞外 Ca²⁺を除いた状態における UDP 誘発 IP 加水分解反応に対する PGE₂ の抑制作用。J774 細胞を [³H]イノシトールで代謝ラベルした後、Ca²⁺を除いた KRH に置換した。PGE₂ (1 μM) あるいは U73122 (1 μM) で 5 分間前処理し、続いて UDP (10 μM) で 10 分間刺激した。[³H] IPs の値は、basal の値に対する割合 (%) で算出した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)。
 *P<0.05 vs コントロール (Dunnett's 検定)

J774 細胞において、UDP 刺激は一過性の強い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に続き持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を示す。そこで、UDP 刺激により、既に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められている状態に対する PGE_2 (1 μM) の影響を検討した。その結果、UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の持続相に対して PGE_2 は、処理直後から顕著に抑制する事が示された (図 15. A 下段)。次に UDP 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の持続相がストア作動性の細胞外 Ca^{2+} 流入経路により構成されている可能性を考えた。小胞体の Ca^{2+} -ATPase 阻害剤である Thapsigargin を用いて誘発したストア作動性の細胞外 Ca^{2+} 流入に対する PGE_2 (1 μM) の作用を確認したが、影響は認められなかった (データ未掲載)。また、UDP による PI 加水分解亢進応答に対する PGE_2 (1 μM) の後処理の影響を検討した。図 15. B に示すように、UDP 刺激の 1 分後、5 分後に PGE_2 を処理しても、その時間に応じて PI 加水分解反応を明確に抑制した。この傾向は、 $[Ca^{2+}]_i$ に対する検討結果と同様であった。したがって UDP 刺激により持続的な PLC 活性が引き起こされていること、また、 PGE_2 はすでに UDP 刺激による応答が生じている状態に対しても強力に抑制作用を示し、かつその作用発現は処理直後から速やかに認められることが明らかとなった。

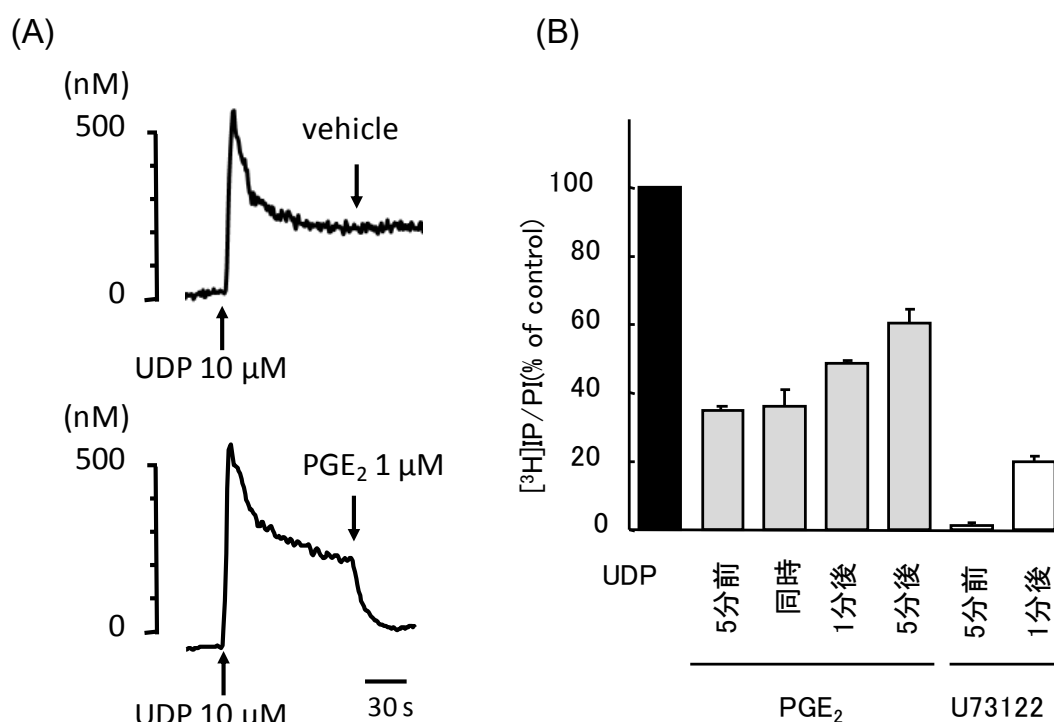


図 15. UDP 誘発応答に対して PGE_2 を異なるタイミングで処理した際の影響

A: UDP 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の代表的なトレース。UDP (10 μM) による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対して、 PGE_2 (1 μM) を図のタイミングで処理した。上段: コントロール、下段: PGE_2 (1 μM)

B: UDP による PI 加水分解亢進応答において、UDP 投与に対して異なるタイミングで PGE_2 (1 μM) を処理した際の効果。 $[^3H]$ イノシトールラベルした細胞の UDP (10 μM) 刺激に対して、図に示したように PGE_2 (1 μM) を 5 分前処理あるいは、UDP と同時、UDP 処理の 1 分後、5 分後で処理した。結果は、UDP 単独の作用をコントロールとして、割合 (%) を算出した (n=3)。

3-2 UDP による MAPK 活性化に対する PGE₂ の影響

Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) は、広く細胞に発現しているセリンスレオニンキナーゼであり、細胞の分化・増殖をはじめストレス応答やアポトーシスなど細胞の広範な生理機能に関与している。マクロファージにおける ERK あるいは p38 MAPK などの MAPK の活性化は、炎症性サイトカインの産生に重要であることが報告されている (Jia et al., 2015)。そこで UDP による P2Y₆ 受容体刺激による ERK あるいは p38 MAPK 活性への影響を検討した。その結果、UDP 刺激後 2 分をピークとした ERK および p38 MAPK の活性化が認められた。一方、PGE₂ (1 μ M) を 1 分前処理することにより、これらの MAPK 活性化は顕著に抑制された (図 16)。

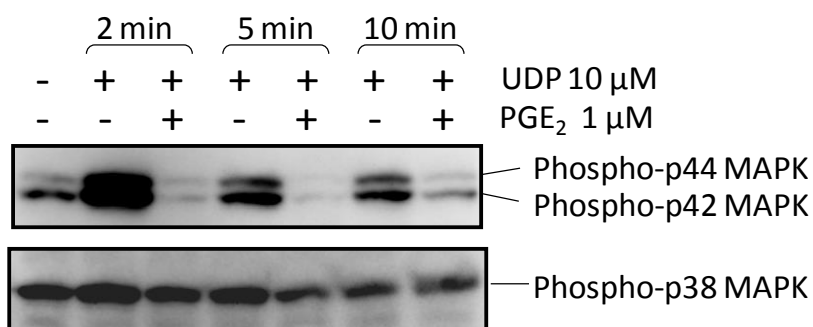


図 16. UDP による ERK、p38MAPK 活性化に及ぼす PGE₂ の作用

J774 細胞は PGE₂ (1 μ M) の存在下あるいは非存在下において、UDP (10 μ M) で 2、5 及び 10 分間刺激した。その後、全細胞溶解液におけるリン酸化された ERK あるいは p38 MAPK の量を、抗 phospho-ERK1/2 抗体あるいは抗 ERK1/2 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

3-3 J774 細胞における PGE₂ 受容体の発現とその機能

PGE₂ の抑制作用を媒介する PGE₂ 受容体を探るべく、遺伝子発現について検討した。PGE₂ の受容体には EP1 から EP4 の 4 つのサブタイプが知られている (Sugimoto and Narumiya, 2007)。RT-PCR の結果から、J774 細胞には EP2 および EP4 受容体 mRNA の発現が認められた (図 17. A)。また、リアルタイム PCR の結果から、特に EP2 受容体の mRNA が豊富であり、EP4 受容体の約 6 倍であった (図 17. B)。EP2 および EP4 受容体は Gs タンパク質と共役しアデニル酸シクラーゼを活性化することから、PGE₂ 及び EP 受容体サブタイプに選択的なアゴニストを用いて、マクロファージ J774 細胞における cyclic AMP (cAMP) 産生への影響を測定した。その結果、[³H]アデニンでラベルした J774 細胞において、PGE₂ は 100 nM 以上で濃度依存

的に cAMP 産生を亢進したが、その応答は 10 μ M においても最大に到達しなかった (図 17. C)。PGE₂ (10 μ M) による応答が最大と仮定すると、その EC₅₀ 値は約 0.5 μ M であった。また、EP2 受容体選択的アゴニストである ONO-AE1-259-01 も、濃度依存的に cAMP 産生を亢進し、その EC₅₀ 値は約 30 nM であった。一方、EP4 受容体選択的アゴニストである ONO-AE1-329 は、10 μ M の濃度でもわずかに cAMP レベルを上昇させる程度であり、その作用は EP2 受容体アゴニストでより強力であった。EP1 受容体アゴニストの ONO-DI-004 や、EP3 受容体アゴニスト ONO-AE-248 は、細胞内 cAMP レベルに影響しなかった (図 17. C)。

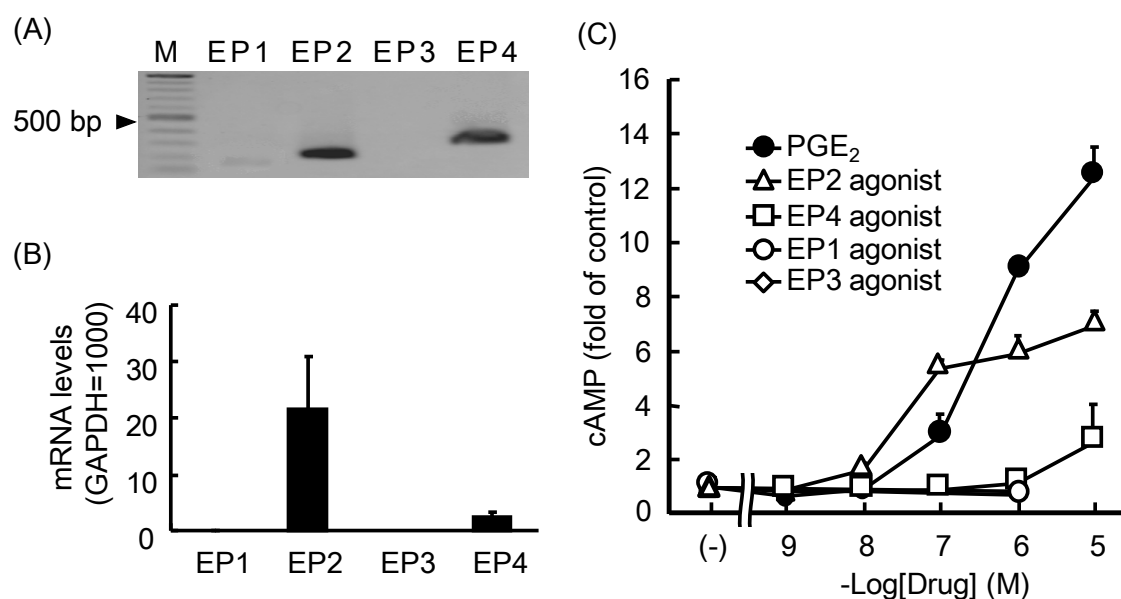


図 17. J774 細胞に発現している EP 受容体サブタイプの発現とその機能解析

A: サブタイプ特異的なプライマーによる PCR 産物のアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した例を示した。

B: 定量的 PCR による J774 細胞における EP1、EP2、EP3、EP4 mRNA レベルの測定。値は GAPDH mRNA レベルで補正し、平均値±標準誤差で示した (n=3)

C: J774 細胞の細胞内 cAMP レベルに対する PGE₂ および EP 受容体選択的アゴニストの影響。細胞は、0.5 mM IBMX (PDE 阻害剤) 存在下、各濃度のアゴニストで 37 °C、10 分間刺激した。ONO-DI-004 (selective EP1 agonist)、ONO-AE1-259-01 (selective EP2 agonist)、ONO-AE-248 (selective EP3 agonist)、及び ONO-AE1-329 (selective EP4 agonist)。値は basal レベルからの増加率として示した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)。

3-4 UDP による [Ca²⁺]_i 上昇及び PLC 活性化に対する EP 受容体サブタイプ選択的アゴニストの作用

次に、UDP を含む細胞外ヌクレオチドによる [Ca²⁺]_i 上昇に対する各種 EP 受容体サブタイプ選択的なアゴニストの影響を検討した。その結果、図 18 の A に示すように、PGE₂ は UDP による [Ca²⁺]_i 上昇の最大応答及び定常状態を抑制した。また、EP2

受容体アゴニスト(ONO-AE1-259-01)および EP4 受容体アゴニスト(ONO-AE1-329)は、それぞれ 0.1 μM の濃度で UDP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制し、 PGE_2 の作用を模倣した(図 18. B)。しかし、EP1 受容体アゴニスト(ONO-DI-004)や、EP3 受容体アゴニスト(ONO-AE-248)による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇抑制作用は、認められなかった。UDP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE_2 の作用を模倣する 0.1 μM の EP2 アゴニストは、 PGE_2 と同様に、UDP による PLC 活性化を最大に抑制した(図 18. C)。一方、EP4 受容体アゴニストは、それをわずかに抑制したのみだった。EP1 および EP3 受容体アゴニストは、全く影響しなかった(図 18. B、C)。EP2 受容体アゴニストによる抑制の IC_{50} 値は約 0.3 nM であり、EP4 受容体アゴニストの抑制作用(IC_{50} 値は約 300 nM)に比較して、より強力であった。さらに、EP2 受容体アゴニストによる最大抑制は、コントロールの 80%であり、EP4 受容体アゴニストの 40%に比較してより大きかった(図 18. C)。以上の結果より、受容体遺伝子発現レベル、cAMP 産生能などを勘案し、 PGE_2 は主に EP2 受容体を介して作用していることが示唆された。

