

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	森本 和志
論文題目	Roles of Prostaglandin Receptors in Skin Inflammation through the Regulation of Mast Cell Functions (マスト細胞の機能制御を介する皮膚炎症におけるプロスタグランジン受容体の役割)		
(論文内容の要旨)			
<p>プロスタグランジン (PG) はアラキドン酸 (AA) を基質として産生され (主に5種)、近傍の細胞膜表面上に存在する特異的受容体に作用して多彩な生物活性を示す。PGは古くから皮膚における代表的な炎症性メディエーターとして知られ、皮膚炎などの炎症性疾患への関与が示唆されている。しかしながら、関与する受容体のサブタイプ (9種) やその分子機構についてはほとんどわかっていない。そこで、著者は、皮膚炎症に関与するPG受容体の同定およびその分子機構の解明を目的として、以下の研究を行った。</p>			
第一章 プロスタグランジンE ₂ -EP3受容体シグナルはマスト細胞の活性化を介して皮膚炎症を引き起こす			
<p>AAを皮膚に塗布することでPGが合成されるとともに発赤や浮腫などの炎症が惹起されるAA炎症モデルを各PG受容体欠損マウスに適用し、皮膚炎症に関わるPG受容体の同定を行った。炎症惹起の指標として血管透過性の亢進を静脈内投与した色素の漏出により定量したところ、EP3欠損マウスおよびIP欠損マウスにおいて有意な減弱が見いだされた。特にEP3欠損マウスにおける減弱が顕著であったことから、PGE₂の皮内投与を行ったところ、PGE₂単独で血管透過性が亢進することが明らかになった。さらに、このPGE₂による効果はEP3欠損マウスでは完全に消失した。</p> <p>血管透過性に関わる分子の阻害剤スクリーニングによって、ヒスタミン受容体アンタゴニストがPGE₂による応答を顕著に抑制することが見いだされた。そこで皮膚のヒスタミン供給源であるマスト細胞 (MC) に着目し、MC欠損マウスを用いて同様の解析を行ったところ、AA炎症が有意に減弱し、PGE₂応答は完全に消失することが判明した。さらに、MC欠損マウスに野生型MCを再構成するとPGE₂応答が有意に回復するのに対して、EP3欠損MCの再構成では消失したままであった。野生型とEP3欠損マウス皮膚組織中のヒスタミン量に差はなかったことから、PGE₂-EP3受容体シグナルはMCからのヒスタミン放出を介して皮膚炎症を惹起する可能性が示唆された。</p>			
第二章 プロスタグランジンE ₂ -EP3受容体シグナルは単独でマスト細胞の脱顆粒を引き起こす			
<p>PGE₂が単独でMCの脱顆粒を引き起こすかは不明であった。そこで、著者はマウス骨髄由来培養MC (BMMC) を調製し、脱顆粒に対するPGE₂の効果を調べた。その結果、PGE₂刺激単独で脱顆粒が誘導され、さらにIL-6産生が亢進することが明らかになった。BMMCにはPGE₂受容体としてEP1、EP3、EP4が発現していたが、上述の応答はEP3特異的アゴニストにおいてのみ再現され、EP3欠損マウス由来のBMMCでは応答が完全に消失した。</p> <p>抗原抗体反応による脱顆粒には細胞外Ca²⁺の流入およびPI3K-Akt経路の活性化が</p>			

重要であることから、EP3 下流シグナルにおける解析を行ったところ、BMMCのPGE₂ 処理により細胞外Ca²⁺の流入とAktのリン酸化が亢進していた。EP3 はGi共役型GPCR であることから百日咳毒素処理を行ったところ、PGE₂による脱顆粒応答、細胞外Ca²⁺ 流入、Aktのリン酸化がいずれも減弱した。さらに、細胞外Ca²⁺の除去またはPI3K阻 害剤処理によりPGE₂によるMCの活性化は顕著に抑制された。このように、PGE₂は EP3-Gi経路を介して細胞外Ca²⁺の流入、PI3K-Akt経路の活性化を引き起こし、MCの 脱顆粒とIL-6 産生を誘導することが明らかになった。

第三章 プロスタグランジンI₂-IP受容体シグナルは、cAMP-PKA経路を介してIL-33 によるマスト細胞のサイトカイン産生を抑制する

IL-33 はMC等に作用してIL-6 やIL-13 などの炎症性サイトカインの産生を誘導し、 アトピー性皮膚炎等の発症に重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、MC はPGI₂受容体であるIPを発現するが、その役割は不明であった。そこで、著者は、 MCのIL-33 応答に対するIPの機能について解析した。その結果、IPアゴニストはIL-33 に対するBMMCのIL-6 及びIL-13 のmRNA発現および産生亢進をいずれも有意に抑制 することが見いだされた。一方、IP欠損マウス由来のBMMCにおいてはそのような 抑制は検出されなかった。さらに、この効果はcAMPアナログやPKA活性化剤で再現 され、Epac活性化剤では再現されず、PKA阻害剤で抑制された。このように、PGI₂ はIP-cAMP-PKA経路を介して、IL-33 によるサイトカイン産生を抑制することが明ら かにになった。

