

学 位 論 文 要 旨

氏 名 西澤 伸恭



論 文 題 目

「**Inhibition of mPGES-1 facilitates liver repair following hepatic ischemia/reperfusion injury through EP4 signaling in macrophages**」

(膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1 阻害は、マクロファージにおける EP4 シグナルを介して肝虚血再灌流障害後の肝修復を促進する)

指 導 教 授 承 認 印



Inhibition of mPGES-1 facilitates liver repair following hepatic ischemia/reperfusion injury through EP4 signaling in macrophages」

(膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1 阻害は、マクロファージにおける EP4 シグナルを介して肝虚血再灌流障害後の肝修復を促進する)

西澤 伸恭

【背景】

肝虚血再灌流障害は肝切除手術、肝移植、外傷、出血性ショックなどで起こりうる病態である。肝虚血再灌流により誘発された炎症の収束や肝修復過程が阻害されると、肝障害の遷延化や肝不全に至る。従って、肝虚血再灌流障害の成立機序の解明だけでなく、肝障害からの肝修復制御機構の解明も重要な課題である。

プロスタグランジン E₂ (PGE₂)は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)により合成される脂質メディエーターで、疼痛や炎症において重要な役割を担っている。PGE₂ 合成の最終酵素は PGE 合成酵素(PGES)であり、PGES には膜結合型-1 (mPGES-1)、膜結合型-2 (mPGES-2)、細胞質型(cPGES)の 3 種類が同定されている。このうち mPGES-1 は炎症刺激によって発現が誘導される誘導型酵素であり、炎症時の PGE₂ 産生に寄与することが報告されている。さらに合成された PGE₂ は 4 つの PGE₂ 受容体サブタイプ EP1、EP2、EP3、EP4 に結合して、それぞれの作用が発揮される。

肝虚血再灌流障害において、これまで PGE₂ は保護的な作用を示すことが知られている。一方で、PGs 合成酵素阻害薬であるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2 阻害薬が肝虚血再灌流障害を軽減する効果があることも報告されており、このことは COX-2 由来の PGs は肝虚血再灌流障害を促進することに関与している可能性を示唆している。従って、これまでのところ PGE₂ が肝虚血再灌流障害にどのような役割を果たして十分な結論は得られていない。

また、PGE₂ は組織再生においても重要な役割を果たしていることが知られている。PGE₂ は肝細胞の増殖を促進する。PG 分解酵素である 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase の阻害は、PGE₂ の濃度を上昇させることにより肝再生を促進することが報告されている。しかしながら、mPGES-1 により合成される内因性の PGE₂ が、肝虚血再灌流障害における肝組織修復および肝再生に関わるかどうかは解明されていない。そのため、mPGES-1 欠損マウス(mPGES-1^{-/-})を使用して肝虚血再灌流障害における肝障害や肝組織修復過程における内因性 PGE₂ の役割を検討した。

【対象と方法】

対象動物は8週齢の雄性 mPGES-1^{-/-}、EP4 受容体欠損マウス(EP4^{-/-})、または野生型マウス(WT)を用いた。マウスを麻酔した後に開腹し、左葉に向かう門脈、胆管、動脈を血管鉗子で一括クランプする。37度の恒温槽で45分間温めた後に、鉗子を外して再灌流を行った。再灌流後6、24、48、96時間で障害肝を摘出した。

【結果】

肝臓における mPGES-1 の発現は虚血再灌流障害により誘導された。

肝臓組織 mRNA における mPGES-1 の発現を確認した。mPGES-1 の発現は WT において再灌流後6時間から96時間において発現を認めた。その他2つの PGES(cPGES, mPGES-2)は WT と mPGES-1^{-/-}に有意な差は認めなかった。PGES の上流酵素である COX-2 は6時間でピークを迎えその後漸減し、WT と mPGES-1^{-/-}に有意差は認めなかった。免疫染色の結果では、mPGES-1 の発現は主に CD68 陽性細胞に認め、Gr-1 陽性細胞の一部にも発現を認めた。この所見は虚血再灌流障害における mPGES-1 の発現は、マクロファージと好中球にあることを示唆している。再灌流後24時間の WT の肝臓から肝細胞および類洞内皮細胞(LECS)、好中球、星細胞、クッパー細胞(KCs)を分離し、mPGES-1 の mRNA 発現を確認すると、KCs と好中球では正常肝より抽出された細胞と比較して有意に発現が上昇していた。WT の肝組織において PGE₂ の値は6, 24, 48時間時間において有意に上昇しており、mPGES-1^{-/-}の肝組織では6-48時間において有意に減少していた。

mPGES-1^{-/-}では肝虚血再灌流障害が軽減していた

肝虚血再灌流障害における mPGES-1 の役割を解析するために、WT と mPGES-1^{-/-}における肝障害を比較した。WT、mPGES-1^{-/-}ともに、再灌流後6時間で障害が最も強かった。mPGES-1^{-/-}と比較すると、WT では血清 ALT 値と壊死面積が有意に増悪していた。そしてまた、炎症性サイトカインにおいても TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 そして iNOS の肝組織 mRNA における発現が mPGES-1^{-/-}で有意に減少していた。