3-5 UDP による Gq-PLC 活性化に対する PGE_2 の抑制作用における cAMP/PKA 経路の影響

Gq タンパク質を介した PLC の活性化の制御機構は、リン酸化による制御をはじめいくつか報告されている(Yue et al., 1998, 2000)。そこで、今回観察された PGE_2 /EP2 受容体を介する Gq-PLC シグナルの抑制のメカニズムを検討した。EP2 受容体を介する応答は、アデニル酸シクラーゼの活性化による cAMP/PKA 経路で媒介されると考えられている(Ikegami et al., 2001)。本実験では、UDP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇や PLC 活性化に対する PGE_2 の抑制作用における cAMP シグナル経路の関与について解析した。まず、アデニル酸シクラーゼ活性化剤のフォルスコリン(FK)や細胞膜透過性 cAMP 誘導体であるジブチル cAMP (dbcAMP) の作用を検討した。UDP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対して、FK や dbcAMP による cAMP/PKA シグナル経路の活性化では、 PGE_2 の様な抑制作用が模倣できなかった。また、PKA 阻害剤の H-89 は、 PGE_2 による UDP 誘発 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の抑制作用を解除できなかった(図 19. A)。 PGE_2 による PKA 活性化を介する基質タンパク質のリン酸化は亢進し、H89 はその活性化を抑制したことから、 PGE_2 による PKA 活性シグナルは伝達されていること、H89 はそのシグナルを抑制することを確認した(図 19. B)。 ^3H イノシトール標識細胞を用いたイノシトールリン酸(IPs)測定実験においても、UDP 誘発 PLC 活性化に対して、FK や dbcAMP などの cAMP シグナル経路活性化剤では、 PGE_2 のような阻害作用が認められないことを証明した(図 19. C)。これらの結果は、UDP による IPs

産生亢進は、PGE₂によって抑制されるが、FK や dbcAMP では抑制されないことを示している。なお、PGE₂や FK、dbcAMP による cAMP シグナル経路の活性化は、その下流因子である CREB (cAMP response element-binding protein) のリン酸化を評価する事で確認した (図 19. D)。

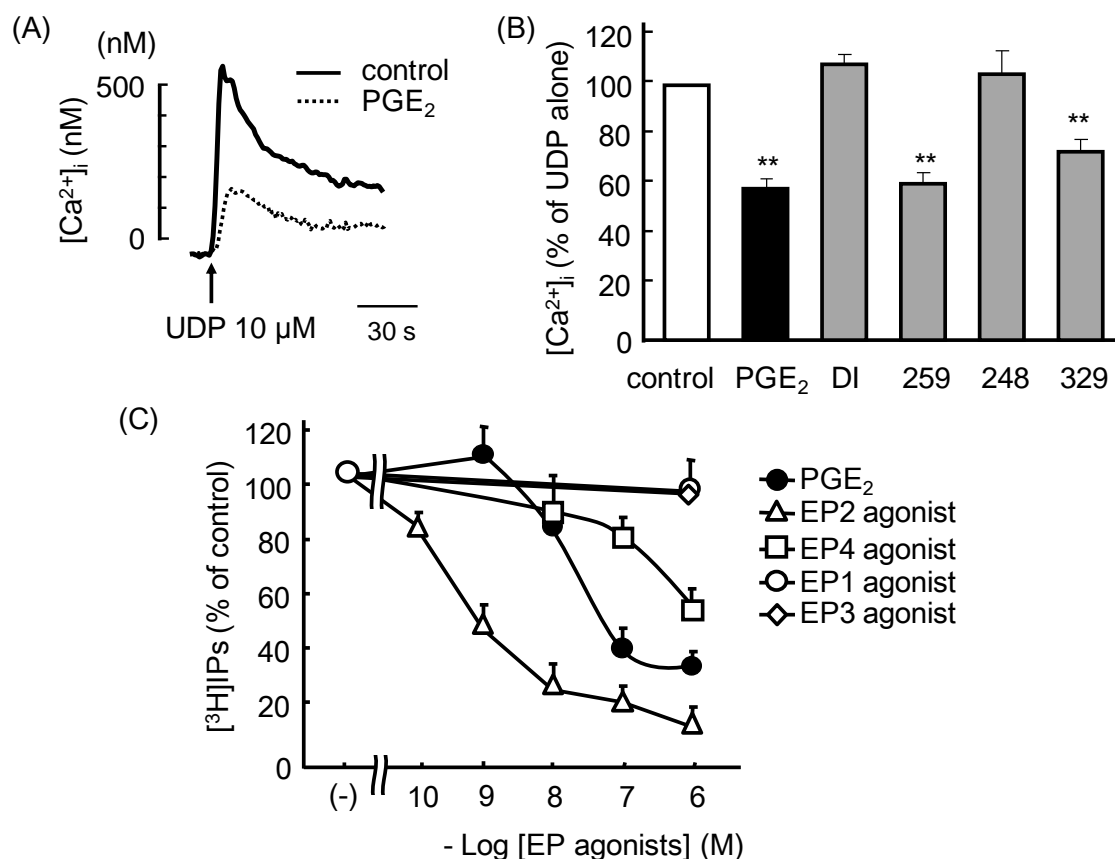


図 18. UDP による PLC 活性化に対する PGE₂ および EP 受容体選択的アゴニストの影響

A: UDP 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とそれに対する PGE₂ の抑制作用の代表的なトレースを示した。Fura-2 を取り込ませた細胞を溶媒 (実線) あるいは 1 μ M PGE₂ (破線) で 1 分間前処理した後、UDP (10 μ M) で刺激した。

B: UDP 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE₂ および EP 受容体選択的アゴニスト (0.1 μ M) の影響。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した (n=6)。** $P < 0.01$ vs コントロール (Dunnett's 検定)

C: UDP による IP 産生亢進に対する PGE₂ および EP 受容体選択的アゴニストの濃度依存的な影響。 $[^3H]$ イノシトールで代謝ラベルした J774 細胞を、10 mM LiCl 存在下において、様々な濃度の PGE₂ および EP 受容体選択的アゴニストで 2 分間前処理した後、UDP (10 μ M) で 37°C、10 分間刺激して総 IP 量を測定した。結果は、UDP のみの応答をコントロールとし、それに対する割合 (%) で算出し、平均値 \pm 標準誤差で示した。

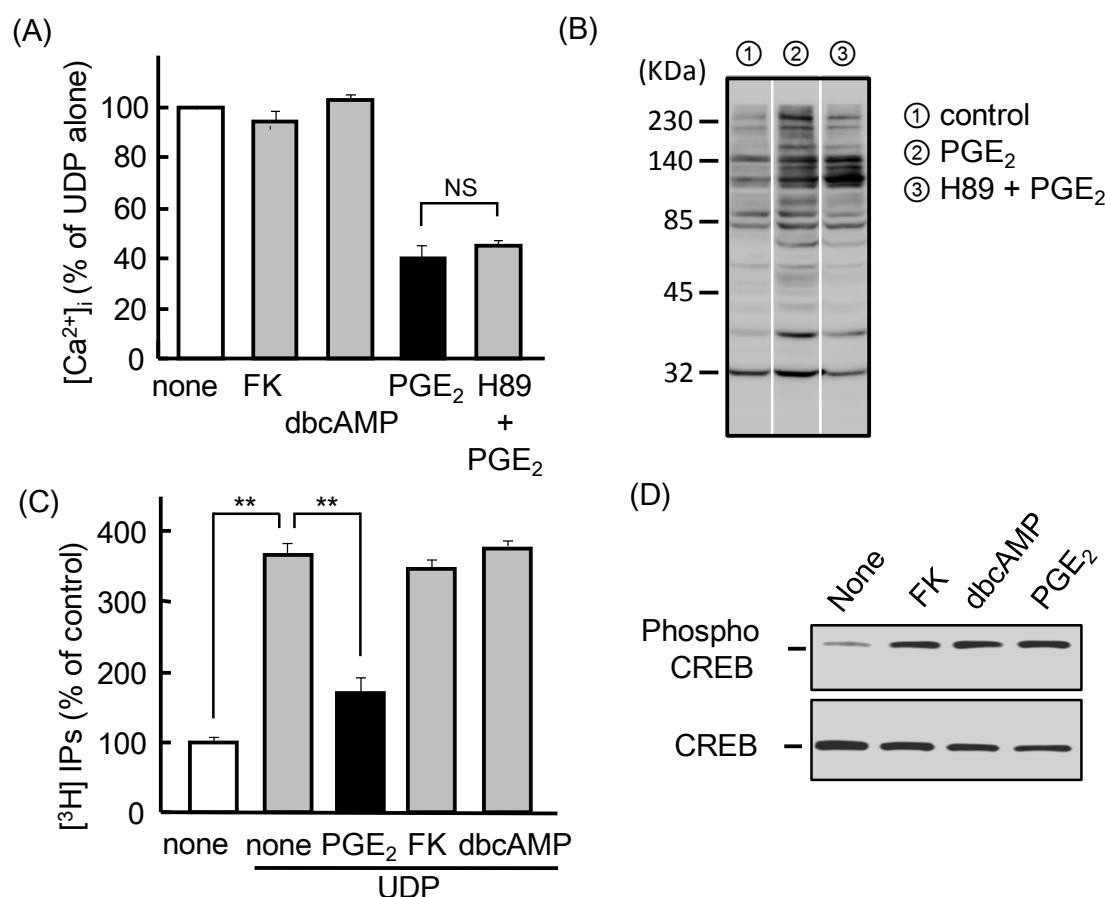


図 19. UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用における cAMP の役割
A: UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する、PGE₂、フォルスコリン (FK) およびジブチル cAMP (dbcAMP) の影響。Fura-2 を取り込ませた細胞を PGE₂ (1 μ M)、FK (10 μ M)、あるいは dbcAMP (500 μ M) で 1 分間前処理した後、UDP (10 μ M) で刺激した。また、UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE₂ の抑制に対して、プロテインキナーゼ A 阻害剤の H89 (10 μ M) を 2 分間前処理した際の影響を測定した。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した (n=5)、NS: not significantly (Mann-Whitney *U* test)。
B: J774 細胞における PKA 基質のリン酸化に対する PGE₂ の影響。細胞は、37 $^{\circ}$ C において H89 (10 μ M) で 2 分間前処理した後、PGE₂ (1 μ M) で 10 分間刺激した。細胞溶解液は SDS-PAGE で分離した後、抗リン酸化 PKA 基質抗体でイムノブロットを行った。
C: UDP による IP 産生亢進に対する PGE₂、FK および dbcAMP の影響。 $[^3H]$ イノシトールで代謝ラベルした J774 細胞を、10 mM LiCl 存在下において、PGE₂ (1 μ M)、FK (10 μ M)、あるいは dbcAMP (500 μ M) で 1 分間前処理した後、UDP (10 μ M) で 37 $^{\circ}$ C、10 分間刺激した。結果は、UDP のみの応答をコントロールとし、それに対する割合 (%) で算出し、平均値 \pm 標準誤差で示した (n=6)。***P* < 0.01 vs コントロール (Dunnett's 検定)
D: J774 細胞における CREB のリン酸化に対する PGE₂、FK および dbcAMP の影響。細胞は、PGE₂ (1 μ M)、FK (10 μ M)、あるいは dbcAMP (500 μ M) で 37 $^{\circ}$ C、10 分間刺激した。細胞溶解液は SDS-PAGE で分離した後、抗リン酸化 CREB 抗体 (上段) および抗 CREB 抗体 (下段) でイムノブロットを行った。

さらに、プロスタグランジン受容体の非選択的なアゴニストで、主に EP3、EP4 受容体に親和性を示すミソプロストール (Miso) を用いて UDP シグナルに対する作用を検討し、PGE₂ の抑制作用における cAMP 経路の関与の可能性を検証した。PGE₂ および Miso は、いずれも J774 細胞において cAMP レベルを顕著に増大させた (図

20. A)。しかしながら、ミソプロストールは UDP による PI 代謝回転を PGE₂ ほど強く抑制しなかった (図 20. B)。すなわち、両アゴニストにおいて cAMP 上昇作用と PI 加水分解反応の抑制作用に、明らかな解離が認められた。FK による cAMP 上昇作用は PGE₂ および Miso と比較して弱く、また UDP による PI 代謝回転にもほとんど影響しなかった。

