

東京大学 博士論文 (要約)

血管透過性抑制因子の同定とその作用機序の解明

平成 23 年度入学

放射線動物科学教室 小林 幸司

指導教員 村田 幸久

2014 年 12 月

目次

【第1章 緒言】	3
【第2章 材料及び実験方法】	4
【第3章 血管透過性に対する PGD ₂ の作用】	5
【第4章 血管透過性に対する SDF-1 α の作用】	6
【第5章 総合考察】	7
【第6章 総括】	8
【第7章 引用文献】	12
謝辞.....	22

【第1章 緒言】

本章の内容は、学術雑誌に掲載されており、出版社との契約条件によって公表できない。本章の内容は、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、33巻、3号、565-571ページおよび、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、34巻、8号、1716-1722ページに掲載されている。

【第2章 材料及び実験方法】

本章の内容は、学術雑誌に掲載されており、出版社との契約条件によって公表できない。本章の内容は、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、33巻、3号、565-571ページおよび、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、34巻、8号、1716-1722ページに掲載されている。

【第3章 血管透過性に対する PGD₂ の作用】

本章の内容は、学術雑誌に掲載されており、出版社との契約条件によって公表できない。本章の内容は、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、33巻、3号、565-571ページに掲載されている。

【第4章 血管透過性に対する SDF-1 α の作用】

本章の内容は、学術雑誌に掲載されており、出版社との契約条件によって公表できない。本章の内容は、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、34巻、8号、1716-1722ページに掲載されている。

【第5章 総合考察】

本章の内容は、学術雑誌に掲載されており、出版社との契約条件によって公表できない。本章の内容は、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、33巻、3号、565-571ページおよび、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*、34巻、8号、1716-1722ページに掲載されている。

【第6章 総括】

【背景・目的】

血管の最内層を覆う内皮細胞は、隣接する内皮細胞と VE-cadherin などのタンパクを介して、「接着結合」と呼ばれる細胞間接着構造を形成している。通常時の内皮細胞はこの接着結合によって血液と組織の境界面に強固な障壁を形成し、血管内外の物質の移動を制限している。一方、炎症時には、大量に産生された炎症性メディエーターが内皮細胞の接着結合を破壊するため、血管の透過性が上昇する。その結果、血漿成分や炎症細胞が血中から組織へと流入し、さらなる炎症反応を引き起こされる。このように、血管透過性の亢進は炎症の最初期に生じ、その後の反応を引き起こすきっかけとなっているため、透過性制御因子の同定とその作用機序の解明は、炎症を理解しかつ制御する上で不可欠である。

PGD₂ は 細胞膜リン脂質由来のアラキドン酸がさらに代謝されて産生されるプロスタグランジンの1つである。PGD₂ は DP 受容体と CRTH2 受容体を持ち、これらを介して睡眠や痛覚を制御し、また、喘息やアレルギー性皮膚炎を悪化させることが知られている。しかし、血管機能に対する PGD₂ の作用はほとんど検討されていなかった。近年、私のグループは、PGD₂ が内皮細胞の DP 受容体を刺激して血管透過性を抑制し、癌の血管新生と成長を阻害することを見出した。しかし、その詳細な機構は不明のままであった。

SDF-1 α は癌や虚血組織など低酸素領域で大量に産生されるケモカインの1種である。SDF-1 α の受容体として、CXCR4 および CXCR7 という2つの G タンパク結合型受容体が同定されており、これらは骨髄細胞および、内皮細胞に発現している。骨髄細胞に対する SDF-1 α の作用に関しては盛んに研究がおこなわれており、SDF-1 α は走化性因子として働いて、骨髄細胞の骨髄・末梢血・末梢組織間の移動を調節していることがわかっている。一方で、内皮細胞に対する SDF-1 α の作用についてはほとんど明らかになっていなかった。

