

皮膚疾患におけるプロスタグランジン最終合成酵素群の機能解析

昭和大学薬学部社会健康薬学講座衛生薬学部門

原 俊太郎

Microsomal prostaglandin (PG) E synthase-1 (mPGES-1) and prostacyclin synthase (PGIS) are PG terminal synthases that function downstream of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in the PGE₂ and PGI₂ biosynthetic pathways, respectively. In the present study, to reveal the role of these PG terminal synthases in skin diseases, we investigated the effects of genetic deletion of mPGES-1 and PGIS on skin disease models in mice. As the results, we found that both mPGES-1- and PGIS-deficient mice exhibited a significantly decreased contact hypersensitivity response, indicating that mPGES-1 and PGIS cooperatively exacerbate skin inflammatory reactions. Chemical-induced skin carcinogenesis was also suppressed by mPGES-1 deficiency, but PGIS deficiency did not affect skin carcinogenesis. mPGES-1 plays an important role in skin carcinogenesis, but contribution of PGIS might be little.

1. 緒言

プロスタグランジン (PG) 類は様々な生理現象に関わるばかりでなく、炎症やがんといった幅広い病態の発症や進行にも関わることが知られている。各々のPG類はシクロオキシゲナーゼ (COX) によりアラキドン酸から産生されたPGH₂に、それぞれのPG類に特異的なPG最終合成酵素が作用することにより産生される (図1)。アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) はCOXを抑制しこのPG類の産生を抑えることで、抗炎症作用、抗がん作用といった薬理作用を発揮するが、従来用いてこられたNSAIDsは胃粘膜保護作用など重要な生理作用を示すPG類を含め、すべてのPG類産生を抑えてしまうために、多くの副作用を併せもつことが問題となっている。また、皮膚疾患においては、NSAIDsがアレルギー性皮膚炎を逆に増悪化すること、一部のNSAIDsが光過敏症を誘発することも知られており、NSAIDsの皮膚疾患への適用を妨げる大きな要因となっている。そこで、本研究では、皮膚疾患にも適用可能な新たなNSAIDsの創製を指向し、従来のNSAIDsが標的とするCOXに代わる新たな創薬標的として、COXの下流ではたらくPG最終合成酵素、中でもPGE合成酵素の1つ、膜結合型PGE合成酵素-1 (mPGES-1) と、PGI合成酵素 (PGIS) に注目した。NSAIDsの標的であるCOXには、生体の恒常性維持に主に関わる構成型のCOX-1と、炎症やがんの発症や進展に伴い発現誘導される誘導型のCOX-2の2つのアイソザイムが存在するが、

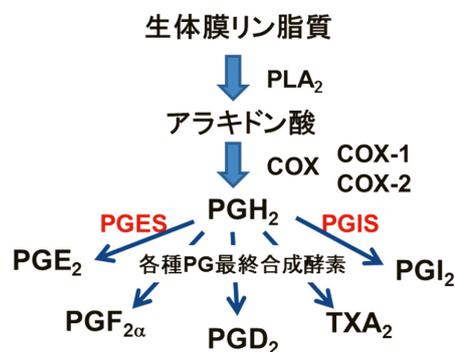


図1 プロスタグランジン類の合成経路

mPGES-1とPGISはいずれもこのうちCOX-2と選択的に機能関連し、それぞれPGE₂、PGI₂を産生する酵素である¹⁾。本研究では、mPGES-1およびPGISの遺伝子欠損マウスを用い、皮膚炎や皮膚がんを惹起した際に、野生型マウスと、病態の発症や進行にどのような違いがみられるか検討した。また、病態の発症や進行に伴い産生される各PG類を、LC-MS/MSを用い経時的に定量解析した。

本研究で解析を行うmPGES-1の特異的阻害剤については、現在、副作用の少ないNSAIDsとして国内外でその開発が進んでいるが、この新たな阻害剤は、これまでのNSAIDsとは作用点だけでなく構造もかなり異なり、それゆえに光過敏症等を起こさない可能性も期待できる。これらの研究は、PG最終合成酵素群を標的とする新たな皮膚疾患の治療薬の可能性を示すだけでなく、今まで明らかとなっていなかった皮膚疾患の新たな発症、進展の機構の解明にもつながることが期待される。