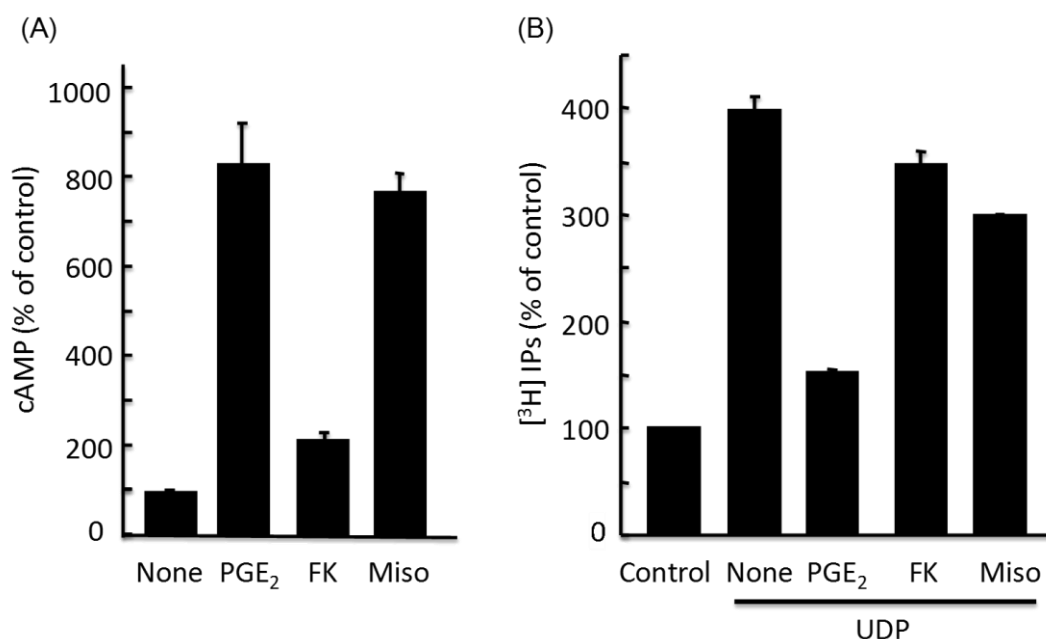


図 20. UDP による PLC 活性化におよぼす PGE₂、ミソプロストール、フォルスコリンの作用
A: J774 細胞の細胞内 cAMP レベルに対する PGE₂、フォルスコリン (FK) あるいはミソプロストール (Miso) の影響。[³H]アデニンで標識した細胞は、0.5 mM IBMX (PDE 阻害剤) 存在下、各濃度のアゴニストで 37 °C、10 分間刺激した。値は basal レベルからの増加率として示した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)。
B: [³H]イノシトールラベルした細胞の UDP (10 μM) 刺激に対して、FK あるいはミソプロストールを 5 分前処理した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)

近年、cAMP の基質として PKA 以外に Exchange Protein Activated by Cyclic AMP (Epac) が見出されている。マクロファージにける Epac 経路の活性化は、その食作用や細胞骨格再構成を抑制することが報告されている (Yeager et al., 2009)。そこで PGE₂ の抑制作用における Epac 経路の関与について検討した。Epac 選択的なアゴニストである 8pCPT-2'-O-Me-cAMP 1 mM の UDP 誘発[Ca²⁺]_i 上昇に対する作用を検討したが、PGE₂ のような抑制作用を模倣できなかった (図 21. A、B)。したがって、UDP による Gq-PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用における cAMP/Epac 経路の関与も否定された。

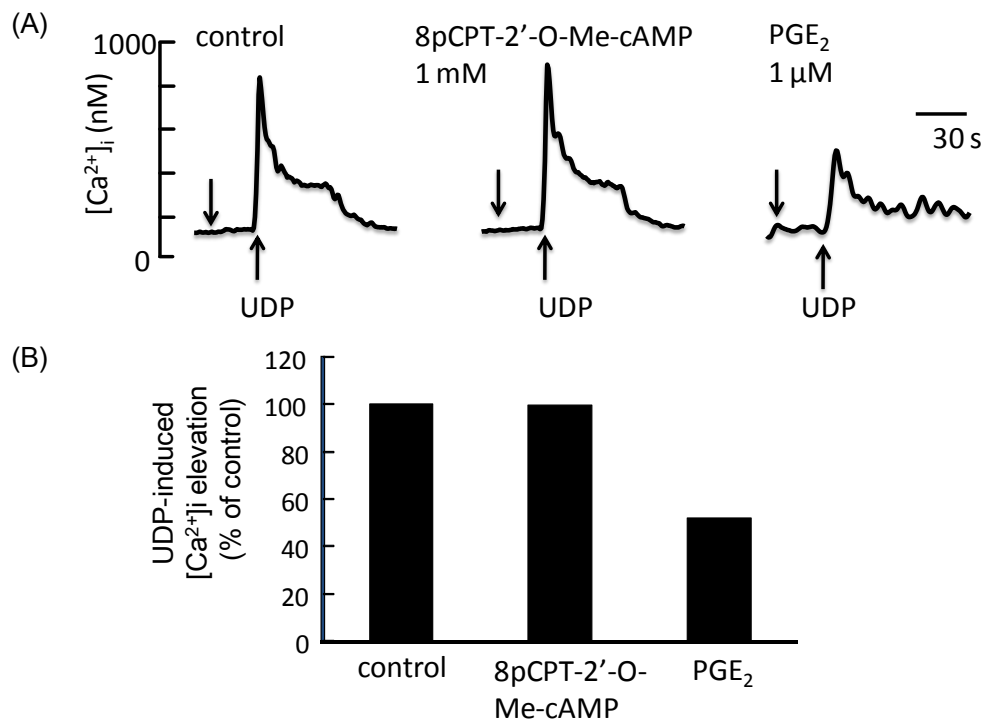


図 21. PGE₂ の抑制作用における Epac 経路の関与

A: UDP 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE₂ あるいは 8pCPT-2'-O-Me-cAMP の作用の代表的なトレース。Fura-2 を取り込ませた細胞を溶媒、1 μM PGE₂ あるいは Epac 選択的なアゴニストである 8pCPT-2'-O-Me-cAMP (1 mM) で 1 分間前処理した後、UDP (10 μM) で刺激した。B: UDP 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のピーク値について、UDP 単独の作用をコントロールとして、各群の割合 (%) を算出した。

これまでの報告では、LPS によるマクロファージの自然免疫応答に対する PGE₂ の抑制作用が知られている。すなわち、マクロファージ細胞における cAMP レベルの上昇は、LPS による炎症応答を抑制することが報告されている。本検討においても、LPS による J774 細胞からの MIP-1α 分泌に対して、細胞膜透過性 cAMP 誘導体は PGE₂ と同様に強力に抑制した (図 22)。したがって、従来から報告されている cAMP/PKA 経路による抑制性の調節機構が確認された。それと同時に、本研究において解析対象としている調節機構は、従来の報告とは異なる事が示された。

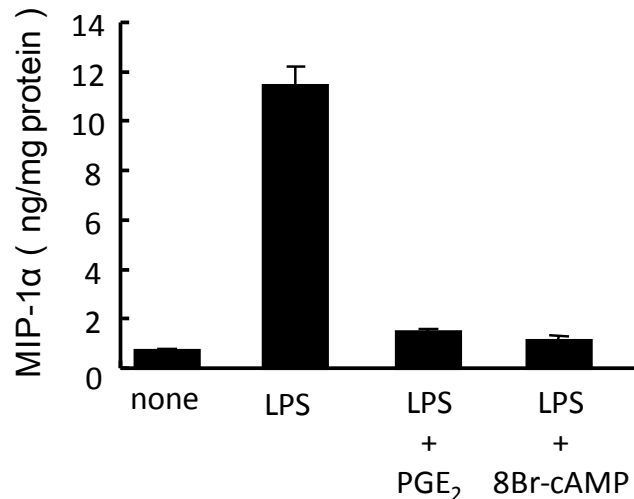


図 22. LPS による J774 細胞からの MIP-1α 分泌に対する PGE₂ および cAMP 誘導体の影響

細胞は PGE₂ (1μM) の存在下、非存在下において、LPS (10 ng/mL) で 1 時間刺激した。その後、培養上清を回収して ELISA 法により MIP-1α 濃度を測定した。また各 well のタンパク質濃度を求めて、値を補正した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=3)。

3-6 UDP による Gq-PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用における NO/cGMP 経路の影響

血小板機能においては、NO/cGMP 経路の活性化が、cAMP/PKA 経路の活性化と同様に作用する事が報告されている (matsuoka et al., 1989)。そこで PGE₂ の抑制作用における NO/cGMP 経路の関与について検討した。しかし、NO ドナーのニトロプルシドナトリウム (SNP) や細胞膜透過性の cGMP 誘導体である 8Br-cGMP 処理では、UDP 誘発 IP 産生亢進に対する PGE₂ の抑制作用を模倣できなかったことから、NO/cGMP 経路の関与は否定された (図 23)。

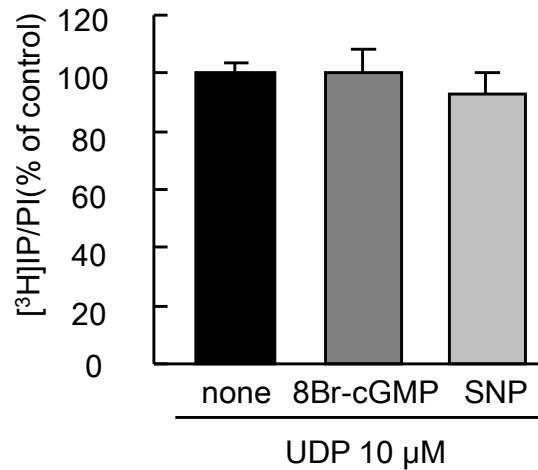


図 23. UDP による PI 加水分解反応に対する NO/cGMP 経路の関与

[³H]イノシトールラベルした細胞を 8Br-cGMP (1mM) あるいはニトロプルシド Na (SNP、10 μM) で 5 分前処理し、続いて UDP (10 μM) で 10 分間刺激した (n=3)。

3-7 UDP による Gq-PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用におけるアデニル酸シクラーゼの関与

上記の検討から、PGE₂ の Gq-PLC 経路抑制作用において cAMP より下流の因子の関与が否定されたため、cAMP の更に上流にあたるアデニル酸シクラーゼ (AC) の関与について検討した。Gs シグナルから cAMP 産生に関わる AC は、10 種類のアイソザイムが知られているが、予備的検討によりこのマクロファージ細胞には AC7 が高発現していたことから (データ未掲載)、そのノックダウンによる影響を検討した。AC7 に対する siRNA 処理により、J774 細胞の AC7 mRNA 発現量は 60%低下した (図 24. A)。また、PGE₂ による cAMP 産生能も 65%抑制された (図 24. B)。この AC7 ノックダウン細胞において、UDP による [Ca²⁺]_i 上昇に対する PGE₂ の抑制作用は影響を受けなかった (図 24. C)。したがって、PGE₂ による抑制作用は AC に依存していないと考えられた。

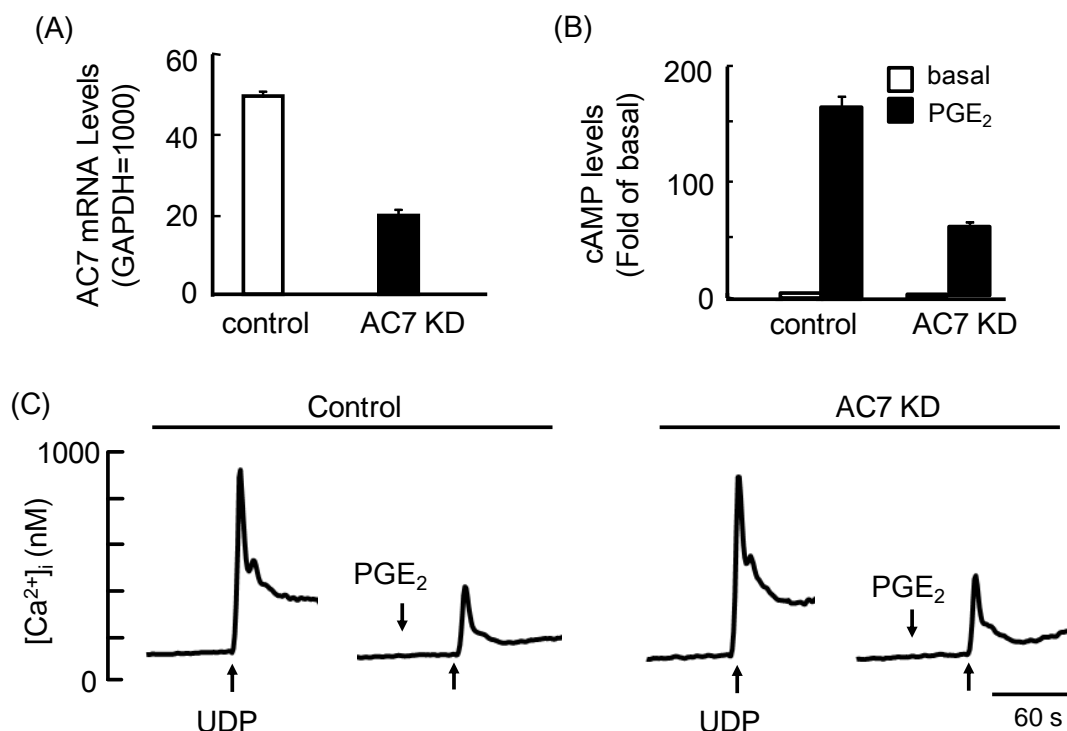


図 24. PGE₂ の応答におけるアデニル酸シクラーゼ (AC) タイプ 7 ノックダウンの影響

A: AC7 siRNA をトランスフェクトした J774 細胞の AC7 mRNA レベルの相対量。トランスフェクション 48 時間後に細胞を回収して、定量的 PCR にて測定した。値は GAPDH mRNA レベルで補正し、平均値±標準誤差で示した。
 B: コントロール及び AC7 ノックダウン細胞における PGE₂ 誘発 cAMP レベル上昇。細胞は PGE₂ (1 μ M) で 37°C、10 分間刺激した (n=3)。
 C: コントロール及び AC7 ノックダウン細胞における UDP 誘発 [Ca²⁺]_i 上昇とそれに対する PGE₂ の抑制作用の代表的なトレースを示した。

3-8 UDP による Gq-PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用におけるプロテインキナーゼ C の関与

