

東京大学大学院博士（獣医学）学位論文（要約）

関節炎進行過程におけるプロスタグランジン D<sub>2</sub> の役割解明

壺阪 義記

本博士論文の内容は全て、共同著作物であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意を得られていないため公表できない。また、本論文は学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。本博士論文において、第3章を除く内容については”A Deficiency in the Prostaglandin D<sub>2</sub> Receptor CRTH2 Exacerbates Adjuvant-induced Arthritis”として、第4章を除く内容については”Macrophage-derived prostaglandin D<sub>2</sub> ameliorates adjuvant-induced arthritis”として The Journal of Immunology（出版社は The American Association of Immunologists）に出版予定である。

## 背景・目的

関節リウマチとは関節内への炎症細胞の浸潤、滑膜細胞の増殖、骨軟骨の破壊を示す原因不明の自己免疫疾患である。関節リウマチの進行にはプロスタグランジン（PGs）の産生と活性が深く関わっている。これまでに、PGsの産生を阻害するシクロオキシゲナーゼ（COX）阻害薬が関節リウマチの治療に有効であることや、主要なPGsであるPGI<sub>2</sub>やPGE<sub>2</sub>がマウスのコラーゲン誘発性関節炎を増悪させることが報告されている。つまり、関節リウマチにおいて、PGsは炎症を悪化させる因子として認識されてきた。

プロスタグランジンD<sub>2</sub>（PGD<sub>2</sub>）はCOXとPGD<sub>2</sub>合成酵素の活性により産生されるPGの1つである。PGD<sub>2</sub>の生理作用は、①病態モデル②病態ステージ③PGD<sub>2</sub>を産生する細胞④産生されるPGD<sub>2</sub>量⑤PGD<sub>2</sub>を受容する細胞⑥PGD<sub>2</sub>が作用する受容体シグナルなどの違いにより、炎症抑制と炎症促進の相反する報告が混在している。PGD<sub>2</sub>と関節リウマチの関係性については、血清誘発性関節炎モデルマウスを用いた先行研究により、PGD<sub>2</sub>の合成酵素が炎症時の関節内で強く発現しており、血清中のPGD<sub>2</sub>量が正常マウスと比べて非常に高いことが報告されている。しかし、PGD<sub>2</sub>が関節リウマチに対して与える影響についてはよくわかっていない。

そこで、本研究では（1）PGD<sub>2</sub>の合成酵素であるH-PGDSを欠損させたマウス（H-PGDS<sup>-/-</sup>）を用い、H-PGDS由来のPGD<sub>2</sub>が関節炎に与える影響を検討すること（2）PGD<sub>2</sub>の受容体の1つであるCRTH2受容体を欠損させたマウス（CRTH2<sup>-/-</sup>）を用い、CRTH2シグナルが関節炎に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 実験結果

（1）野生型マウス（WT）の足関節周囲にcomplete Freund's adjuvant（CFA、150 μg）を皮下注射すると、肢組織中のPGD<sub>2</sub>含有量と肢の腫れの増加が観察された。一方、H-PGDS<sup>-/-</sup>の肢ではPGD<sub>2</sub>がほとんど検出されず、WTと比べて急激な腫れの増加がみられた。CFA処置後9日目の両マウスの足関節における形態学的な変化を観察したと

ころ、CFA 処置は皮下および関節内へ炎症細胞を浸潤させ、関節軟骨および骨を破壊した。H-PGDS<sup>-/-</sup>の足関節では WT と比べて、これらの症状がより顕著にみられた。

関節リウマチの進行に血管新生が重要であることが知られている。H-PGDS<sup>-/-</sup>では WT と比べて、CFA 処置後 9 日目の肢組織中に存在する血管面積の割合が増加しており、血管新生が亢進していた。また、CFA 処置後 9 日目の H-PGDS<sup>-/-</sup>の肢では WT と比べて、血管新生の重要な因子である血漿成分の血管外への漏出面積が増えており、血管透過性が亢進していた。そこで、H-PGDS 欠損による血管透過性亢進機構の詳細について検討した。CFA 処置後 2 日目の両マウスの肢において、PGD<sub>2</sub> 受容体の 1 つである DP 受容体の作動薬 BW245C の処置は CFA 処置による血管透過性亢進を抑制し、逆に WT への DP 受容体阻害薬 BW A868C の処置は CFA 刺激による血管透過性を H-PGDS<sup>-/-</sup>と同程度まで亢進させた。以上より、外因性の DP 受容体刺激および H-PGDS 由来の内因性の PGD<sub>2</sub> が DP 受容体を介して血管透過性を抑制することが示された。