以上を踏まえて、本研究では、PGD₂ と SDF-1 α という2つの生理活性物質に着目し、これらの血管透過性に対する作用とその詳細な機序について検討した。

【結果】

1) PGD₂の血管透過性に対する作用とその機序

経内皮抵抗 (transendothelial electrical resistance: TER) および蛍光標識デキストランの透過性の測定によって、PGD₂ (0.1-3 μmol/L) が濃度依存的にヒト臍帯動脈内皮細胞 (HUVEC) の透過性を抑制することが明らかになった。PGD₂の受容体のうち、DP 受容体の選択的作動薬である BW245C は HUVEC の透過性を抑制したが、CRTH2 受容体選択的作動薬である DK-PGD₂は透過性に影響を与えなかった。また、PGD₂および BW245C の透過性抑制作用は DP 受容体阻害薬である BWA868C の前処置によって解除された。

次に、DP 受容体を介した透過性抑制作用の詳細な機構について検討した。BW245C は HUVEC の細胞内 cAMP 濃度を上昇させた。細胞内 cAMP 濃度の上昇は PKA や Epac1 の活性化を介して生理作用を発揮する。PKA 阻害薬 (PKI) の前処置は BW245C の透過性抑制作用を顕著に阻害した。BW245C は HUVEC の PKA 活性を顕著に増加させることも確認した。一方で、siRNA の導入による Epac1 の発現抑制は、BW245C の作用に影響を与えなかった。

PKA の下流の因子である Rac1 は、内皮細胞のアクチン骨格を再構築し、接着結合を強化することで透過性を抑制していることが知られている。Rac1 阻害薬である NSC-23766 の前処置は BW245C の透過性抑制作用を完全に解除した。また、プルダウン法によって BW245C が HUVEC の Rac1 の活性化を引き起こすことも示された。免疫染色によって、BW245C は内皮細胞の cortical actin rim を形成し、また、VE-cadherin の細胞膜上での発現を増加させて接着結合を強固にすることが分かった。これらの現象は NSC-23766 の前処置によって完全に阻害された。

PGD₂ の透過性抑制作用を、マウスモデルを用いて評価した。C57BL6 マウス(WT マウス) の耳介に croton oil を塗布すると、炎症が惹起されて血管透過性が上昇し、evans blue

の血管外漏出が引き起こされた。BW245C の処置は croton oil 塗布による血管透過性上昇を抑制したが、この作用は PKI の前処置によって解除された。DP 受容体ノックアウトマウス (DP^{-/-}マウス) に croton oil を塗布すると、WT マウスに比べて、血管透過性がより大きく上昇した。DP^{-/-}マウスに BW245C を処置しても血管透過性に変化は見られなかった。

2) SDF-1 α の血管透過性に対する作用とその機序

TER および蛍光標識デキストランの透過性の測定によって、SDF-1 α (1-100 ng/mL) が BAEC の透過性を抑制することが分かった。この透過性抑制作用はヒト由来の初代単離内皮細胞 (HPAEC および HUVEC) でも観察された。CXCR4 の阻害薬および siRNA 導入による発現抑制の処置によって、SDF-1 α の透過性抑制作用は完全に解除された。一方、CXCR7 の阻害薬および siRNA の処置は SDF-1 α の作用に影響を与えなかった。

CXCR4 は Gi タンパク結合型の受容体であるため、Gi タンパクとその下流の因子である PI3K、Akt の関与について検討した。Gi タンパク阻害薬 (pertussis toxin)、PI3K 阻害薬 (LY294002)、Akt 阻害薬 (Akt1/2 kinase inhibitor) の前処置は SDF-1 α の透過性抑制作用を顕著に抑制した。ウエスタンブロットにより、SDF-1 α は Akt^{S473} のリン酸化を引き起こすことが確認された。NSC-23766 の前処置は SDF-1 α の透過性抑制作用を完全に解除した。また、プルダウン法によって SDF-1 α が BAEC の Rac1 活性化を引き起こすことを確認した。免疫染色によって、SDF-1 α は内皮細胞の cortical actin rim 形成を促進し、また、VE-cadherin の細胞膜上での発現を増加させて接着結合を強固にすることが分かった。