近年、PGE₂ が PKC ϵ の活性化を介して P2Y 受容体の応答を抑制する可能性が報告された (Través et al., 2013)。そこで PKC の活性化剤であるホルボールエステル (PMA) の作用について検討した。UDP による [Ca²⁺]_i 上昇や PLC 活性化に対して、PMA (1 μ M) は PGE₂ と同様に抑制作用を示した (図 25. A 上段、B、C)。

PMA は長時間処理することで広く PKC を脱感作させ、結果的にその機能を阻害することが知られている。そこで、UDP 応答に対する PGE₂ の抑制作用における PKC 脱感作の影響を検討した。J774 細胞を PMA (1 μ M) で 24 時間前処理すると、UDP による [Ca²⁺]_i 上昇は影響されず、PMA による UDP 誘発 [Ca²⁺]_i 上昇の抑制作用は完全に消失した (図 25. A 下段、B、C)。すなわち、PMA に感受性のある PKC 機能がダウンレギュレーションされていることが示唆された。このような状態の細胞にお

いて、UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇や PLC 活性化に対する PGE_2 の抑制作用は影響を受けなかった（図 25. B、C）。

3-9 UDP による G_q -PLC 活性化に対する PGE_2 の抑制作用における Gi タンパク質の関与

EP 受容体は広範な G タンパク質と共役することが知られており、Gi タンパク質との共役も報告されている。Gi タンパク質の活性化はアデニル酸シクラーゼの抑制による cAMP レベルの低下作用やその $\beta\gamma$ サブユニットによる K^+ チャンネルの活性化などの作用が知られている。マクロファージ細胞においても Gi タンパク質の活性化が、細胞遊走能を活性化すること、あるいは K^+ チャンネルを活性化するなどしてその機能を調節することが報告されている（Kang et al., 2014）。

そこで百日咳毒素（PTX）を用いて UDP シグナルに対する PGE_2 の抑制作用における Gi タンパク質の関与について検討した。PTX は Gi タンパク質の ADP リボシル化により、その受容体との共役を特異的に阻害することが知られている（Katada et al., 1982）。PTX を 20 ng/mL で 18 時間前処理した J774 細胞において、UDP 刺激による IPs 加水分解に対する PGE_2 の抑制作用は、コントロール細胞と同等であったことから、Gi タンパク質非依存的な機構であることが示された（図 26）。

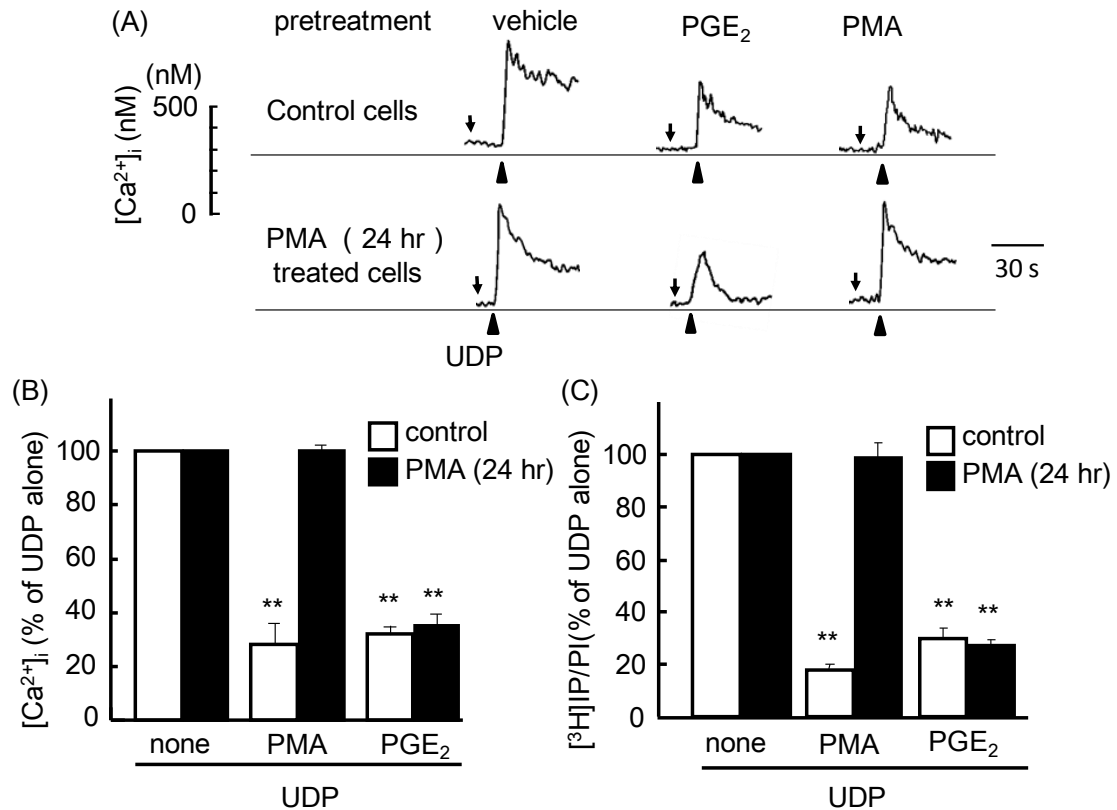


図 25. UDP 誘発応答に対する PGE₂ の抑制作用におけるプロテインキナーゼ C (PKC) ダウンレギュレーションの影響

A: コントロール細胞 (上段) 及び PKC ダウンレギュレーション細胞 (下段) における UDP 誘発 [Ca²⁺]_i 上昇の代表的なトレース。PKC のダウンレギュレーションは、細胞を 1 μ M PMA で 24 時間処理する事で行った。Fura-2 を取り込ませた細胞を 1 μ M の PGE₂ あるいは PMA で 1 分間前処理した後、UDP (10 μ M) で刺激した。B: UDP による [Ca²⁺]_i 上昇の最大反応の平均値を示した。細胞は 1 μ M の PGE₂ あるいは PMA の存在下、UDP で刺激した。値は、UDP 単独による応答の最大値に対する割合 (%) で示した (n=6)。

C: コントロール細胞及び PKC ダウンレギュレーション細胞における UDP 誘発 IP 産生亢進とそれに対する PGE₂ あるいは PMA の影響。細胞は 1 μ M PMA で 24 時間処理するとともに、[³H]イノシトールで代謝ラベルした。1 μ M の PGE₂ あるいは PMA で 2 分間前処理した後、UDP (10 μ M) で 37 $^{\circ}$ C、10 分間刺激した。結果は、UDP 単独の応答に対する割合 (%) として求め、平均値 \pm 標準誤差で示した (n=6)。***P* < 0.01 vs コントロール (Dunnett's 検定)

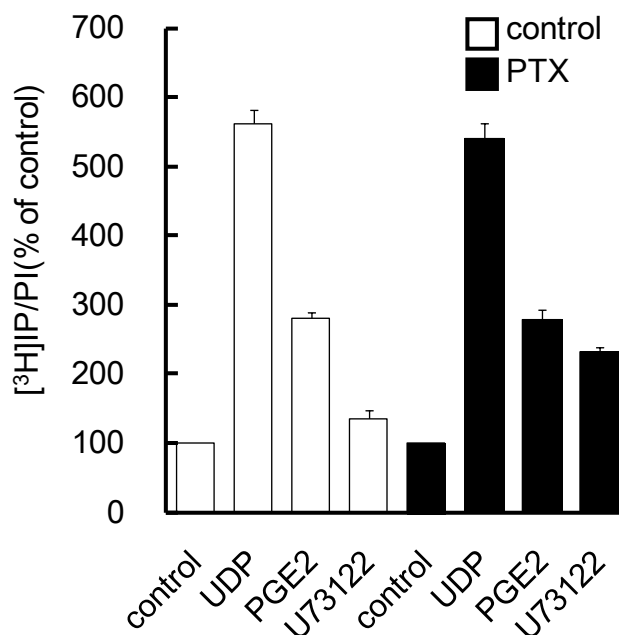


図 26. UDP シグナルに対する PGE₂ の抑制作用における Gi タンパク質の関与

UDP 誘発 IP 産生亢進に対する PGE₂ の抑制作用における百日咳毒素 (PTX) 前処理の影響。細胞は [³H] myo-inositol と共に PTX (20 ng/mL) で 18 時間培養した。ラベル細胞を PGE₂ (1 μM) あるいは PLC 阻害剤の U73122 (10 μM) の存在下あるいは非存在下で、UDP (10 μM) で 37 °C、10 分間刺激した。結果は、無刺激群の総 IP 量に対する割合 (%) で算出し、平均値±標準誤差で示した (n=3)。

3-10 受容体刺激に依存しない PLC 活性化に対する PGE₂ の作用

上記の検討から、PGE₂ により抑制を受ける標的が P2Y₆ 受容体-Gq-PLC 経路のどのステップであるかをさらに絞るために、受容体刺激に依存しない PLC 活性化、すなわちフッ化アルミニウム (AlF₄) による直接的な G タンパク質活性化あるいは、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンによる [Ca²⁺]_i 上昇を介する PLC 活性化に対する PGE₂ の作用を検討した。その結果、AlF₄あるいはイオノマイシン処理により、コントロールに対して 2 倍以上の明確な IP 産生が惹起された。これに対して PGE₂ は AlF₄による IP 産生を有意に抑制したが、カルシウムイオノフォア誘発 IP 産生は抑制しなかった (図 27)。

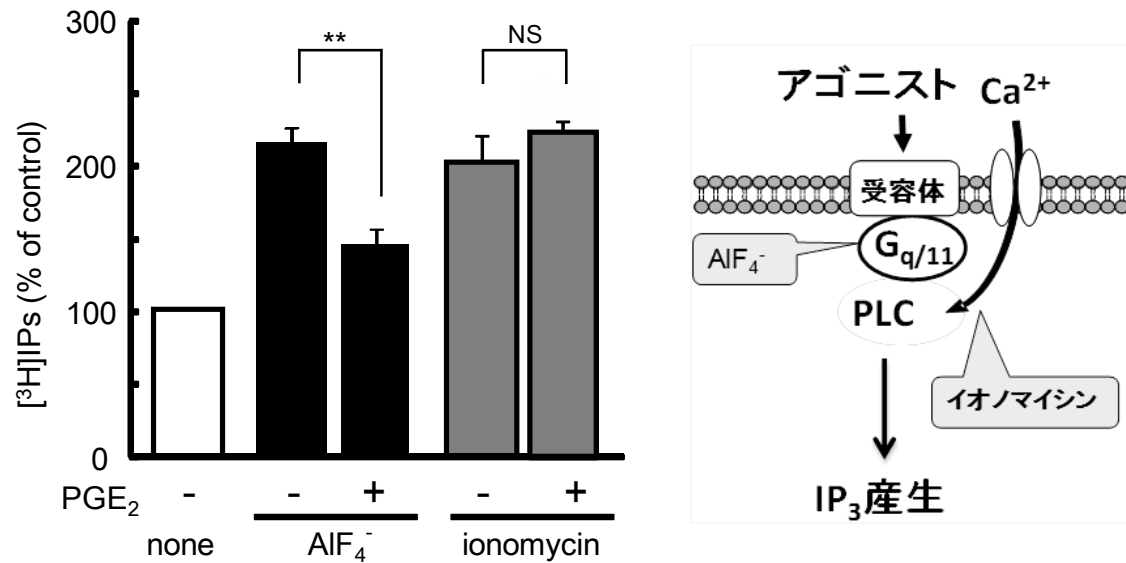


図 27. 受容体刺激に非依存的な PLC 活性化に対する PGE₂ の作用

[³H]イノシトールで代謝ラベルした細胞を、1 μM の PGE₂ の存在下、非存在下で、フッ化アルミニウム (AlF₄⁻, 30 mM) あるいはイオノマイシン (10 μM) で 37 °C、10 分間刺激した。結果は、無刺激群の総 IP 量に対する割合 (%) で算出し、平均値±標準誤差で示した (n=6)。***P*<0.01 (Mann-Whitney *U* test)、NS: not significant

右図には、AlF₄⁻とイオノマイシンの Gq-PLC 経路における活性化機構を示した。

3-11 UDP による Gq-PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用における Gs タンパク質の関与

本実験では、PGE₂/EP2 シグナルにおいて AC のさらに上流の Gs タンパク質の関与について検討した。J774 細胞を Gs タンパク質の α サブユニットに対する siRNA で処理すると、その mRNA の低下ならびにタンパク発現量の減少が認められ (図 28. A、B)、PGE₂ による cAMP 産生作用が低下した (図 28. C)。この状態で、UDP による PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用が解除されたことから (図 28. D)、PGE₂ による Gq-PLC の抑制作用に Gs タンパク質は関与すると考えられた。なお、PLC 阻害剤である U73122 は Gs ノックダウン細胞において、UDP による PLC 活性化を有意に抑制した (図 28. D)。