以上、著者は、PGE₂-EP3 シグナルがMCを直接的に活性化して皮膚炎症を惹起す ること、PGI₂-IPシグナルがIL-33 によるMCの活性化を抑制することを見だし、皮 膚炎症におけるPGの新たな役割および作用機序を明らかにした。これらの結果は、 アスピリン様薬物の作用機序やPG受容体を標的とする創薬を考えるうえで重要な基 礎的知見と考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

プロスタグランジン(PG)受容体を介して発揮される様々な生理病態作用の分子メカニズムを理解することは、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の副作用の回避や本受容体を標的とした薬剤開発に必須の課題である。PGは古くから皮膚における代表的な炎症性メディエーターとして知られ、皮膚炎などの炎症性疾患への関与が示唆されてきた。にも関わらず、皮膚炎ならびに急性炎症に関与する受容体のサブタイプやその分子機構についてはほとんどわかっていないのが現状であった。そこで著者は、この点についてアプローチするため、二つのアプローチをとった。まず第一章・第二章では、PG依存的な皮膚炎症モデルとしてアラキドン酸塗布炎症を用いて、その応答が各受容体の欠損マウスでどう変化するかを体系的に解析することで、皮膚急性炎症に関与するPG受容体の同定を試みた。さらに第三章では、皮膚組織を含め全身に存在するマスト細胞がPGI₂受容体(IP受容体)を豊富に発現する点に注目し、急性皮膚炎症のトリガーとなりうるマスト細胞(MC)の機能に対して、IP受容体が影響する可能性を検討した。これら解析の結果、以下の知見を得た。

著者はまず、アラキドン酸炎症の指標・血管透過性がEP3 受容体欠損およびIP受容体欠損で有意に減弱すること、PGE₂およびPGI₂安定誘導体の皮内投与による血管透過性亢進が、それぞれEP3、IPの各受容体欠損で完全に消失することを見いだした。さらにPGE₂による血管透過性亢進は、ヒスタミンH₁受容体拮抗薬、マスト細胞欠損で減弱した。MC欠損マウスに野生型MCを再構成すると、PGE₂応答が有意に回復したが、EP3 受容体欠損MCの再構成は効果がなかった。野生型とEP3 受容体欠損マウス皮膚組織中のヒスタミン量に差はなかったことから、PGE₂はMC上のEP3 受容体に作用してMCのヒスタミン放出を介して皮膚炎症を惹起する可能性を示唆した。これらの成果は、PGによる炎症惹起作用がマスト細胞の活性化を介する可能性を初めて明らかにしたものであり、皮膚炎症におけるPGE₂の役割を理解する上で貴重な発見である。

続いて著者は、骨髄培養マスト細胞BMMCを用いて、PGE₂がマスト細胞を直接活性化しうるかを調べた。その結果、①PGE₂は脱顆粒とIL-6 産生を引き起こすこと、②PGE₂の作用はEP3 受容体特異的アゴニストで再現され、逆にEP3 受容体欠損で消失すること、③BMMCにおいて、PGE₂はEP3 受容体-Gi経路を介して細胞外Ca²⁺の流入、PI3K-Akt経路の活性化を引き起こすことで、MCの脱顆粒とIL-6 産生を誘導することを見いだした。これらの成果は、PGE₂によるマスト細胞活性化シグナルを明らかにしただけでなく、GPCRによるマスト細胞活性化にはGi活性化が主経路となることを示唆したものである。

一方、著者は、壊死した上皮組織などから分泌されたIL-33 がMCに作用し、IL-6 やIL-13 などの炎症性サイトカイン産生を促すことで、アトピー性皮膚炎等の発症に関与する点に注目し、PGI₂がこの経路を制御する可能性を検討した。その結果、①PGI₂がIP受容体を介してIL-33 に対するBMMCのIL-6/IL-13 のmRNA発現および産生亢進を

抑制すること、②このIP受容体の作用はcAMP-PKA経路を介することを見だし、さらに③IP受容体によるIL-6 遺伝子発現の抑制は、エピジェネティック経路を介する可能性を示唆した。これらの成果は、PGI₂によるマスト細胞機能制御の分子機構を明らかにしただけでなく、PGI₂がIL-33 作用に拮抗することで皮膚炎の慢性化を負に制御する可能性を初めて示唆したものである。

以上の成果は、皮膚炎症においてマスト細胞で働くPGE₂-EP3 受容体シグナルならびにPGI₂-IP受容体シグナルの病態生理的意義を分子レベルで明らかにしたものであり、皮膚炎症におけるNSAIDsの薬理作用・副作用の理解、さらには皮膚炎慢性化に対する新たな標的としてPG受容体の有効性を考える上で重要な基礎知見となるものである。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 26年 4月 1日以降