肝内のレジデントマクロファージは酸化ストレスの原因となり、それが肝虚血再灌流障害に寄与することが報告されている。そのためマクロファージにおける iNOS の発現を免疫染色で確認した。CD68 陽性マクロファージに iNOS の発現を認め、mPGES-1^{-/-}の肝臓では iNOS の発現する CD68 陽性マクロファージの数が少なかった。

好中球の集積は再灌流障害を増悪させることが報告されているため、我々は好中球の数を評価した。免疫染色において Gr-1 陽性細胞数は WT で有意に増加していた。

好中球は活性酸素 ROS の産生を介して肝障害に寄与することが報告されているた

め、我々は再灌流後 24 時間の肝臓から抽出された好中球における ROS の産生をフローサイトメトリーで評価した。その結果、mPGES-1^{-/-}における ROS 産生は WT と比較して有意に減少していた。

好中球集積に関わるケモカインとその受容体についても検討した。肝組織 CXCL1 および CXCL2 は WT で有意に高く、CXCR1 および CXCR2 の発現も有意に高かった。

mPGES-1 の薬理的阻害は肝虚血再灌流障害を軽減する。

mPGES-1 阻害薬である Compound III を利用して再現性を確認した。Compound III を前投与した WT では対照群(希釈溶媒のみ)と比較して、ALT 値および壊死面積が有意に減少しており、炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS)の発現も有意に減少し、Gr-1 陽性細胞の集積およびそれに関わるケモカイン(CXCR1, CXCR2, CXCL1, CXCL2)も有意に減少していた。このことは、mPGES-1 の薬理的阻害は肝虚血再灌流障害を軽減することが示唆している。

肝虚血再灌流障害には PGE₂-EP4 シグナルが重要である。

PGE₂ は受容体サブタイプである EP1, EP2, EP3, EP4 を介してその生理作用を発揮する。肝虚血再灌流障害に対する EP 受容体の役割を検討するため、肝組織 mRNA における EP 受容体の発現を確認した。WT において EP2 および EP4 受容体は 6, 24, 48 時間で発現が亢進していた。それに対し、mPGES-1^{-/-}では、6 時間において EP2 が、6 時間と 48 時間において EP4 の発現が有意に減少していた。それぞれの EP 受容体が肝虚血再灌流障害に与える影響を確認するために、WT に EP 受容体拮抗薬を投与し対照群と比較した。EP1 受容体拮抗薬(ONO-8713)投与群および EP3 受容体拮抗薬(ONO-AE5-599)投与群は対照群と比較して ALT 値で有意な差は認めなかった。EP2 受容体拮抗薬(PF04418948)投与群および EP4 受容体拮抗薬(ONO-AE3-208)投与群では肝障害が軽減し、さらに EP4 受容体拮抗薬では ALT 値が有意に減少していた。肝虚血再灌流後 24 時間の肝組織において、免疫染色で EP4 受容体は Gr-1 陽性細胞に発現を認めた。PCR による検討では、EP4 受容体は好中球および KCs に発現を認めた。肝虚血再灌流障害における EP4 受容体シグナルの役割を検討するために、EP4 受容体欠損マウス(EP4^{-/-})および野生型マウス(WT)における肝虚血再灌流障害を比較した。EP4^{-/-}における結果は、EP4 受容体拮抗薬における実験と同様に、ALT 値、壊死面積、炎症性サイトカイン、好中球集積およびケモカインが WT と比較して有意に減少していた。このことは、mPGES-1 により産生された PGE₂ が、肝虚血再灌流障害によって集積した好中球に発現する EP4 受容体に作用することが示唆された。

mPGES-1^{-/-}では肝虚血再灌流障害後の肝組織修復が促進される

肝虚血再灌流障害は肝組織修復機構にも影響を与えるため、肝組織修復における mPGES-1 の役割を検討した。

mPGES-1^{-/-}における ALT 値や壊死面積は 48, 96 時間で WT と比較して優位に減少していた。肝組織修復を評価するため、細胞周期の S 期のマーカーである PCNA を染色した。WT における PCNA の発現は 24 時間から 96 時間にかけて上昇する傾向であり、mPGES-1^{-/-}では WT と比較して 96 時間まで有意に発現が上昇していた。