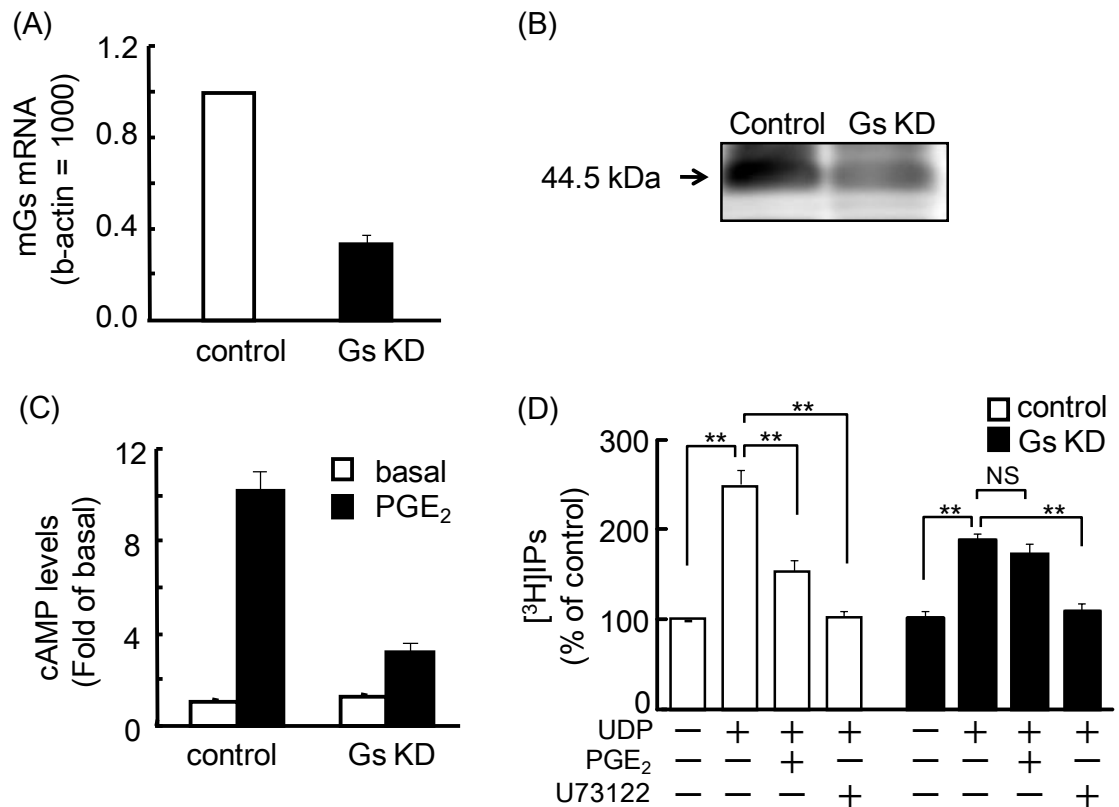


図 28. UDP 誘発 PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用における Gs タンパク質の役割

Gs タンパク質特異的 siRNA をトランスフェクションし、48 時間後の細胞を用いた。

A: コントロール及び Gs ノックダウン細胞の Gs mRNA の相対量は、定量的 PCR により測定した。値は、 β -アクチンの mRNA 量で補正した。

B: コントロール及び Gs ノックダウン細胞の全細胞溶解液における Gs タンパク質量は、抗マウス Gs タンパク質抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

C: コントロール及び Gs ノックダウン細胞における PGE₂ 誘発 cAMP レベル上昇。細胞は PGE₂ (1 μ M) で 37°C、10 分間刺激した。結果は basal レベルに対する増加率として算出した (n=3)。

D: コントロール及び Gs ノックダウン細胞を [³H]イノシトールで代謝ラベルし、PGE₂ (1 μ M) あるいは PLC 阻害剤の U73122 (10 μ M) の存在下あるいは非存在下で、UDP (10 μ M) で 37 °C、10 分間刺激した。結果は、無刺激群の総 IP 量に対する割合 (%) で算出し、平均値 \pm 標準誤差で示した (n=6)。***P*<0.01 vs UDP 単独 (Dunnett's 検定)、NS: not significant

第 4 節 考察

第 2 章では、マクロファージ J774 細胞において PGE_2 が $\text{UDP}/\text{P2Y}_6$ 受容体を介する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇および $\text{MIP-1}\alpha$ 放出応答を強力に抑制することを述べた (Ito and Matsuoka, 2008)。本章では、 PGE_2 による P2Y_6 受容体シグナルの抑制メカニズムについて検討した。 P2Y_6 受容体は Gq タンパク質共役型であり、アゴニストである UDP の濃度及び刺激時間依存的にホスホリパーゼ C (PLC) の活性化を介したイノシトールリン酸 (IP) 加水分解を促進し、 PGE_2 はこの UDP による応答を濃度依存的に抑制した (図 13)。また、 PGE_2 は前処理において作用を示すのみでなく、既に UDP 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇応答や PI 加水分解反応が生じている状態に対しても強力に抑制作用を示し、かつその作用発現は速やかであった (図 15)。マクロファージにおいて UDP による P2Y_6 受容体刺激は ERK あるいは p38 MAPK 活性を非常に強く増強した。一方、 PGE_2 は UDP によるこれらの MAPK の活性化を顕著に抑制した (図 16)。マクロファージにおける ERK あるいは p38 MAPK などの MAPK は、炎症性サイトカインの産生に寄与することが報告されている (Jia et al., 2015)。以上のことより、 PGE_2 は P2Y_6 受容体による Gq タンパク質の活性化を介する PLC の活性化シグナルの早い段階を抑制することで、その後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇応答や MAPK の活性化、さらには $\text{MIP-1}\alpha$ といったケモカイン産生を抑制している可能性が考えられた。

定量的 PCR により、J774 細胞に EP2 と EP4 の PGE_2 受容体の発現を確認し、 EP2 の mRNA 発現量は、 EP4 よりも 6 倍程度高いことが明らかとなった (図 17)。これと一致し、種々の EP 受容体アゴニストを用いて行った実験では、 EP2 受容体選択的アゴニストの ONO-AE1-259-01 が、 PGE_2 よりも作用が強く、 UDP 誘発 IP 蓄積に対する抑制作用における IC_{50} 値は、1 nM 以下であり、一方 EP4 受容体選択的アゴニストの ONO-AE1-329 は、10 μM という高濃度でも PGE_2 と比較してわずかに抑制したのみであった。加えて、 EP1 と EP3 受容体選択的アゴニストの影響は認められなかった。まとめると、本検討結果から PGE_2 が主に EP2 受容体の活性化により、 P2Y_6 受容体を介する PLC 活性化を阻害していることが示唆された (図 18)。しかしながら、本検討において、 EP2 受容体ならびに EP4 受容体選択的なアンタゴニストを用いた実験を行うまでは、 EP4 受容体を介する部分的な関与を排除することはできないと考えられる。 EP2 受容体ならびに EP4 受容体はどちらも Gs タンパク質を介するシグナル伝達を行う。これまでに Gs タンパク質を介する cAMP 上昇応答を、 Gi タンパク質が抑制的に作用することは明らかになっているが、 Gq タンパク質を介する応答に対する抑制性の G タンパク質シグナルはあまり知られておらず、この結果は非常に

興味深い調節機構であると考えられた。

今日、GPCR-Gq タンパク質-PLC シグナル伝達経路を制御するいくつかの因子が同定されている（図 29）（matsuoka et al., 2009）。例えば、GTP 結合 $G\alpha_q$ サブユニットによるシグナル伝達の強度や持続時間が、regulators of G protein signalling (RGS) として知られている GTPase-activating proteins (GAP) ファミリーによって制御されている等が報告されている(Hepler et al., 1999)。また、RGS2、RGS4 および RGS ドメインを有する G protein-coupled receptor kinase2 (GRK2) は、Gq タンパク質依存的な PLC 活性化を負に制御する事が知られている(Huang et al., 2007)。そこで、今回観察された PGE_2 による Gq-PLC シグナルの抑制が、このようなメカニズムで説明できるかを検討した。

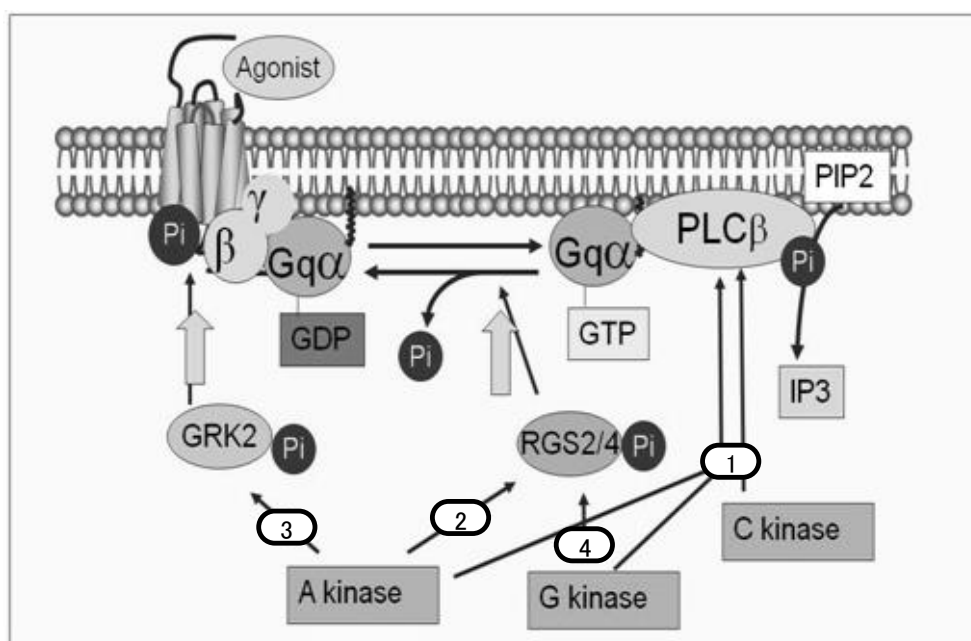


図 29. Gq-PLC シグナルの活性調節機構

Gq 共役型受容体が活性化されると GDP が結合した Gq の α サブユニットが GTP 結合型になり、PLC を活性化するが、この刺激作用は Gq の GTPase 活性によりリン酸が加水分解されると不活性化される。Gq を介した PLC の活性化の制御機構は、リン酸化による制御をはじめいくつか報告されている。

- ①PKA、PKC、PKG による PLC β のリン酸化による活性抑制。
 - ②RGS タンパク質による Gq α の GTPase 活性化。GAP として機能する RGS には、RGS2、RGS3、RGS4、RGS5、RGS16 などが知られている。
 - ③受容体のリン酸化による脱感作。
 - ④細胞内情報伝達の下流で Gq-PLC 相互作用の抑制 (Effector antagonist 作用)。この機構には、GRK2、RGS2、RGS3、RGS4 などが関わることが報告されている。
- RGS ; Regulator of G protein signaling、GRK2 ; G protein-coupled receptor kinase2)

マクロファージは、リポポリサッカライド (LPS) や炎症性サイトカインの刺激に応じて貪食活性を示すとともに種々の炎症性サイトカインやケモカインの産生を亢進 (Aronoff et al., 2004) するなど自然免疫応答を示すが、PGE₂ はこれらの応答を EP2 あるいは EP4 受容体の活性化を介して抑制的に制御する事が報告されている (Ikegami et al., 2001; Takayama et al., 2002)。EP2 と EP4 受容体は、いずれも Gs タンパク質と共役しているためアデニル酸シクラーゼを活性化して cAMP を上昇させる (Sugimoto and Narumiya, 2007)。増加した細胞内 cAMP は一般に、炎症性メディエーターの産生や貪食、殺菌等の自然免疫機能を抑制するため (Serezani et al., 2008)、いくつかの研究成果から、マクロファージにおける PGE₂ を介する自然免疫機能の抑制は、cAMP シグナル経路によって媒介されている可能性が示唆されている (Aronoff et al., 2004; Hasegawa et al., 2010; Takayama et al., 2002)。本研究においても、PGE₂ や EP2 受容体アゴニストが、J774 細胞において顕著な cAMP 上昇を引き起こすことを示した。さらに、ある特定の細胞、特に血管平滑筋細胞では、cAMP シグナル伝達経路が、プロテインキナーゼ A (PKA) により直接 PLC β アイソザイムをリン酸化する事で Gq タンパク質を介する PLC 活性化を抑制する事が示唆されている (Yue et al., 1998, 2000)。したがって、はじめはこの cAMP/PKA 依存的なメカニズムが EP2 受容体を介する PLC 活性化の抑制に関与しているのではないかと考えた。しかしながら、本研究結果から P2Y₆ 受容体を介する PLC 活性化に対する PGE₂ の抑制作用は、その cAMP 依存性のシグナル機構のみでは完全に説明できない事が示唆された。

第一に、UDP による [Ca²⁺]_i 上昇や IP 産生に対する PGE₂ や EP2 アゴニストの抑制は、cAMP 産生作用よりも低濃度で認められた。例えば、10 nM の PGE₂ や 1 nM ONO-AE1-259-01 (EP2 受容体アゴニスト) は、cAMP レベルに影響せずに UDP 誘発の IP 産生を有意に抑制した (図 17, 18)。また、PGE₂ およびミソプロストールを用いた検討では、両アゴニストによる cAMP 上昇作用と PI 加水分解反応の抑制作用に、明らかな解離が認められた (図 20)。さらに、PGE₂ 刺激とは異なり、アデニル酸シクラーゼ活性化剤のフォルスコリン (FK) や細胞膜透過性 cAMP 誘導体の dbcAMP による直接的な cAMP 経路の活性化は UDP 誘発の IP 産生にほとんど影響しなかった (図 19. C)。これらの結果と同様に、PKA 阻害剤の H89 も PGE₂ による UDP 誘発 [Ca²⁺]_i 上昇の抑制を解除しなかった (図 19. A)。加えて、cAMP シグナルの下流で、PKA 以外に基質として機能する Epac 経路の関与も否定された (図 21)。最後に J774 細胞に高発現しているアデニル酸シクラーゼのタイプ 7 を特異的な siRNA をトランスフェクションしてノックダウンすることにより、AC7 の mRNA の発現低下及び PGE₂ による cAMP 産生の低下が認められた (図 24)。しかし、UDP