2. 実験

2.1. 動物

mPGES-1の遺伝子欠損マウス²⁾は大阪大学の審良静男教授より寄贈されたmPGES-1遺伝子ヘテロ欠損 (+/-) マウス (C57BL/6×129Sv系) を、PGISの遺伝子欠損マウス³⁾



Role of prostaglandin terminal synthases in skin disease

Shuntaro Hara

Division of Health Chemistry, Department of Healthcare and Regulatory Sciences, School of Pharmacy, Showa University

は神奈川県工科大学の横山知永子先生より寄贈されたPGIS遺伝子ヘテロ欠損(+/-) マウス (C57BL/6系) を交配したものおよび、それぞれBalb/c系に10代以上戻し交配したものをを用いた。これらのマウスの尻尾先端部からDNAを抽出後、常法によりジェノタイプングし、KO、ヘテロ、WTに識別し、各実験に使用した。

2. 2. DNFB誘導アレルギー性接触皮膚炎モデル

アレルギー性接触皮膚炎におけるmPGES-1、PGISの役割を検討するために、dinitrobenzene sulfonic acid (DNFB) によるアレルギー性接触皮膚炎を惹起した。DNFBはアセトン：オリーブオイル=4：1溶液として用いた。まず、Balb/c系マウスの腹部の毛をバリカンで剃り、翌日に0.5% DNFBを塗布した後5日間おいて感作を成立させた。5日後、マウスの右耳介皮膚に0.3% DNFBを塗布し、耳介の厚さを1、2、3、5、7、14日と継続的に測定し、アレルギー性皮膚炎の指標とした。また、コントロールとして左耳介にはアセトンのみを塗布した。DNFBを耳介に塗布して2日後の耳介組織を摘出し、組織標本の作製、組織中のPG類の定量に用いた。

2. 3. TPA誘導一次刺激性接触皮膚炎モデル

一次刺激性接触皮膚炎におけるmPGES-1、PGISの役割を検討するために、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による皮膚炎を惹起した。TPAはエタノールに溶解して16 mMに調製してストックし、使用時に16 μMになるようにアセトン溶液とした。マウスの右耳介にTPA 3.2 nmol (200 μL/mouse) を塗布後、耳介の厚さを1、3、5、6、24時間と継続的に測定し、皮膚炎の指標とした。また、コントロールとして左耳介にはアセトンのみを塗布した。

2. 4. DMBA/TPA誘導皮膚発がんモデルを用いた解析

皮膚での化学発がんにおけるmPGES-1、PGISの役割を検討するために、7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) /TPAを用いた2段階発がんモデルによる解析を行った。DMBAは2 mMアセトン溶液とし、TPAは16 μMアセトン溶液とした。マウスの背部皮膚に、DMBA 0.4 μmol (200 μL/mouse) を塗布し、1週間後から1週間に2度ずつTPA 3.2 nmol (200 μL/mouse) を塗布した。20週間後に皮膚に生じたポリープ数をカウントするとともに、皮膚組織の病理学的解析、PG類の定量、PG産生酵素の発現レベル解析を行った。

2. 5. 組織中PG類の定量

摘出した組織をBead Crusher (Taitec) を用いてメタノール中でホモジネートした。3000 rpm、4℃、5分間遠心した後に、上清を回収し脂質を抽出した。調製したライゼートに内部標準としてLTB4-d4を加え、3 mLのPBSにて希釈後、塩酸を1滴加えた試料を事前にメタノール5 mL、蒸留水5 mLで洗浄したSEP-PAK C18 (Waters) カラムに吸着させ、蒸留水、15%エタノール、ベンゼンの順に各5 mLで洗浄後、酢酸エチル・メタノール(9：1)溶液3 mLで溶出してPG類を抽出した。溶媒を除去し、水：アセトニトリル：ギ酸(63：37：0.02)に再度溶解し、測定用サンプルとした。

