

Prostaglandin D2 に着目した筋萎縮性側索硬化症の病態解明と創薬研究

研究代表者 小菅康弘（日本大学薬学部薬理学研究室）

【目的】筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの選択的変性を特徴とする極めて予後不良の神経変性疾患である。これまで、研究代表者は、ALS 患者の脊髄で上昇する prostaglandin E2 (PGE2)に着目し、ALS の病態形成における PGE2 の役割について解明してきた (1-3)。五員環構造を含む 20 個の炭素鎖からなる生理活性脂質である prostaglandin は、PGE2 以外にも様々な種類の prostaglandin が生体内に存在する。睡眠・体温・痛みなどの調節に関与する生理活性物質のひとつである Prostaglandin D2 (PGD2)は、近年、脳内のミクログリアやアストロサイトの活性化を介して神経炎症を増悪させることが明らかにされている (4)。一方で、末梢組織で増加する PGD2 は、その受容体 (DP 受容体)の活性化を介して血管透過性や炎症細胞の浸潤に関与することが報告されている (5)。このように PGD2 は組織や細胞により多様な作用を示す。近年、ALS 患者の脊髄において、PGD2 代謝産物が増加することが報告されている (6) もの、脊髄における PGD2 の機能や役割については不明な点が多い。本研究では、運動ニューロンのモデル細胞 (NSC34 細胞)および ALS モデルマウスを用い、ALS の病態形成の中心命題である運動ニューロン死における PGD2 およびその受容体の役割 (DP 受容体) を解明することを目的とした。特に、研究代表者がこれまでに解明した PGE2 およびその受容体に関与する運動ニューロン死誘発機構 (1-3) との相違点については詳細に比較検討した

【方法】NSC-34 は、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium 中で 37°C、5% CO₂ 条件で培養した。神経突起の伸長は位相差顕微鏡像により評価した。PGD2 受容体 (DP) 及び PGE2 受容体 (EP) の発現は Western blot 法により検討した。培養液中の PGD2 及び 15-deoxy-delta 12, 14-PGJ2 (15d-PGJ2) の量は ELISA 法により測定した。活動電位及び内向き電流は、Whole-cell patch-clamp 法により記録した。

【結果及び考察】

はじめに、NSC-34に発現する受容体について検討したところ、PGD2受容体であるDPではDP1及びDP2の発現が、EPではEP2及びEP3の発現が認められた。そこで、神経分化に及ぼす影響を検討したところ、PGD2及びPGE2の処置は、いずれも濃度依存的に神経突起を伸長させた。また、DP作動薬の影響を検討したところ、DP1作動薬BW245C及びDP2作動薬15 (R)-15-methyl PGD2にはいずれも神経突起の伸長に影響を及ぼさなかった。次に、培養液中のPGD2量及び15d-PGJ2量について検討したところ、PGD2添加2時間後以降でPGD2量の有意な減少及び4時間後以降で15d-PGJ2量の時間依存的な増加が認められた。15d-PGJ2は、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) の刺激作用を有するため、PPAR γ 選択的

拮抗薬GW9662をPGD2と併用したところ、PGD2による神経突起伸長は消失した。同様に、EP作動薬の影響を検討したところ、EP2作動薬Butaprostは神経突起を伸長させたが、EP3作動薬Sulprostoneは影響を及ぼさなかった。また、cAMPアナログdibutyryl cAMP処置によっても、神経突起伸長が認められた。以上より、PGD2及びPGE2はいずれも神経突起を伸長することが明らかとなった。また、PGE2による神経突起伸長作用には、EP2の直接刺激及びそれに続くcAMPの増加が関与するのに対し、PGD2による神経突起伸長作用には、代謝産物15d-PGJ2を介したPPAR γ 活性化が関与することが明らかになった