による応答に対する PGE_2 の抑制作用は、 AC7 ノックダウンにより影響を受けなかった。これらの結果より、 PGE_2 による EP2 受容体刺激による Gq-PLC 活性化の抑制には、 cAMP シグナル経路以外のメカニズムが関与している可能性が考えられた。一方、 LPS 刺激による J774 細胞からの $\text{MIP-1}\alpha$ 分泌応答に対して、 dbcAMP は PGE_2 と同様に強力に抑制したことから、従来から報告されている cAMP/PKA 経路によるマクロファージの自然免疫応答の抑制機構が確認された（図 22）。これは言い換えれば、本研究において解析対象としている調節機構は、従来の報告とは異なる事を強調する結果と考えられた。

血小板機能においては、 NO/cGMP 経路の活性化が、 cAMP/PKA 経路の活性化と同様に作用する事が報告されている（Matsuoka et al., 1991）が、 PGE_2 の抑制作用における NO/cGMP 経路の関与は確認できなかった（図 23）。さらに、 EP 受容体は広範な G タンパク質と共役することから、 Gi タンパク質を阻害する百日咳毒素（ PTX ）を用いて検討を加えたが、 UDP シグナルに対する PGE_2 の抑制機構は Gi タンパク質非依存的であることが明らかとなった（図 26）。 EP4 受容体において、 cAMP 非依存的なシグナル伝達機構の報告があり、それは Gs-cAMP シグナル経路に加えて、 EP4 受容体会合タンパク質を介する作用であることが報告されている（Minami et al., 2008）。この新しい経路は G タンパク質非依存的に EP4 受容体シグナル情報を伝達し、 $\text{nuclear factor-kappa B}$ （ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ）や $\text{extracellular signal-regulated kinase}$ （ ERK ）シグナル経路の活性化を抑制し、炎症性サイトカインの転写を阻害する。 PGE_2 による EP2 受容体活性化シグナルは、ほとんどの報告で cAMP 産生の増加によるとされており（Akaogi et al., 2004; Armstrong, 1955）、 EP4 受容体の様なシグナル伝達機構は、 EP2 受容体では未だ報告されていない。近年、チオグリコール酸で処理した活性化マウスマクロファージにおいて、 PGE_2 が ATP や UTP 、 UDP による P2Y 受容体を介する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制することが報告され、この調節メカニズムは EP 受容体非依存的であり、 $\text{PKC}\epsilon$ や PKD といったリン酸化酵素の活性化を介していることが示された（Través et al., 2013）。これは本研究の結果と類似しているが、我々は EP2 受容体選択的なアゴニストが PGE_2 の作用を模倣することを示すことで、 EP2 受容体の関与を明確に示した。さらに、ホルボールエステルである PMA を長時間処理する事により PKC をダウンレギュレーションさせた際に、 UDP 誘発応答に対して PMA による抑制作用は消失したが、 PGE_2 による抑制作用は解除されなかった事を証明した（図 25）。これにより、 P2Y_6 受容体を介する PLC 活性化に対する PGE_2 の抑制に PKC が関与しないことを明らかにした。この報告間の矛盾の理由は明らかではないが、本研究の結果は、 PGE_2 によるマクロファージ機能の抑制が EP2 受容体を介して起こるという先行研究に一致している（Ikegami et al., 2001）。

受容体シグナルの調節には、エンドサイトーシスによる機構も報告されている。エンドサイトーシスは細胞膜受容体を制御する GPCR の作用の 1 つであり、受容体自身のリサイクリングおよび分解を調整するように受容体からのシグナル伝達に関与する。制御された細胞膜受容体のインターナリゼーションは、特定のリガンドに対する細胞感受性を調整することが出来る。実際、PGE₂-EP2 シグナルにより PAR-2 (protease-activated receptor-2) 受容体のインターナリゼーションが起こることや (Komatsu H., 2013)、PGE₂によるマクロファージ Ca²⁺シグナルの抑制は PKC を介した細胞膜受容体の脱感作である可能性も示唆されている (Través et al., 2013)。本研究では、PGE₂による EP2 受容体刺激が、P2Y₆受容体のインターナリゼーションを引き起こすかどうかを直接測定してはいない。しかし、PGE₂は P2Y₆受容体をはじめとする GPCR の Gq-PLC シグナル伝達の抑制作用の発現に前処理時間をほとんど要しないばかりか、既に Gq-PLC 活性化シグナルがインプットされている状態に処理した場合でも、強力かつ速やか（数秒以内）に抑制作用を発現することを証明した（図 15）。したがって、PGE₂による P2Y₆受容体シグナルの抑制が、受容体のリン酸化等によるインターナリゼーションにより制御されている可能性は小さいと考えられた。

本研究では、EP2 受容体を介する Gs タンパク質活性化が、PGE₂による UDP 誘発 PLC 活性化の抑制に重要であることを示した。すなわち、J774 細胞において Gs タンパク質の α サブユニットに対する siRNA のトランスフェクションにより、Gas の mRNA 及びタンパク質レベルで発現を抑制すると、PGE₂による cAMP 産生が低下しただけでなく、UDP 誘発 PLC 活性化に対する PGE₂の抑制作用も消失した（図 28）。さらに、PGE₂はフッ化アルミニウム (AlF₄⁻) による直接的な PLC 活性化を明確に抑制したが、Ca²⁺イオノフォアであるイオノマイシン刺激による非特異的な PLC 活性化に対しては抑制しなかった（図 27）。AlF₄⁻による G タンパク質の活性化の制御は、GTPase 活性化タンパク質 (GAP) 非依存的であることが知られているため、PGE₂の作用には RGS や GRK2 等の GAP 関連因子や PLC の直接的な抑制は関与せず、Gq と PLC の相互作用を抑制している可能性が考えられた。実際、HEK 細胞に Gs タンパク質を過剰発現すると、抗 PLC 抗体による免疫沈降で共沈してくる Gq タンパク質の量がコントロールに比較して減少することから、Gs タンパク質に依存して Gq と PLC の相互作用が阻害される可能性があると思われた（データ未掲載）。Gq-PLC シグナル伝達の抑制に必要な Gs タンパク質が媒介するシグナルの下流因子を決定するには更なる検討が必要であり、各精製タンパク質を用いた in vitro 再構成系などによる検討が直接的な裏付けになると考えられる。

また、異なるリガンド刺激による Gs タンパク質活性化の影響についても検討した。

J774 細胞には Gs タンパク質と共役するアドレナリン β 受容体も存在しており、その刺激によっても PGE₂ と同様な作用が認められた。すなわち、アドレナリンやイソプレナリンなどの β 受容体アゴニストの刺激により、UDP による Ca²⁺シグナルに対して PGE₂ の様な抑制作用が認められた。また、アドレナリンやイソプレナリンの作用は、非選択的 β 受容体のアンタゴニストであるプロプラノロールにより抑制された(データ未掲載)。 β 受容体には β 1 から β 3 の 3 つのサブタイプが知られているが、いずれも Gs タンパク質と共役している。したがって、J774 細胞においては、他の受容体を介する Gs シグナルによっても Gq-PLC シグナルが抑制されることが示された。しかしながら、EP 受容体の非選択的アゴニストのミソプロストールでは、cAMP を上昇させるにも関わらず、PGE₂ の様な抑制作用を示さない事から (図 20)、ミソプロストールは異なる作用点による cAMP の上昇作用を有するか、Gs タンパク質の偏った活性化により、Gq-PLC に対しては抑制性のシグナルを流さない可能性も考えられた。今後、ミソプロストールの作用機序を詳細に検討する事も、本メカニズムを解くカギになると期待される。

以上のことより、PGE₂ は EP2 受容体刺激により Gs タンパク質に依存的であるが、その下流因子として良く知られている cAMP や PKA あるいは Epac にはよらない経路で、Gq タンパク質依存的な PLC 活性化を抑制する、新しい情報伝達制御機構が示唆された。

総括

本研究では、虚血性疾患からメタボリックシンドロームなどの代謝性疾患、腫瘍の形成・転移に至るまで、共通の基盤病態として炎症応答が存在し、その制御が重要視されていることを受け、炎症応答で中心的な役割を果たすマクロファージ機能制御に注目した。また、炎症病巣には様々な制御因子が一堂に会していることが想定され、それらが相互に影響し合い細胞障害の初期応答因子として働くと考えられているが、各因子の相互作用について着目した報告は少なく不明な点が多いことに着目し、細胞外ヌクレオチドによるプリン作動性シグナルと主要なケミカルメディエーターの一つであるプロスタグランジン（PG） E_2 による機能制御を検討した。

第2章において、炎症や傷害病変においてプリン作動性シグナルおよび PGE_2 シグナルは相互にマクロファージ機能を制御していることを示した。すなわち ATP や UDP によるプリン作動性シグナルはマクロファージ機能に対して、細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）上昇やケモカイン産生亢進といった興奮性応答を示すことを明らかにした。一方、 PGE_2 は、細胞外ヌクレオチドをはじめ PAF や LTD_4 等による応答を強く抑制し、マクロファージの興奮性応答を広く負に制御すると考えられた（図30）。

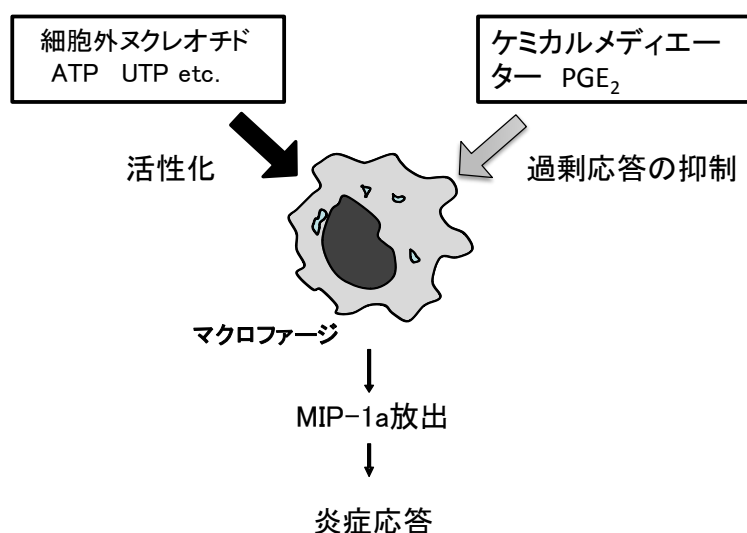


図 30. マクロファージ機能に対する細胞外ヌクレオチドと PGE_2 の影響

PGE_2 は、1つの分子が炎症促進と抗炎症とに働く代表的なケミカルメディエーターであるが、本研究では短期的にはマクロファージ機能を強力に抑制することを示した。この調節機構の病態生理との関連を想像してみると、例えばインフルエンザ脳炎の発

生機構の一旦を説明できるのではないかと考えられる。インフルエンザ脳炎は突然の意識消失や痙攣を特徴として、小児に多発し約 30%の死亡率を示すと言われている。インフルエンザ感染時に、特に小児にアスピリンをはじめメフェナム酸やジクロフェナクといったシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害を機序とする非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) を投与すると認められる Reye 症候群、急性壊死性脳症などが該当する。すなわち、インフルエンザ感染において NSAIDs により PGE₂ 産生が抑制されることにより、急性期におけるその抗炎症作用、免疫抑制作用が抑制された結果、多様な炎症性サイトカイン産生が亢進しサイトカインストームを引き起こし、脳炎の重症化に関わっている可能性が考えられないだろうか。COX 阻害作用を示さな解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンが小児のインフルエンザ感染に比較的安全性が高いとされる現状からも COX による産生物質の重要性が推察される。

今回検討した相互作用は、主に急性炎症期を想定しているが、慢性的にはまた異なる制御が働いていると考えられる。実際、マクロファージに PGE₂ を長時間処理すると ATP 分解酵素の遺伝子発現変動などが認められている (データ未掲載)。また成宮ら (Narumiya S, 2007) は、長時間の PGE₂ 刺激が、EP2 受容体刺激を介して、T 細胞の活性化や種々のサイトカイン受容体の産生を亢進し、動脈瘤や炎症やがんの進展を促進する事も報告している。したがって、PGE₂ は組織や存在するタイミングにより、炎症反応を複雑にコントロールしていることが推察され、炎症応答及びそれを基盤とした疾患の制御メカニズムの解明には更なる検討が必要である。

第 3 章では、PGE₂ の抑制作用が最も顕著に認められる UDP/P2Y₆ 受容体シグナルに焦点を当てその調節機構を解析した。その結果、これまでの報告とは異なる新規な Gq タンパク質シグナル抑制機構の可能性を見出した。マウスマクロファージ J774 細胞において UDP による P2Y₆ 受容体の刺激は、イノシトールリン酸 (PIs) 産生の亢進とともに [Ca²⁺]_i 上昇や MAPK の活性化を引き起こし、マクロファージ炎症性タンパク質 (MIP)-1 α の遊離を促進した。PGE₂ は UDP によるこれらの応答を強く抑制したことから、Gq-PLC-Ca²⁺ シグナル経路を阻害すると考えられた。さらに、PGE₂ は AlF₄⁻ による G タンパク質依存的な PLC の活性化は抑制したが、イオノマイシンによる直接的な PLC 活性化は抑制しないことから、G タンパク質と PLC との相互作用を阻害している可能性が考えられた。一方、マクロファージ細胞において、PGE₂ は主に EP2 に作用し、Gs タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼの Type 7 (AC7) を刺激して cAMP-PKA を活性化すると考えられた。しかし、Gq-PLC-Ca²⁺ シグナルに対する PGE₂ の抑制作用は、様々な cAMP/PKA 経路活性化試薬では模倣できず、PKA 阻害薬や AC7 ノックダウンにより cAMP 産生を阻害しても消失しなかった。また、PKC (PMA で脱感作されるタイプ) の関与も否定された。ところが Gs ノックダウン