急性肝障害における肝修復を促進する因子として肝細胞増殖因子(HGF)、上皮成長因子および血管内皮増殖因子(VEGF)とその受容体(VEGFR1)が報告されている。肝組織 mRNA の発現では、HGF、EGF、VEGF そして VEGFR1 は mPGES-1^{-/-}において有意に上昇していた。

障害組織を修復するマクロファージの集積

肝虚血再灌流後の肝組織修復には、マクロファージの集積が必要なが報告されている。そのため免疫組織染色における CD68 陽性細胞を評価した。WT と mPGES-1^{-/-}で、非障害部位における CD68 陽性細胞は再灌流後 6 時間で減少するが以降増加する傾向を示し、mPGES-1^{-/-}では再灌流後 48、96 時間において有意に数が増加していた。一方で障害部位では WT、mPGES-1^{-/-}ともに増加傾向を示し、mPGES-1^{-/-}では再灌流後 48、96 時間において有意に数が増加していた。また、免疫組織染色において WT の障害部位における CD68 陽性細胞は mPGES-1 を発現していた。

肝虚血再灌流後の再生期におけるマクロファージの分析

mPGES-1^{-/-}の肝再生期(再灌流後 48 時間以降)におけるマクロファージの集積の結果から、mPGES-1 はマクロファージの免疫調節機構に影響を及ぼすことが示唆された。マクロファージの表現型を確認するために、炎症関連遺伝子として TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS を、組織修復関連遺伝子として MR、Fizz1、IL-10 を肝組織 mRNA で評価し確認した。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS の発現は WT で有意に発現が上昇しており、MR、Fizz1、IL-10 の発現は mPGES-1^{-/-}で有意に発現が上昇していた。

次に肝臓に集積するマクロファージの性質を明らかにするためにフローサイトメトリーによる解析を行った。WT では Ly6C^{high} 細胞(Ly6C^{hi}/CD11b^{hi}/F4/80^{lo})の細胞群が有意に多かった。一方で Ly6C^{low} 細胞(Ly6C^{lo}/CD11b^{hi}/F4/80^{hi})の細胞群は有意に少なかった。

マクロファージの表現型における性質を確認するために、再灌流後 48 時間の肝臓より Ly6C^{high} 細胞(Ly6C^{hi}/CD11b^{hi}/F4/80^{lo}) と Ly6C^{low} 細胞(Ly6C^{lo}/CD11b^{hi}/F4/80^{hi})をフローサイトメトリーにより分収した。WT における Ly6C^{high} 細胞では炎症関連遺伝子の発現が Ly6C^{low} 細胞と比較して優位に高く、対照的に mPGES-1^{-/-}では Ly6C^{low} 細胞に

における組織修復関連遺伝子の発現は Ly6C^{high} 細胞と比較して優位に高かった。

さらに詳細な検討を行うため、再灌流後 48 時間における Ly6C^{high} 細胞と Ly6C^{low} 細胞の遺伝子型をマイクロアレイで解析した。WT 由来の Ly6C^{high} 細胞はサイトカインやケモカインを含む炎症関連遺伝子の発現が高く、Ly6C^{low} 細胞では S100a8 や Trem1 を含むマクロファージの分化に関わる遺伝子の発現が高かった。対照的に、mPGES-1^{-/-} 由来の Ly6C^{low} 細胞では、Stab2 および Tek を含む血管新生に関連する遺伝子の発現、および Ltbp4 および Bmp2 を含む細胞増殖に関連する遺伝子の発現が高かった。

マクロファージの分化における mPGES-1 の効果

mPGES-1 の活性がマクロファージの分化に及ぼす影響を *in vitro* において検証した。骨髓由来マクロファージ(BMMs)をマウスから分離培養し、その細胞にインターフェロン(IFN)- γ / リポポリサッカライド(LPS)を投与することで炎症性マクロファージに誘導し、IL-4 を投与することで組織修復性マクロファージへ誘導した。WT から分化したマクロファージはいずれも炎症性関連遺伝子、組織修復関連遺伝子の発現の上昇を認めた(IL-10 を除く)。一方で、mPGES-1^{-/-} 由来の炎症性マクロファージは、WT 由来の炎症性マクロファージと比較して TNF α や iNOS には変化を認めなかったが、IL-1 β や IL-6 の発現が低下していた。そして、mPGES-1^{-/-} 由来の組織修復性マクロファージでは、WT 由来の組織修復性マクロファージと比較して MR および Fizz1 の発現が上昇していたが、有意差は認めなかった。さらに興味深いことに、WT 由来の炎症性マクロファージでは、組織修復性マクロファージと比較して mPGES-1^{-/-} の発現が優位に上昇していた。これらの結果は、mPGES-1 が骨髓由来マクロファージを炎症性マクロファージに分化させる方向に誘導する作用があることを示唆している。