PG類の測定はLC-MS/MSの系⁴⁾で行った。液体クロマトグラフィー(LC)の分離はProminence HPLCシステム(島津)を用いて以下の条件で行った(カラム：TSKgel ODS-100 V column (2.0×150mm 内径、5 μm particle、Tohso)、サンプル流入量：5 μL)。移動相は水：アセトニトリル：ギ酸(63：37：0.02)とアセトニトリル：イソプロパノール(1：1)のグラジエントでカラムに保持された試料を流速300 μL/minで溶出させた。MS/MS解析はトリプル四重極質量分析装置QTRAP5500システム(AB Sciex)を用いてイオンを検出した。

抽出した組織にTRIZOL (Invitrogen) 500 μLを加えて細胞を破碎し、常法によりRNAを抽出した。抽出したRNAをHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。合成したcDNAを用いて定量的PCRを行い、mRNA発現を解析した。反応はApplied Biosystems Step One™ Real-Time PCR SystemによってPower SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて行った。

2. 6. RNAの調製、逆転写、定量的PCR

抽出した組織を中性緩衝ホルマリン溶液によって固定後、パラフィン包埋して薄切した。ヘマトキシリン・エオジン染色には、マイヤーヘマトキシリン溶液(WAKO) および1%エオシンY液(武藤化学)を用いた。

2. 7. 組織標本の作製

抽出した組織を中性緩衝ホルマリン溶液によって固定後、パラフィン包埋して薄切した。ヘマトキシリン・エオジン染色には、マイヤーヘマトキシリン溶液(WAKO) および1%エオシンY液(武藤化学)を用いた。

3. 結果

3. 1. mPGES-1の欠損はアレルギー性接触皮膚炎を抑制する

はじめに、mPGES-1の接触性皮膚炎における役割を明らかにするために、DNFBを用いたアレルギー性接触皮膚炎モデルによる解析を行った。DNFBを腹部に塗布し、感作させたのち、DNFBを耳介に塗布すると、野生型マウスでは2日後をピークに耳介が肥厚し、その後緩やかに寛解した。

一方、mPGES-1 欠損マウスでは、野生型マウスと同じく 2 日目をピークに耳介の肥厚が認められたが、野生型マウスと比較すると肥厚の程度は抑制されていた。

3. 2. PGIS の欠損はアレルギー性接触皮膚炎を抑制する

次に、PGIS の接触性皮膚炎における役割を検討するために、同様に、DNFB を用いてアレルギー性接触皮膚炎を惹起した。PGIS 欠損マウスにおいても DNFB を耳介に塗布してから 2 日目に最も肥厚が認められたが、野生型マウスと比較して、耳介の肥厚は抑制された(図 2)。

野生型マウスの耳介組織中の PG 類の量を測定したところ、DNFB を塗布してから 2 日後には PGI_2 代謝物である 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ 量が増加していたが、PGIS 欠損マウスでは 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ は検出されなかった。これらの結果より、

PGIS の欠損は PGI_2 産生を抑制し、アレルギー性接触皮膚炎を抑制することが示唆された。

さらに、一次刺激性皮膚炎への PGIS の関与を調べるために、TPA を耳介に塗布して皮膚炎を惹起し、耳介の肥厚を測定した。TPA による耳介の肥厚は PGIS 欠損マウスにおいても野生型マウスと同程度であった。

3. 3. mPGES-1 の欠損は皮膚化学発がんを抑制する

さらに、mPGES-1 の皮膚化学発がんにおける役割を明らかにするために、DMBA/TPA による皮膚化学発がんモデルによる解析を行った。野生型マウスでは DMBA/TPA の塗布により 12 匹中 11 匹のマウスに皮膚腫瘍が形成されたのに対し、mPGES-1 欠損マウスでは 8 匹中 2 匹にしか腫瘍は観察されず、発がん率の顕著な低下が認められた(図 3)。さらに、腫瘍数を測定したところ、野生型マウス