により有意に減弱した。したがって、 PGE_2 による Gq-PLC-Ca^{2+} シグナルの抑制作用には、 Gs タンパク質依存的だが、 cAMP を含めた下流因子には非依存的な新しい機構が関与すると考えられた。近年、 P2Y_6 受容体は $\text{TNF-}\alpha$ による血管内皮細胞障害、痛風において尿酸による炎症応答、喘息における気道炎症と組織リモデリングなど、様々な炎症性疾患への関与が認識されている。したがって、 P2Y_6 受容体シグナルの関与が疑われる様々な炎症性疾患の寛解に PGE_2 が大きく寄与する可能性が考えられる。また、プリン受容体とプロスタノイド受容体の間のクロストークの解析は、炎症応答の病態生理学的な理解を進めるのに役立つと期待される。さらに、この調節機構を Gq シグナルの Gs シグナルによる抑制と捉えることができる。それぞれの G タンパク質に共役する受容体は多数知られていることから、この制御機構が普遍的なものと考えたと、様々な生理応答の制御に関与している可能性が想像できる。しかし実際には、免疫系細胞においては、 Gq タンパク質シグナルが cAMP 依存性に抑制されることは知られているが、 PC12 や NG108-15 などの神経系の細胞では、 cAMP は Gq 共役型受容体刺激による $\text{PLC-}\beta$ の活性化を全く抑制しないとの報告もある。したがって、この機構の普遍性について、異なる細胞あるいは組織で検討する必要がある。

種々のホルモンや神経伝達物質の情報は 7 回膜貫通構造を持つ GPCR で認識され、受容体に共役した三量体 G タンパク質を介して細胞内情報伝達系へと伝播される。ホスファチジルイノシトールに特異的な PLC は、三量体 G タンパク質のエフェクターの一つで、 GPCR で認識されたホルモンや神経伝達物質の情報を、 Ca^{2+} に依存した細胞内情報に変換し、興奮性生理反応の引き金として重要な役割を果たしている。この PLC シグナル伝達系の過剰な応答は、高血圧や喘息、アレルギー疾患、血栓症など様々な病態と関連した反応を引き起こすことから、これを抑制的に調節することは疾病の治療戦略として用いられてきた。 GPCR の刺激効果は $\text{G}\alpha_q$ と各 $\text{G}\beta\gamma$ でシグナル伝達が行われ PLC を活性化する。 GPCR の下流で働く代表的なエフェクターである cAMP 合成酵素のアデニル酸シクラーゼが、抑制性 G タンパク質の Gi により負に制御されるのに対し、 PLC シグナル伝達系を抑制する G タンパク質は存在しない。他の GPCR の刺激が cAMP や cGMP などの細胞内情報伝達系を介し間接的に PLC シグナルを抑制することが知られているが、その機構は十分に解明されていない。最近、 cAMP を介した他の受容体のクロストークや、 PLC 活性化に関わる $\text{G}\alpha_q$ のスイッチを切るタンパク質の役割が解明された。さらに、疾患モデル動物やヒトゲノム解析の結果から PLC シグナル伝達系の負の制御機構の不全が循環器系疾患の発症に関わることが示唆されている (Ieffkowitz RJ., 1996)。例えば、血管平滑筋収縮による血圧上昇、消化管運動の亢進、気管支平滑筋収縮による気道狭窄、内分泌および外分泌の亢進、血小板活性化による血栓形成、白血球やリンパ球、マクロファージなど免疫系

細胞のサイトカイン産生亢進など枚挙にいとまがない。このため PLC シグナル伝達系に共役した GPCR の阻害薬は、高血圧における α_1 アドレナリン阻害薬や、アンギオテンシン II 受容体阻害薬(ARB)のように、優れた治療薬になっている。しかし、原因となる過剰刺激が多様な場合、特定の受容体遮断薬では治療効果が不十分で、実際、高血圧患者の 70 % は、 α_1 ブロッカーや ARB など受容体遮断薬ではコントロール不十分であるといわれている (Harris et al., 2008)。GPCR による PLC シグナル伝達系は、入りの受容体が多様であっても、その下流では Gq の α サブユニットまたは Gi/o に由来する $\beta\gamma$ サブユニットによって媒介される。この $G\alpha_q$ -PLC または $G\beta\gamma$ -PLC を負に制御できれば、より広範な生理応答を制御する事が可能になると考えられる。

まとめると、本知見は、 PGE_2 受容体とプリン受容体間のクロストークの解析に限局されるのではなく、新たな細胞情報ネットワークを統合する G タンパク質シグナル調節機構の一端を明らかにする糸口となると期待される。また、炎症応答をはじめ種々の病態解析や医薬品の作用機構の解析において、複数の受容体間での相互作用にも意識を向けることの重要性を示すものと考ええる。さらに、Gq-PLC シグナルは種々のホルモンや神経伝達物質からの多くの情報が収束される経路である。この抑制性調節機構の key となる分子の特定にはさらなる検討が必要であるが、本研究成果は Gq-PLC シグナルの抑制を標的にすることで、興奮性の生理機能応答を背景とする血圧上昇、気管支狭窄、免疫細胞のサイトカイン産生亢進、血栓形成などの様々な病態に対して、受容体遮断薬よりも広いスペクトルを持つ治療薬の創出につながるものと期待される。

最後に、本研究で得られた結果に基づいたマクロファージにおける炎症応答を抑制するシグナルの調節機構の概念図を示した (図 31)。

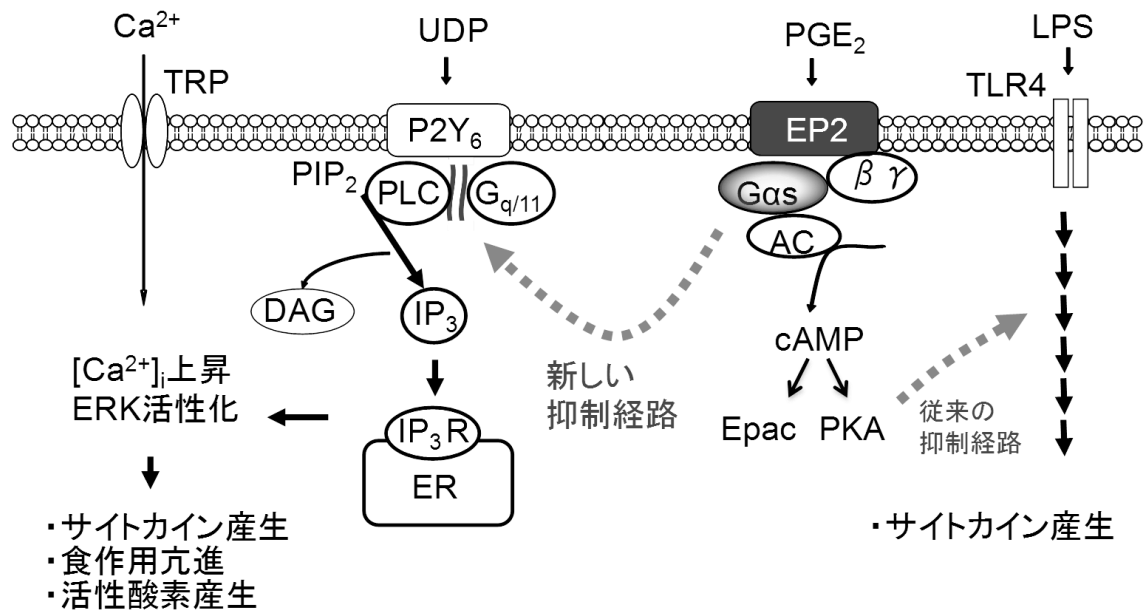


図 31. マクロファージ細胞における炎症応答シグナルの PGE₂ による抑制メカニズムの概念図

UDP による P2Y₆ 受容体の刺激は、G_q/PLC の活性化を介して細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇や ERK の活性化を示す。また、マクロファージ炎症性タンパク質(MIP)-1 α などのケモカイン産生を促進し、炎症性応答を示す。これに対して PGE₂ は EP2 受容体を介して抑制する。そのメカニズムは従来から知られている LPS 刺激などに対する cAMP/PKA 経路を介したのではなく、G_s タンパク質に依存するが、cAMP 以下の因子には非依存的な機構により、G_q タンパク質による PLC 活性化を抑制することが推察される。

謝辞

本研究は、高崎健康福祉大学薬学部 薬効解析学研究室で行われました。本研究を遂行するにあたり、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました高崎健康福祉大学薬学部 薬効解析学研究室教授 松岡功先生に謹んで御礼申し上げます。

本論文を審査して戴き、適切かつ有益な御助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室教授 堅田利明先生、東京大学大学院薬学系研究科・衛生化学教室教授 新井洋由先生、東京大学大学院薬学系研究科・微生物薬品化学教室教授 関水和久先生、東京大学大学院薬学系研究科・薬品作用学教室教授 池谷裕二先生、東京大学大学院薬学系研究科・衛生化学教室講師 河野望先生に深く感謝申し上げます。

本研究に用いた各プロスタグランジン受容体作動薬及び拮抗薬をご提供いただきました小野薬品工業株式会社に厚く御礼申し上げます。

最後に公私にわたり、多大なる御協力、御激励を賜りました高崎健康福祉大学薬学部の諸氏に深く感謝致します。

参考文献

- Abbracchio MP, Burnstock G., 1998. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* **78**, 113–145.
- Akaogi, J., Yamada, H., Kuroda, Y., Nacionales, D.C., Reeves, W.H., Satoh, M., 2004. Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF- α and IL-6 production. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 227-236.
- Armstrong, R., 1955. Investigation of the inhibitory effects of PGE₂ and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 2903–2908.
- Aronoff, D.M., Canetti, C., Peters-Golden, M., 2004. Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E- prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J. Immunol.* **173**, 559-565.
- Bar, I., Guns, P.-J., Metallo, J., Cammarata, D., Wilkin, F., Boeynants, J.-M., Bult, H., Robaye, B., 2008. Knockout mice reveal a role for P2Y₆ receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **74**, 777-784.
- Bommireddy R, Saxena V, Ormsby I, Yin M, Boivin GP, Babcock GF, Singh RR, Doetschman T., 2003. TGF- β 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes. *J Immunol.* **170**, 4612-4622.
- Bowler JW, Bailey RJ, North RA, Surprenant A., 2003. P2X₄, P2Y₁ and P2Y₂ receptors on rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol.* **140**, 567–575.
- Brough D, Le Feuvre RA, Wheeler RD, Solovyova N, Hilfiker S, Rothwell NJ, et al., 2003. Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 β and IL-1 α from murine macrophages. *J Immunol.* **170**, 3029–3036.
- Burnstock G., 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* **58**, 58–86.
- Burnstock, G., 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1471-1483.
- Butcher BA, Kim L, Panopoulos AD, Watowich SS, Murray PJ, Denkers EY., 2005. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- α in host macrophages. *J Immunol.* **174**, 3148-3152.
- Charles N. Serhan, Nan Chiang, Thomas E. Van Dyke, 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* **8**, 349-361.
- Cazevieuille, C., Muller, A., Meynier, F., Dutrait, N., Bonne, C., 1994. Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons. *Neurochemistry international* **24**, 395-398.

- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Cipollone F, Fazio ML, Iezzi A, Cuccurullo C, De Cesare D, Uchino S, Spigonardo F, et al., 2005. Association between prostaglandin E receptor subtype EP4 overexpression and unstable phenotype in atherosclerotic plaques in human. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**, 1925-31.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* **450**, 566-569.
- Coutinho-Silva R, Ojcius DM, Gorecki DC, Persechini PM, Bisaggio RC, Mendes AN, et al., 2005. Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol.* **69**, 641-655.
- Cox MA, Gomes B, Palmer K, Du K, Wiekowski M, Wilburn B, Petro M, Chou CC et al., 2005. The pyrimidinergic P2Y6 receptor mediates a novel release of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytic cells stimulated with UDP. *Biochem Biophys Res Commun.* **330**, 467-73.
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A., 2004. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* **25**, 4-7.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi, O.R., 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* **97**, 587-600.
- Di Virgilio F., 2007. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci.* **28**, 465-472.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM., 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* **101**, 890-898.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F., 1997. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med.* **185**, 579-582.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., Di Virgilio, F., 2006. The P2X₇ receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* **176**, 3877-3883.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* **260**, 3440-3450.
- Guerra AN, Fisette PL, Pfeiffer ZA, Quinchia-Rios BH, Prabhu U, Aga M, et al., 2003. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. *J Endotoxin Res.* **9**, 256-263.
- Harris DM, Cohn HI, Pesant S, Eckhart AD., 2008. GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. *Clin Sci (Lond).* **115**, 79-89.