炎症性マクロファージと組織修復性マクロファージの分化誘導における PGE₂ の役割を検討するために、分離培養した BMMs に PGE₂ を投与した。PGE₂ の刺激により炎症関連遺伝子である IL-1 β 、IL-6、iNOS の発現は上昇し、組織修復遺伝子の発現は有意な変化を認めなかった。また、これらの遺伝子は WT 由来マクロファージと mPGES-1^{-/-} 由来マクロファージでは有意な差は認めなかった。これらの結果から、mPGES-1 はマクロファージの分化には影響しないが、PGE₂ はマクロファージを炎症性マクロファージに分化誘導することが示唆された。

さらに、マクロファージの集積に重要なケモカインに関しても肝組織 mRNA の発現を確認した。WT における CCL2 および CCR2 の発現は mPGES-1^{-/-} と比較し有意に増加していた。一方で、CX3CL1 および CX3CR1 の発現は mPGES-1^{-/-} と比較して有意に減少していた。そして、WT 由来 Ly6C^{high} 細胞の CCR2 の発現は mPGES-1^{-/-} 由来 Ly6C^{high} 細胞と比較して有意に高く、対照的に mPGES-1^{-/-} 由来 Ly6C^{low} 細胞の CX3CR1 の発現は WT 由来 Ly6C^{low} 細胞と比較して有意に高かった。CCR2 受容体拮抗薬を使用した実験では、対照群と比較して ALT 値や壊死面積は有意に高く、PCNA の発現は

では有意に減少していた。

肝組織修復における KCs の役割を検討するために、肝虚血再灌流障害における KCs の動態について検討した。フローサイトメトリーによる検討で、WT および mPGES-1^{-/-} の KCs (Ly6C^{low}/CD11b^{low}/F4/80^{high} 細胞)は再灌流後に著明な減少をみとめ、48 時間で最も減少し、96 時間では増加傾向を示した。mPGES-1^{-/-}では 48 時間および 96 時間で KCs は増加する傾向を示したが、有意な差は認めなかった。さらに再灌流後 48 時間における KCs (Ly6C^{low}/CD11b^{low}/F4/80^{high})を分収し、遺伝子発現を確認した。すると、WT および mPGES-1^{-/-}の KCs における炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの発現は何れも有意な差は認めなかった。正常肝より分収された KCs に対し、IFN γ /LPS および IL-4 による刺激を行ったが、これに関しても有意な差は認めなかった。IFN γ /LPS により刺激された WT 由来 KCs は mPGES-1 の発現を認めた。また、PGE2 を投与した場合も、炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの発現に有意な差は認めなかった。

mPGES-1 を発現する骨髄由来細胞は肝虚血再灌流障害からの肝修復を抑制する。

骨髄由来マクロファージが肝虚血再灌流障害後の肝修復に重要なことが報告されている。従って、WT または mPGES-1^{-/-}の骨髄を移植したキメラマウスを作成し、mPGES-1 が発現している骨髄由来細胞が肝修復に与える影響を評価した。mPGES-1^{-/-}骨髄キメラマウスは WT 骨髄キメラマウスと比較して、再灌流後 48 時間で ALT 値および壊死面積は有意に減少しており、PCNA は有意に発現が増加していた。WT 骨髄キメラマウスにおける Ly6C^{high} 細胞の割合は mPGES-1^{-/-}骨髄キメラマウスと比較して有意に高く、一方で Ly6C^{low} 細胞は mPGES-1^{-/-}骨髄キメラマウスと比較して有意に減少していた。さらに、我々は肝虚血再灌流障害における骨髄由来細胞の mPGES-1 の役割を明らかにするために、キメラマウスにおける再灌流後 6 時間での障害を評価した。WT 骨髄キメラマウスは mPGES-1^{-/-}骨髄キメラマウスと比較して ALT 値や壊死面積に有意な差は認めなかった。そして、肝組織修復におけるマクロファージの関与を明らかにするために、WT および mPGES-1^{-/-}由来の BMMs を WT に移植した実験を行った。再灌流後 48 時間において、mPGES-1^{-/-}由来の BMMs を移植された WT では、PCNA の発現が有意に増加していた。