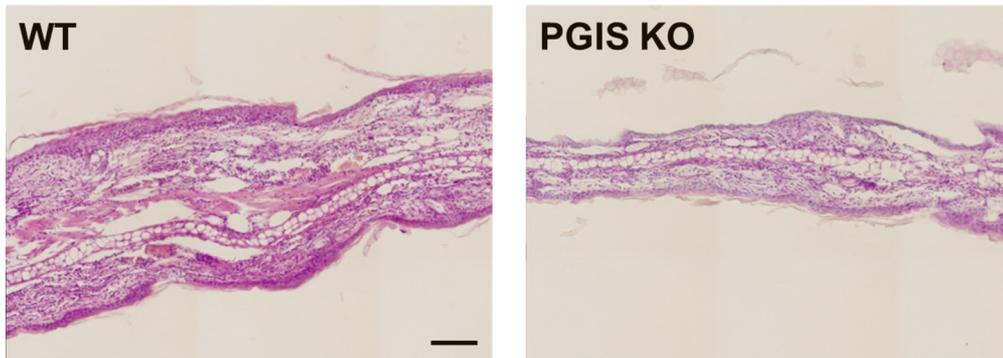


図 2 野生型および PGIS 欠損マウスにおけるアレルギー性接触皮膚炎反応
HE 組織染色 (bar : 100 μm)

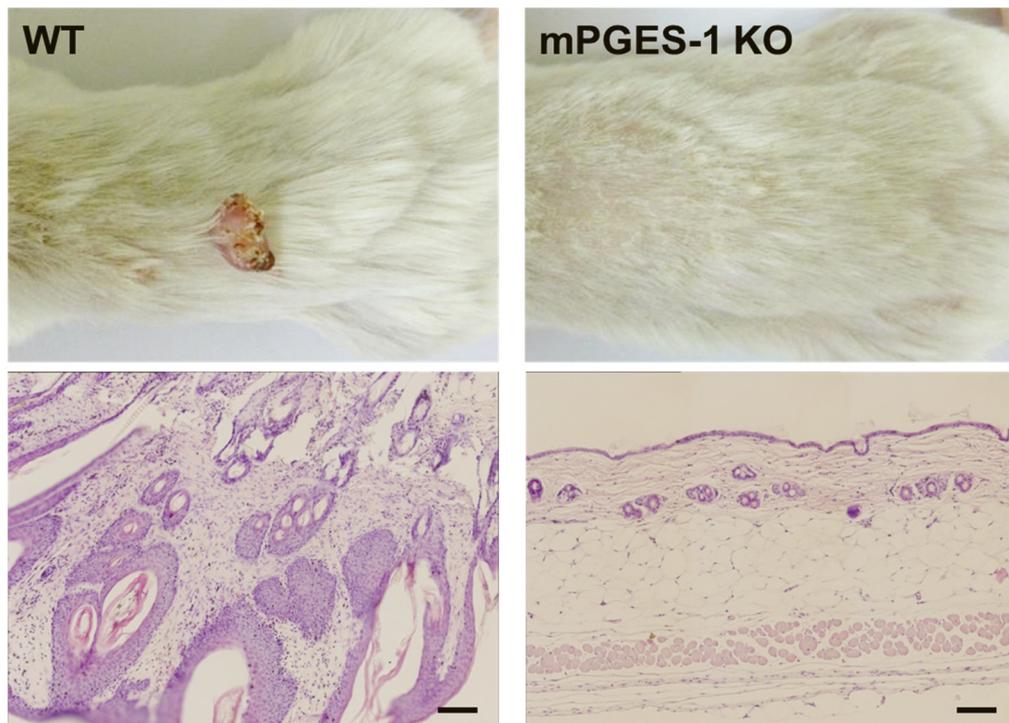


図 3 野生型および mPGES-1 欠損マウスにおける皮膚化学発がん
上 : 肉眼所見、下 : HE 組織染色 (bar : 100 μm)

では12匹中4匹において10個以上の腫瘍が認められたが、mPGES-1欠損マウスでは腫瘍が形成された2匹においても5個または6個しか認められなかった。これらの結果より、mPGES-1の欠損は発がん率、腫瘍数ともに顕著に抑制することが示唆された。