また、CFA 処置後 5 日目の肢における血管新生関連遺伝子の mRNA 発現を解析したところ、H-PGDS<sup>-/-</sup>では WT と比べて、炎症性サイトカインである tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-6 (IL-6)、IL-1 $\beta$  と細胞外マトリックスの分解酵素である matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の mRNA 発現量が有意に上昇していた。

最後に H-PGDS 発現細胞を免疫染色で特定したところ、CFA 処置後 9 日目の WT の肢において、CD68 陽性マクロファージの一部が H-PGDS を強く発現していることが確認された。

(2) WT および CRTH2<sup>-/-</sup>の足関節周囲に CFA (150  $\mu$ g) を皮下注射すると、両マウスで肢組織中の PGD<sub>2</sub> 含有量の増加と肢の腫れが観察された。WT ではゆるやかに肢の腫れが増大したのに対し、CRTH2<sup>-/-</sup>では急激な腫れの増加がみられ、肢の腫れが有意に増大した。CFA 処置後 11 日目の両マウスの足関節における形態学的な変化を観察したところ、CFA 処置は皮下および関節内へ炎症細胞を浸潤させ、関節軟骨および骨を破壊した。CRTH2<sup>-/-</sup>の足関節では WT と比べて、これらの症状がより顕著に見られた。また、CFA 処置後 5 日目の肢における炎症性サイトカインの mRNA 発現を解析した結果、H-PGDS<sup>-/-</sup>では WT と比べて、関節炎の進行に重要な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現が上昇していた。

次に、マウスに骨髄移植を行い、免疫細胞を含む造血系細胞に分化する骨髄由来細胞、滑膜細胞を含む間葉系細胞に分化する非骨髄由来細胞のどちらに発現する CRTH2 が関節炎を抑制するのかを検討した。その結果、WT の骨髄を CRTH2<sup>-/-</sup>へ移植したマウスでは CRTH2<sup>-/-</sup>の骨髄を CRTH2<sup>-/-</sup>へ移植した対照と比べて関節炎の症状が弱いこと、さらには CRTH2<sup>-/-</sup>の骨髄を WT へ移植したマウスでは WT の骨髄を WT へ移植した対照と比べて関節炎の症状が強いことから、骨髄由来細胞に発現する CRTH2 の欠損が関節炎を悪化させることが示された。

CRTH2<sup>-/-</sup>で関節炎が悪化し始めた CFA 処置後 3 日目の肢において、CRTH2<sup>-/-</sup>では WT と比べて CD68 陽性マクロファージの浸潤数が増加していた。そこで、CRTH2<sup>-/-</sup>においてマクロファージが関節炎に与える影響を検討したところ、マクロファージ不活性化剤 GdCl<sub>3</sub> およびマクロファージ除去剤 liposomal clodronate の処置は CRTH2<sup>-/-</sup>の肢で見られた関節炎の症状を WT の CFA 単独処置群と同程度まで改善した。

さらに、CRTH2<sup>-/-</sup>から単離・分化させた骨髄由来マクロファージを追加した WT では、WT マクロファージを追加移入した WT と比べて肢の腫れが増大した。以上より、CRTH2 欠損マクロファージが関節炎を悪化させる主要な細胞であることが示された。

最後に、CRTH2 欠損がマクロファージを活性化させる詳細な機構を単離細胞レベルで検討した。CFA 刺激を行った CRTH2<sup>-/-</sup>の腹腔から単離したマクロファージでは WT と比べてマクロファージの分化に関わるサイトカインである granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) と遊走に関わるケモカイン受容体である CXCR-2 の mRNA 発現量が有意に上昇していた。CRTH2 の作動薬である DK-PGD<sub>2</sub> の腹腔内投与は CFA 刺激を行った WT の腹腔マクロファージにおける GM-CSF および CXCR-2 の mRNA 発現量を抑制した。

## 考察

本研究により、①H-PGDS 陽性マクロファージから産生される PGD<sub>2</sub> が、炎症関節における血管透過性および血管新生、症状を抑えること、②この現象には少なくとも一部、DP 受容体活性による血管透過性抑制作用が関与すること、③CRTH2 受容体活性がマクロファージの活性化を抑え、関節炎の症状を緩和させることが明らかとなった。これまで PGs は関節リウマチの増悪因子として考えられてきたが、PGD<sub>2</sub> は関節炎を抑える、珍しい PG であることを初めて明らかにした。本研究で得られた結果が、リウマチ病態の発症・進展機構の全容解明と治療法の開発につながることを期待される。