骨髄移植によって KCs が置換された程度を評価するため、緑色傾向タンパク質 (GFP)発現骨髄細胞を WT に移植した。フローサイトメトリーによる解析では、レシピエントマウスの KCs が約 40%であるのに対し、そのうちの 15%が GFP 陽性細胞であった。これは 15%がドナー由来細胞であることを示唆している。再灌流後 48 時間で、KCs は 80%の減少を示したが、骨髄由来 KCs の程度は 0 時間と比較して類似していた。再灌流後 96 時間では KCs は低いままであったが(60%の減少)、これらの KCs

の半分が骨髄由来細胞のものであった。

mPGES-1 の薬理的阻害は肝修復を促進する

mPGES-1 は肝修復に必要であるという仮説のもと、mPGES-1 阻害薬である Compound III を利用して実験した。Compound III で前処置された群は対照群と比較して再灌流後 48 時間において血清 ALT 値、壊死面積が有意に減少し、PCNA の発現は有意に増加していた。さらに、CD68 陽性細胞の集積も有意に増加し、炎症関連遺伝子の発現は有意に減少、組織修復関連遺伝子の発現は有意な増加を認めた。そして CCL2/CCR2 の発現は有意に減少し、CX3CL1/CX3CR1 の発現は有意に増加していた。また、ALT 値がピークであった再灌流後 6 時間または再灌流後 24 時間において、WT に Compound III を投与した場合も同様の結果であった。

PGE₂/EP4 シグナルの抑制は肝修復を促進する。

PGE₂/EP4 シグナルが肝組織修復に影響を与えるかどうかを確認するため、EP 受容体拮抗薬を使用した実験を行った。EP1、EP2、EP3 受容体拮抗薬の効果は乏しかったが、EP4 受容体拮抗薬を投与した群では、対照群と比較して有意に ALT 値と壊死面積の減少を認めた。

EP4 受容体シグナルの肝修復における役割を確認するため、EP4^{-/-}を利用して確認した。すると再灌流後 48 時間において、EP4^{-/-}は WT と比較して有意に ALT 値と壊死面積が減少し、PCNA の発現が増加していた。肝組織 mRNA においても炎症関連遺伝子(TNFα、IL-1β、IL-6、iNOS)の発現は有意に減少し、組織修復関連遺伝子(MR、Fizz1、IL-10)の有意な増加を認めた。

EP4 シグナルはマクロファージの分化を誘導する

PGE₂/EP4 シグナルがマクロファージの分化誘導に与える役割を検討した。WT 由来の BMMs に PGE₂ を投与すると、炎症関連遺伝子である IL-1β、IL-6、iNOS の発現は増加するのに対し、EP4^{-/-}では発現の増加は認めなかった。対照的に PGE₂ の投与により MR、Fizz1、IL-10 の発現には有意な変化は認めなかった。これらの結果から M1 マクロファージの分化誘導は EP4 シグナルに依存することが示唆された。この結果を確認するために、EP4 受容体作動薬(ONO-AE1-329)を投与した実験を行った。すると、PGE₂ を投与した場合と同様に炎症関連遺伝子は有意に発現の上昇が確認され、EP4^{-/-}では確認されなかった。また組織修復関連遺伝子の発現は有意な変化を認めなかった。

マクロファージの分化誘導における EP4 シグナルの役割を *in vitro* において検証した。WT 由来 BMMs に IFNγ/LPS および IL-4 より刺激されたマクロファージは、それぞれ炎症関連遺伝子および組織修復関連遺伝子の発現が増加していた。一方で EP4^{-/-}

由来 BMMs を IFN γ /LPS で刺激したマクロファージでは IL-1 β および IL-6 で発現が減少しており、TNF- α や iNOS では変化は認めなかった。そして EP4^{-/-}由来 BMMs を IL-4 で刺激したマクロファージでは、組織修復関連遺伝子の発現が増加するものの、WT 由来 BMMs と比較して有意な変化は認めなかった。これらの結果から、EP4 受容体シグナルは炎症性マクロファージへの分化を誘導することが示唆された。

【結語】

これらの結果から、mPGES-1 の誘導により産生された PGE₂ は EP4 シグナルを介して炎症や肝修復を抑制することが示唆された。mPGES-1 を制御することは、肝虚血再灌流障害を軽減し、肝組織修復を促進させる免疫系を刺激する。mPGES-1 の阻害は炎症の収束や障害肝からの修復をもたらす可能性があり、肝虚血再灌流障害における急性肝障害の治療薬として良い標的となりうる。