野生型マウスの皮膚組織中のCOX-2、mPGES-1のmRNA発現を定量的PCRにて解析したところ、未処理の皮膚組織と比較してDMBA/TPA塗布により顕著にCOX-2、mPGES-1発現が促進され、腫瘍組織ではさらに増加した。このときのPGE₂産生をLC/MSを用いて測定したところ、COX-2、mPGES-1発現の増加に伴い、腫瘍組織において顕著に増加していた。一方、mPGES-1欠損マウスではDMBA/TPAによるPGE₂産生が抑制されていた。

これらの結果より、mPGES-1の欠損はPGE₂産生を抑制し、DMBA/TPAによる皮膚における化学発がんを抑制することが明らかとなった。

3. 4. PGISの欠損は皮膚化学発がんに関与しない

さらに、PGISの皮膚化学発がんにおける役割についても解析を行った。Balb/c系PGIS欠損マウスではDMBA/TPAによって8匹中7匹に皮膚に腫瘍が形成され、野生型マウスと同程度の発がんが認められた。Balb/c系マウスは発がん率が高く、ほぼすべてのマウスに発がんが認められている。我々はこれまでに大腸においてはPGISの欠損は化学発がんを促進することを見出しており⁵⁾、より発がんしにくい条件下では皮膚においてもPGISの欠損が発がんを促進する可能性も考え、次にC57BL/6系マウスを用いて同様に皮膚発がんを誘導した。その結果、C57BL/6系マウスにおいても、PGIS欠損マウスでは野生型マウスと同程度の発がんが認められた。また、皮膚においてはPGL₂代謝物である6-ketoPGF_{1α}はほとんど検出されなかった。

これらの結果より、皮膚組織中のPGL₂産生量は少なく、PGISの欠損はDMBA/TPAによる皮膚発がんには関与しないと考えられた。

4. 考 察

以上の結果より、mPGES-1とPGISはそれぞれ、PGE₂およびPGL₂産生を介して接触性皮膚炎を促進することが示唆された。PGE₂受容体にはEP1～EP4の4種類が知られているが、このうちのEP1の欠損マウスではTh1への分化が抑制されることでDNFBによるアレルギー性接触皮膚炎が抑制される⁶⁾。しかし、EP3欠損マウスでは反対に増悪することが報告されている⁷⁾。これは、ケラチノサイトに発現するEP3がCXCL1の発現を抑制することで好中球の浸潤を抑制し、抗炎症作用を示すため、EP3の欠損によって抗炎症作用が抑制されてしまったことによると報告されている。今回、mPGES-1欠損マウスにおいて

DNFBによる接触性皮膚炎が抑制されたのは、mPGES-1/PGE₂/EP1のシグナルが抑制されたためであると考えられる。また、PGL₂受容体であるIPの欠損マウスにおいてもIFN γ 産生の減少に伴い、DNFBによるアレルギー性接触皮膚炎の抑制が認められている⁸⁾。また、PGL₂誘導体はTh1分化を促進することも報告されていることから、mPGES-1とPGISはPGE₂およびPGL₂産生を介してともにTh1分化を促進し、アレルギー性接触皮膚炎に関与することが考えられた。

一方、皮膚化学発がんにおいては、mPGES-1は促進的に作用することに対し、PGISは関与しないことが明らかとなった。PGE₂は多くの組織において発がんを促進することが報告されており²⁾、皮膚においてもEP2の欠損によってDMBA/TPAによる発がんが抑制されること⁹⁾や、反対にEP1、2、4を過剰発現させたマウスでは発がんが促進されること¹⁰⁻¹²⁾が報告されている。今回mPGES-1の欠損が皮膚においても化学発がんを抑制することが明らかとなったことで、皮膚においてもmPGES-1によって産生されたPGE₂がEP受容体を介して発がんを促進していることが裏付けられた。PGL₂とがんの関連についてはPGISの遺伝子多型が発がんリスクに関わるといった報告¹³⁾があるものの、その機構についてはほとんどわかっていない。我々はこれまでにPGISの欠損が大腸における化学発がんを促進することを見出してきた⁵⁾が、皮膚発がんへのPGISの関与については全く不明であった。本研究により組織によってPGISの発がんへの寄与は異なる可能性が示唆された。今後どのような要因がPGISと発がんを結びつけるのか解明していく必要がある。