SDF-1 α の透過性抑制作用を、マウスモデルを用いて検討した。Croton oil を FVB マウスの耳介に塗布すると血管透過性が亢進し、evans blue の血管外漏出や浮腫が引き起こされた。これらの現象は SDF-1 α の皮内投与によって強く抑制された。SDF-1 α の透過性抑制作用は、LY294002 や NSC-23766 の前処置によって解除された。また、SDF-1 α は、histamine あるいは VEGF の皮内投与による血管透過性亢進に対して、拮抗作用を示すことも明らか

になった。

【結論】

本研究によって 1) PGD_2 の血管透過性抑制作用に、 DP/cAMP/PKA/Rac1 経路の活性化と、それに続く内皮細胞間接着結合の強化が関与すること、2) $\text{SDF-1}\alpha$ が強力な血管透過性抑制分子であり、その作用に $\text{CXCR4/Gi/PI3K/Rac1}$ 経路の活性化と、それに続く内皮細胞間接着結合の強化が関与すること、が示された。血管透過性の亢進は急性炎症のみならず慢性炎症の進行にも大きく関与する現象であることが近年明らかになっており、透過性制御因子は新たな治療標的として注目されている。 PGD_2 と $\text{SDF-1}\alpha$ の強力な血管透過性抑制作用とその詳細な作用機序を解明した本研究が、様々な炎症関連疾患の治療法開発の糸口になれば幸いである。

【第7章 引用文献】

1. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995;25:155-161
2. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257
3. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews* 2006;86:279-367
4. Szekanecz Z, Koch AE. Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'. *Arthritis research & therapy* 2008;10:224
5. van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VW. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circulation research* 2000;87:335-340
6. Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C. Ca²⁺ signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *The Journal of physiology* 2001;533:433-445
7. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985
8. Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, Faubert D, Wilkes BC, Delisle C, Gratton JP. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Molecular cell* 2010;39:468-476
9. Birukova AA, Zagranchnaya T, Fu P, Alekseeva E, Chen W, Jacobson JR, Birukov KG. Prostaglandins PGE₂ and PGI₂ promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Experimental cell research* 2007;313:2504-2520

10. Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, Garcia JG. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005;19:1646-1656
11. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999;99:301-312
12. Camp SM, Bittman R, Chiang ET, Moreno-Vinasco L, Mirzapourzadeh T, Sammani S, Lu X, Sun C, Harbeck M, Roe M, Natarajan V, Garcia JG, Dudek SM. Synthetic analogs of FTY720 [2-amino-2-(2-[4-octylphenyl]ethyl)-1,3-propanediol] differentially regulate pulmonary vascular permeability in vivo and in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009;331:54-64
13. Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004;4:1019-1025
14. Infusino GA, Jacobson JR. Endothelial FAK as a therapeutic target in disease. *Microvascular research* 2012;83:89-96
15. Kostenis E, Ulven T. Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation. *Trends in molecular medicine* 2006;12:148-158
16. Ueno R, Ishikawa Y, Nakayama T, Hayaishi O. Prostaglandin D2 induces sleep when microinjected into the preoptic area of conscious rats. *Biochemical and biophysical research communications* 1982;109:576-582

17. Urade Y, Hayaishi O. Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. *Sleep medicine reviews* 2011;15:411-418
18. Eguchi N, Minami T, Shirafuji N, Kanaoka Y, Tanaka T, Nagata A, Yoshida N, Urade Y, Ito S, Hayaishi O. Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:726-730
19. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, *et al.* Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000;287:2013-2017
20. Satoh T, Moroi R, Aritake K, *et al.* Prostaglandin D2 plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. *J Immunol* 2006;177:2621-2629
21. Murata T, Lin MI, Aritake K, Matsumoto S, Narumiya S, Ozaki H, Urade Y, Hori M, Sessa WC. Role of prostaglandin D2 receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:20009-20014
22. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999;283:845-848
23. Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, Gonzalo JA, Henson PM, Worthen GS. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* 2004;104:565-571
24. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-189
25. Liehn EA, Tuchscheerer N, Kanzler I, *et al.* Double-edged role of the CXCL12/CXCR4