- Hasegawa, S., Ichiyama, T., Kohno, F., Korenaga, Y., Ohsaki, A., Hirano, R., Haneda, Y., Fukano, R., Furukawa, S., 2010. Prostaglandin E₂ suppresses beta1-integrin expression via E-prostanoid receptor in human monocytes/macrophages. *Cell. Immunol.* **263**, 161-165.
- Hepler, J.R., 1999. Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends. Pharmacol. Sci.* **20**, 376-382.
- Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A., 1999. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 10501-10506.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S., 2001. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci.* **21**, 1975-82.
- Huang, J., Zhou, H., Mahavadi, S., Sriwai, W., Murthy, K.S., 2007. Inhibition of Gαq-dependent PLC-β1 activity by PKG and PKA is mediated by phosphorylation of RGS4 and GRK2. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **292**, C200-C208.
- Humphreys BD, Dubyak GR., 1998. Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol.* **64**, 265–273.
- Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, et al., 1998. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem.* **273**, 27170–27175.
- Iadecola, C., Niwa, K., Nogawa, S., Zhao, X., Nagayama, M., Araki, E., Morham, S., Ross, M.E., 2001. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 1294-1299.
- Ikegami, R., Sugimoto, Y., Segi, E., Katsuyama, M., Karahashi, H., Amano, F., Maruyama, T., Yamane, H., Tsuchiya, S., Ichikawa, A., 2001. The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **166**, 4689-4696.
- Inoue K, Tsuda M, Koizumi S., 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J Pharmacol Sci.* **94**, 112–114.
- Ito, M., Matsuoka, I., 2008. Regulation of purinergic signalling by prostaglandin E₂ in murine macrophages. *J. Pharmacol. Sci.* **107**, 443-450.
- Iwasaki K, Noguchi K, Endo H, Kondo H, Ishikawa I., 2003. Prostaglandin E₂ downregulates interleukin-12 production through EP4 receptors in human monocytes stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and interferon-gamma. *Oral Microbiol Immunol.* **18**, 150–155.
- Jacob, F., Novo, C., Bachert, C., Van Crombruggen, K., 2013. Purinergic signalling in inflammatory cells:

- P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal*. **9**, 285-306.
- Jia H, Liu S, Wu J, Hou S, Xin T, Guo X, Yuan W, Gao X, Zhang G, Li M, Qu H, Zhu H., 2015. Recombinant TB9.8 of *Mycobacterium bovis* Triggers the Production of IL-12 p40 and IL-6 in RAW264.7 Macrophages via Activation of the p38, ERK, and NF- κ B Signaling Pathways. *Inflammation*. **38**, 1337-1346.
- Jing H, Vassiliou E, Ganea D., 2003. Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. *J Leukoc Biol*. **74**, 868–879.
- Kabashima K1, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Tsuboi K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Miyachi Y, Ichikawa A, Narumiya S., 2002. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest*. **109**, 883-893.
- Kahlenberg JM, Lundberg KC, Kertesz SB, Qu Y, Dubyak GR., 2005. Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. *J Immunol*. **175**, 7611–7622.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. **116**, 1494–1505.
- Kang BH, Shim YJ, Tae YK, Song JA, Choi BK, Park IS, Min BH., 2014. Clusterin stimulates the chemotactic migration of macrophages through a pertussis toxin sensitive G-protein-coupled receptor and G $\beta\gamma$ -dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. **445**, 645-650.
- Katada T, Ui M., 1982. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **79**, 3129-3133.
- Katsuyama M, Ikegami R, Karahashi H, Amano F, Sugimoto Y, Ichikawa A., 1998. Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. *Biochem Biophys Res Commun*. **251**, 727–731.
- Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y., 2015. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*. **51**, 414-421.
- Kawano, T., Anrather, J., Zhou, P., Park, L., Wang, G., Frys, K.A., Kunz, A., Cho, S., Orio, M., Iadecola, C., 2006. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nature medicine* **12**, 225-229.
- Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, Guan Y, Coffee K, Funk CD, Magnuson MA, Oates JA, Breyer MD, Breyer RM., 1999. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat Med*. **5**, 217-220.
- Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA., 1999. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J Neurosci*. **19**, 7289–7299.

- Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al., 2007. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*. **446**, 1091–1095.
- Komatsu H, Enjouji S, Ito A, Ohama T, Sato K., 2013. Prostaglandin E(2) inhibits proteinase-activated receptor 2-signal transduction through regulation of receptor internalization. *J Vet Med Sci*. **75**, 255-261.
- Kubo, S., Takahashi, H.K., Takei, M., Iwagaki, H., Yoshino, T., Tanaka, N., Mori, S., Nishibori, M., 2004. E-prostanoid (EP)2/EP4 receptor-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells and induction of helper T2 polarization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**, 1213-1220.
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al., 2002. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol*. **168**, 6436–6445.
- Laoui D, Van Overmeire E, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Raes G., 2014. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Front Immunol*. **5**, 489.
- Lazarus, M., Kubata, B.K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y., Hayaishi, O., 2002. Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 336-341.
- Lefkowitz RJ., 1996. G protein-coupled receptors and receptor kinases: from molecular biology to potential therapeutic applications. *Nat Biotechnol*. **14**, 283-286.
- Ma X, Aoki T, Tsuruyama T, Narumiya S., 2015. Definition of Prostaglandin E2-EP2 Signals in the Colon Tumor Microenvironment That Amplify Inflammation and Tumor Growth. *Cancer Res*. **75**, 2822-2832.
- MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Nöehren G, Kristariyanto Y, et al., 2013. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol*. **190**, 565-577.
- Marcet B, Horckmans M, Libert F, Hassid S, Boeynaems JM, Communi D., 2007. Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J Cell Physiol*. **211**, 716– 727.
- Matsuoka I, Nakahata N, Nakanishi H., 1989. Inhibitory effect of 8-bromo cyclic GMP on an extracellular Ca²⁺-dependent arachidonic acid liberation in collagen-stimulated rabbit platelets. *Biochem Pharmacol*. **38**, 1841-1847.
- Matsuoka, I., Zhou, Q., Ishimoto, H., Nakanishi, H., 1995. Extracellular ATP stimulates adenylyl cyclase and phospholipase C through distinct purinoceptors in NG108-15 cells. *Mol. Pharmacol*. **47**, 855-862.
- McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., Breyer, R.M., Andreasson, K., 2004. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci* **24**, 257-268.

- Minami T, Nakano H, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, et al., 2001. Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E₂-induced pain responses by use of EP1 and EP3 receptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* **133**, 438–444.
- Minami, M., Shimizu, K., Okamoto, Y., Folco, E., Ilasaca, M.-L., Feinberg, M.W., Aikawa, M., Libby, P., 2008. Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF- κ B1 and attenuates macrophage activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 9692-9703.
- Morris, A. J. and Malbon, C. C., 1999. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.* **79**, 1373-1430.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **79**, 1193-1226.
- Narumiya, S., 2007. Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **83**, 296-319.
- Neves, S. R., Ram, P. T. and Iyengar, R., 2002. G protein pathways. *Science.* **296**, 1636-1639.
- Ohkubo, S., Kimura, J., Matsuoka, I., 2000a. Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1667-1672.
- Ohkubo S, Kimura J, Matsuoka I., 2000b. Correlation between adenine nucleotide-induced cyclic AMP elevation and extracellular adenosine formation in NG108-15 cells. *Jpn J Pharmacol.* **84**, 325–333.
- Ohkubo, S., Kumazawa, K., Sagawa, K., Kimura, J., Matsuoka, I., 2001. β,γ -Methylene ATP-induced cAMP formation in C6Bu-1 cells: involvement of local metabolism and subsequent stimulation of adenosine A2B receptor. *J. Neurochem.* **76**, 872-880.
- Ralevic V, Burnstock G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* **50**, 413–492.
- Ratcliffe MJ, Walding A, Shelton PA, Flaherty A, Dougall IG., 2007. Activation of E-prostanoid4 and E-prostanoid2 receptors inhibits TNF-alpha release from human alveolar macrophages. *Eur Respir J.* **29**, 986–994.
- Riegel, A.-K., Faigle, M., Zug, S., Rosenberger, P., Robaye, B., Boeynaems, J.-M., Idzko, M., Eltzschig, H.K., 2011. Selective induction of endothelial P2Y₆ nucleotide receptor promotes vascular inflammation. *Blood* **117**, 2548-2555.
- Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN., 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* **237**, 1171-1176.
- Serezani, C.H., Ballinger, M.N., Aronoff, D.M., Peters-Golden, M., 2008. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **39**, 127-132.
- Sharif MN, Tassiulas I, Hu Y, Mecklenbräuker I, Tarakhovsky A, Ivashkiv LB., 2004. IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus

- erythematosus pathogenesis. *J Immunol.* **172**, 6476-81.
- Stokes L, Surprenant A., 2007. Purinergic P2Y2 receptors induce increased MCP-1/CCL2 synthesis and release from rat alveolar and peritoneal macrophages. *J Immunol.* **179**, 6016–6023.
- Sugimoto, Y., Narumiya, S., 2007. Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 11613-11617.
- Suh BC, Kim JS, Namgung U, Ha H, Kim KT., 2001. P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J Immunol.* **166**, 6754–6763.
- Takahashi, H.K., Iwagaki, H., Yoshino, T., Mori, S., Morichika, T., Itoh, H., Yokoyama, M., Kubo, S., Kondo, E., Akagi, T., Tanaka, N., Nishibori, M., 2002. Prostaglandin E₂ inhibits IL-18-induced ICAM-1 and B7.2 expression through EP2/EP4 receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* **168**, 4446-4454.
- Takayama, K., García-Cardena G., Sukhova, G.K., Comander, J., Gimbrone, M.A., Libby, P., 2002. Prostaglandin E₂ suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 44147-44154.
- Torres R, Serra-Pages M, Plaza J, Herrerias A, Costa-Farré C, Marco A, Jiménez M, Maurer M, Picado C, de Mora F., 2015. Activation of the Prostaglandin E2 receptor EP2 prevents house dust mite-induced airway hyperresponsiveness and inflammation by restraining mast cells activity. *Clin Exp Allergy.* **45**, 1590-1600.
- Través, P.G., Pimentel-Santillana, M., Carrasquero, L.M.G., Pérez-Sen, R., Delicado, E.G., Luque, A., Izquierdo, M., Martín-Sanz, P., Miras-Portugal, M.T., Boscá, L., 2013. Selective impairment of P2Y signalling by prostaglandin E₂ in macrophages: implications for Ca²⁺-dependent responses. *J. Immunol.* **190**, 4226-4235.
- Tsuda M, Shigemoto MY, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al., 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature.* **424**, 778– 783.
- Uratsuji, H., Tada, Y., Kawashima, T., Kamata, M., Hau, C.S., Asano, Y., Sugaya, M., Kadono, T., Asahina, A., Sato, S., Tamaki, K., 2012. P2Y₆ receptor signalling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J. Immunol.* **188**, 436-444.
- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, et al., 1998. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature.* **395**, 281–284.
- Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S., 2000. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol.* **83**, 279–285.
- Villarino AV, Stumhofer JS, Saris CJ, Kastelein RA, De Sauvage FJ, Hunter CA., 2006. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol.* **176**, 237–247.
- Vieira, R.P., Müller, T., Grimm, M., von Gernler, V., Vetter, B., Dürk, T., Cicko, S., Ayata, C.K., Sorichter, S., Robaye, B., Zeiser, R., Ferrari, D., Kirschbaum, A., Zissel, G., Virchow, J.C., Boeynaems, J.-M.,

- Idzko, M., 2011. Purinergic receptor Type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **184**, 215-223.
- Warny M, Aboudola S, Robson SC, Sevigny J, Communi D, Soltoff SP, et al., 2001. P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* **276**, 26051–26056.
- Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y, Narumiya S., 2009. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med.* **15**, 633-40.
- Yeager LA, Chopra AK, Peterson JW., 2009. Bacillus anthracis edema toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal remodeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways. *Infect Immun.* **77**, 2530-43.
- Yue, C., Dodge, K.L., Weber, G., Sanborn, B.M., 1998. Phosphorylation of serine 1105 by protein kinase A inhibits phospholipase C β 3 stimulation by G α q. *J. Biol. Chem.* **273**, 18023-18027.
- Yue, C., Ku, C.-Y., Liu, M., Simon, M.I., Sanborn, B.M., 2000. Molecular mechanism of the inhibition of phospholipase C β 3 by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **275**, 30220-30225.
- Yuhki K-i, Ueno A, Naraba H, Kojima F, Ushikubi F, Narumiya S, et al., 2004. Prostaglandin Receptors EP2, EP3, and IP Mediate Exudate Formation in Carrageenin-Induced Mouse Pleurisy. *J Pharmacol Exp Ther.* **311**, 1218–1224.
- Zhang N, Wang Z, Tang X, Wang H, Li H, Huang H, Bai H, Yang X., 2010. Type 1 T-cell responses in chlamydial lung infections are associated with local MIP-1 α response. *Cell Mol Immunol.* **7**, 355–360.
- Zhang, Z., Wang, Z., Ren, H., Yue, M., Huang, K., Gu, H., Liu, M., Du, B., Qian, M., 2011. P2Y₆ agonist uridine 5'-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1 mediated monocytes/macrophages recruitment. *J. Immunol.* **186**, 5376-5387.
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N., 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* **8**, 437-502.

本学位論文は下記の原著論文を基に作成されたものである。

- (1) Ito, M. and Matsuoka, I.

Regulation of purinergic signaling by prostaglandin E₂ in murine macrophages.

J. Pharmacol Sci., 107, 443-50, 2008

- (2) Ito, M. and Matsuoka, I.

Inhibition of P2Y₆ receptor-mediated phospholipase C activation and Ca²⁺ signalling by prostaglandin E₂ in J774 murine macrophages.

Eur. J. Pharmacol., 749, 124-132, 2015