5. 総 括

本研究により、アレルギー性接触皮膚炎においてはmPGES-1とPGISがともに促進的に作用し、協調的な働きをしていることが明らかとなった。また、皮膚化学発がんにおいてはmPGES-1が促進的に働く一方で、PGISの関与はないことが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、コスメトロジー研究振興財団より研究助成を賜りましたこと、心より感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Smith WL, Urade Y, Jakobsson PJ, : Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis, Chem. Rev., 111, 5821-5865, 2011.
- 2) Sasaki Y, Kamei D, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Murakami M, Hara S, : Microsomal prostaglandin E synthase-1 is involved in multiple

- steps of colon carcinogenesis, *Oncogene*, 31, 2943-2952, 2012.
- 3) Yokoyama C, Yabuki T, Shimonishi M, Wada M, Hatae T, Ohkawara S, Takeda J, Kinoshita T, Okabe M, Tanabe T, : Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction, *Circulation*, 106, 2397-2403, 2002.
 - 4) Kuwata H, Yoshimura M, Sasaki Y, Yoda E, Nakatani Y, Kudo I, Hara S, : Role of long-chain acyl-coenzyme A synthetases in the regulation of arachidonic acid metabolism in interleukin 1 β -stimulated rat fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 1841, 44-53, 2014.
 - 5) Sasaki Y, Kamiyama S, Kamiyama A, Matsumoto K, Akatsu M, Nakatani Y, Kuwata H, Ishikawa Y, Ishii T, Yokoyama C, Hara S, : Genetic-deletion of cyclooxygenase-2-downstream prostacyclin synthase suppresses inflammatory reactions but facilitates carcinogenesis, unlike deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1, *Sci. Rep.*, 5, 17376, 2015.
 - 6) Nagamachi M, Sakata D, Kabashima K, Furuyashiki T, Murata T, Segi-Nishida E, Soontrapa K, Matsuoka T, Miyachi Y, Narumiya S, : Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1, *J. Exp. Med.*, 204, 2865-2874, 2007.
 - 7) Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S, : Prostaglandin E₂-EP₃ signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 124, 809-818, 2009.
 - 8) Nakajima S, Honda T, Sakata D, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Moniaga CS, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K, : Prostaglandin I₂-IP signaling promotes Th1 differentiation in a mouse model of contact hypersensitivity, *J Immunol.*, 184, 5595-5603, 2010.
 - 9) Sung YM, He G, Fischer SM, : Lack of expression of the EP2 but not EP3 receptor for prostaglandin E2 results in suppression of skin tumor development, *Cancer Res.*, 65, 9304-9311, 2005.
 - 10) Surh I, Rundhaug JE, Pavone A, Mikulec C, Abel E, Simper M, Fischer SM. : The EP1 receptor for prostaglandin E2 promotes the development and progression of malignant murine skin tumors, *Mol. Carcinog.*, 51, 553-564, 2012.
 - 11) Sung YM, He G, Hwang DH, Fischer SM. : Overexpression of the prostaglandin E2 receptor EP2 results in enhanced skin tumor development, *Oncogene*, 25, 5507-5516, 2006.
 - 12) Simper MS, Rundhaug JE, Mikulec C, Bowen R, Shen J, Lu Y, Lin K, Surh I, Fischer SM, : The tumor promoting activity of the EP4 receptor for prostaglandin E2 in murine skin, *Mol. Oncol.*, 8, 1626-1639, 2014.
 - 13) Poole EM, Bigler J, Whitton J, Sibert JG, Potter JD, Ulrich CM. : Prostacyclin synthase and arachidonate 5-lipoxygenase polymorphisms and risk of colorectal polyps, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15, 502-508, 2006.