- axis in experimental myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;58:2415-2423
26. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:4282-4287
 27. Zheng H, Dai T, Zhou B, Zhu J, Huang H, Wang M, Fu G. SDF-1alpha/CXCR4 decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Atherosclerosis* 2008;201:36-42
 28. Pi X, Wu Y, Ferguson JE, 3rd, Portbury AL, Patterson C. SDF-1alpha stimulates JNK3 activity via eNOS-dependent nitrosylation of MKP7 to enhance endothelial migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:5675-5680
 29. Turnage RH, LaNoue JL, Kadesky KM, Meng Y, Myers SI. Thromboxane A2 mediates increased pulmonary microvascular permeability after intestinal reperfusion. *J Appl Physiol* (1985) 1997;82:592-598
 30. Yamasaki M, Matsumoto T, Fukuda S, Nakayama T, Nagaya H, Ashida Y. Involvement of thromboxane A2 and histamine in experimental allergic rhinitis of guinea pigs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997;280:1471-1479
 31. Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochemistry and cell biology* 2008;129:765-778
 32. Schlegel N, Waschke J. VASP is involved in cAMP-mediated Rac 1 activation in microvascular endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 2009;296:C453-462

33. Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 2005;25:136-146
34. Birukova AA, Zagranichnaya T, Alekseeva E, Bokoch GM, Birukov KG. Epac/Rap and PKA are novel mechanisms of ANP-induced Rac-mediated pulmonary endothelial barrier protection. *Journal of cellular physiology* 2008;215:715-724
35. Baumer Y, Spindler V, Werthmann RC, Bunemann M, Waschke J. Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. *Journal of cellular physiology* 2009;220:716-726
36. Symcox MM, Cauthron RD, Ogreid D, Steinberg RA. Arg-242 is necessary for allosteric coupling of cyclic AMP-binding sites A and B of RI subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:23025-23031
37. de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:20829-20836
38. O'Connor KL, Mercurio AM. Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:47895-47900
39. Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovascular research* 2010;87:243-253
40. Nathan RA. The pathophysiology, clinical impact, and management of nasal congestion in allergic rhinitis. *Clinical therapeutics* 2008;30:573-586
41. Kim CH, Broxmeyer HE. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the

- influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood* 1998;91:100-110
42. Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovascular research* 2009;82:261-271
43. Burns JM, Summers BC, Wang Y, *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:2201-2213
44. Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, Powers J, Summers BC, Miao Z, Zhao B, Jalili A, Janowska-Wieczorek A, Jaen JC, Schall TJ. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J Immunol* 2009;183:3204-3211
45. Yan X, Cai S, Xiong X, Sun W, Dai X, Chen S, Ye Q, Song Z, Jiang Q, Xu Z. Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *Journal of cellular biochemistry* 2012;113:1437-1446
46. Chavakis E, Carmona G, Urbich C, Gottig S, Henschler R, Penninger JM, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circulation research* 2008;102:942-949
47. Gavard J, Hou X, Qu Y, Masedunskas A, Martin D, Weigert R, Li X, Gutkind JS. A role for a CXCR2/phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling axis in acute and chronic vascular permeability. *Molecular and cellular biology* 2009;29:2469-2480
48. Di Lorenzo A, Fernandez-Hernando C, Cirino G, Sessa WC. Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:14552-14557
49. Gunduz D, Thom J, Hussain I, Lopez D, Hartel FV, Erdogan A, Grebe M, Sedding D, Piper

- HM, Tillmanns H, Noll T, Aslam M. Insulin stabilizes microvascular endothelial barrier function via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated Rac1 activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30:1237-1245
50. Umopathy SN, Kaczmarek E, Fatteh N, Burns N, Lucas R, Stenmark KR, Verin AD, Gerasimovskaya EV. Adenosine A1 receptors promote vasa vasorum endothelial cell barrier integrity via Gi and Akt-dependent actin cytoskeleton remodeling. *PloS one* 2013;8:e59733
51. Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *The Journal of clinical investigation* 2001;108:689-701
52. Liu F, Schaphorst KL, Verin AD, Jacobs K, Birukova A, Day RM, Bogatcheva N, Bottaro DP, Garcia JG. Hepatocyte growth factor enhances endothelial cell barrier function and cortical cytoskeletal rearrangement: potential role of glycogen synthase kinase-3beta. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002;16:950-962
53. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine* 2004;10:858-864
54. Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J, Song M, Huang L. SDF-1alpha involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2010;19:218-227
55. Segers VF, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT. Local delivery of

- protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction. *Circulation* 2007;116:1683-1692
56. Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nature reviews. Drug discovery* 2008;7:41-53
57. Simons FE, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011;128:1139-1150 e1134
58. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005;437:497-504
59. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 1998;395:281-284
60. Hatazawa R, Tanaka A, Tanigami M, Amagase K, Kato S, Ashida Y, Takeuchi K. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2007;293:G788-797
61. Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nature medicine* 2009;15:633-640
62. Omori K, Kida T, Hori M, Ozaki H, Murata T. Multiple roles of the PGE2 -EP receptor signal in vascular permeability. *British journal of pharmacology* 2014;171:4879-4889
63. Kunkel GT, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nature reviews. Drug discovery* 2013;12:688-702
64. Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, Pearse D, Tudor

- RM, Garcia JG. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004;169:1245-1251
65. Jung B, Obinata H, Galvani S, Mendelson K, Ding BS, Skoura A, Kinzel B, Brinkmann V, Rafii S, Evans T, Hla T. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Developmental cell* 2012;23:600-610
66. Nugteren DH, Hazelhof E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1973;326:448-461
67. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H. Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:5205-5210
68. Iwanaga K, Nakamura T, Maeda S, Aritake K, Hori M, Urade Y, Ozaki H, Murata T. Mast cell-derived prostaglandin D2 inhibits colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Cancer research* 2014;74:3011-3019
69. Sarashina H, Tsubosaka Y, Omori K, Aritake K, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H, Murata T. Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. *J Immunol* 2014;192:459-465
70. Shiraishi Y, Asano K, Nakajima T, Oguma T, Suzuki Y, Shiomi T, Sayama K, Niimi K, Wakaki M, Kagyo J, Ikeda E, Hirai H, Yamaguchi K, Ishizaka A. Prostaglandin D2-induced eosinophilic airway inflammation is mediated by CRTH2 receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005;312:954-960
71. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a

cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*

1993;261:600-603

72. Greenbaum CJ, Beam CA. Response to Comment on: Greenbaum et al. Fall in C-peptide during first 2 years from diagnosis: evidence of at least two distinct phases from composite type 1 diabetes TrialNet data. *Diabetes* 2012;61:2066-2073. *Diabetes* 2013;62:e8
73. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-594
74. Takabatake Y, Sugiyama T, Kohara H, Matsusaka T, Kurihara H, Koni PA, Nagasawa Y, Hamano T, Matsui I, Kawada N, Imai E, Nagasawa T, Rakugi H, Isaka Y. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature. *Journal of the American Society of Nephrology* : *JASN* 2009;20:1714-1723

謝辞

稿を終えるにあたり、懇切な御指導および御助言を賜りました東京大学大学院 放射線動物科学教室 村田幸久准教授および、獣医薬理学教室 尾崎博教授、堀正敏准教授に心より感謝申し上げます。DP 受容体欠損マウスを提供してくださった京都大学大学院 医学系研究科 成宮周教授にも厚く御礼申し上げます。また、PGD₂の透過性抑制に関する研究をともに行った、放射線動物科学教室卒業生の壺阪義記さん、SDF-1 α の透過性抑制に関する研究をともに行った、獣医薬理学教室卒業生の佐藤加奈子さん、放射線動物科学教室卒業生の貴田大樹さん、および博士課程 1 年の大森啓介君にも深くお礼申し上げます。さらに、公私ともに様々な面で支えてくださった放射線動物科学教室および獣医薬理学教室の皆様、家族、友人に深く感謝いたします。最後に、本研究で犠牲になった多くの動物達に心から感謝するとともに、その霊が慰められますよう心からお祈りいたします。