次に、ニューロン様に分化した NSC-34 を用いて、細胞生存に及ぼす影響を検討した。PGD2 及び PGE2 の処置はいずれも濃度依存的に神経死を誘発した。そこで、作動薬の影響を検討したところ、EP2 作動薬 Butaprost は細胞死を誘発させたが、EP3 作動薬 Sulprostone は細胞の生存に影響を及ぼさなかった。加えて、DP1 作動薬 BW245C および DP2 作動薬 15(R)-15-methyl Prostaglandin D2 も NSC34 細胞の生存に影響を及ぼさなかった。この PGE2 誘発細胞死は EP2 拮抗薬 PF-0441848 の併用により抑制されたが、PGD2 誘発細胞死は、DP1 拮抗薬である BWA868C や DP2 拮抗薬である CAY10471 の共存下でも抑制されなかった。一方で、NSC34 細胞を用いて PGD2 誘発細胞死を抑制する化合物の検索を行った。その結果、抗酸化作用を示す N-acetylcystein (NAC) は、PGD2 誘発細胞死を部分的に抑制したものの顕著な細胞保護効果を示さなかった。これに対して、NAC は PGE2 誘発細胞死を完全に抑制した。そこで、DCFH-DA プローブを用いて活性酸素種 (ROS) レベルを測定したところ、PGE2 や EP2 受容体作用薬 butaprost, 処置細胞では、時間依存的に細胞内 ROS レベルが増加した。この増加は、PF-0441848 の併用により抑制された。以上より、PGE2 は EP2 受容体の活性化を介して細胞内 ROS レベルを増加させることが明らかとなり、PGE2 が細胞内 ROS のドナーとなるという新たな病態形成メカニズムを提唱するに至った。

最後に、PGE₂ 処置によりニューロン様に形態変化した NSC-34 が電気生理学的にニューロンとしての機能を有するか否かを検討した。ニューロンへの分化の指標の一つである電流密度を比較すると、Vehicle 処置細胞 (未分化の細胞) の 224 pA/pF に対し、PGE₂ 処置細胞では 495 pA/pF で有意な増大が認められた。既存の分化誘導薬である (7) Retinoic acid (RA) 処置細胞の電流密度は、394 pA/pF で Vehicle 処置細胞より増加したものの有意なものではなかった。同様に、活動電位についても検討したところ、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞では、活動電位の発生が確認されたのに対し、vehicle 処置細胞では記録したすべての細胞において活動電位の発生は認められなかった。また、活動電位の発生に必要な閾値電流は、RA 処置細胞の 525 pA に対し、PGE₂ 処置細胞では 263 pA であり、有意に低下していた。PGE₂ 処置細胞は、RA 処置細胞と比較して、成熟度の高い運動ニューロンへと分化していることが明らかとなった。以上より、NSC-34 において、PGE₂ は、分化誘導薬として使用されている RA よりも迅速に、活動電位を発生する細胞へと分化させることが明らかとなった。

【結論】 本研究では、PGE2 と同様に PGD2 にも運動ニューロンへの分化促進作用とともに細胞死促進作用を有することが明らかとなった。興味深いことに、PGD2 は細胞膜貫通型受容体の活性化を介さないメカニズムで細胞死や分化が進行することが示唆された。一方で、PGE2 は細胞膜貫通型受容体の活性化依存的に酸化ストレスを誘発することで細胞死を誘発するという新たな細胞死誘発経路を発見することに成功した。本研究の成果は、PGE2 が酸化ストレスと神経炎症をつなぐ Key Factor となる可能性を示しており、抗酸化薬を用いた神経炎症制御法開発において基盤となる知見である。今後、モデルマウスによる検証を重ねることで、プロスタノイドを用いた ALS 治療薬開発に繋げていきたいと考えている。

【謝辞】 本研究の一部は、平成 30 年度日本大学薬学部研究推進助成金により行われた。本研究の遂行にあたりご協力いただきました宮岸 寛子 助教、南郷 拓嗣 大学院生(本学大学院薬学研究科)をはじめ、日本大学薬学部薬理学研究室の皆様感謝いたします。

【参考文献】

- 1) Miyagishi H, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the spinal cord in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci.* 2012;118:225-236.
- 2) Miyagishi H, Kosuge Y, Yoneoka Y, Ozone M, Endo M, Osada N, Ishige K, Kusama-Eguchi K, Ito Y. Prostaglandin E2-induced cell death is mediated by activation of EP2 receptors in motor neuron-like NSC-34 cells. *J Pharmacol Sci.* 2013;121:347-350.
- 3) Kosuge Y, Miyagishi H, Shinomiya T, Nishiyama K, Suzuki S, Osada N, Ishige K, Okubo M, Kawaguchi M, Ito Y. Characterization of Motor Neuron Prostaglandin E2 EP3 Receptor Isoform in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biol Pharm Bull.* 2015;38:1964-1968.
- 4) Mohri I, Kadoyama K, Kanekiyo T, Sato Y, Kagitani-Shimono K, Saito Y, Suzuki K, Kudo T, Takeda M, Urade Y, Murayama S, Taniike M. Hematopoietic prostaglandin D synthase and DP1 receptor are selectively upregulated in microglia and astrocytes within senile plaques from human patients and in a mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(6):469-480.
- 5) Kobayashi K, Tsubosaka Y, Hori M, Narumiya S, Ozaki H, Murata T. Prostaglandin D2-DP signaling promotes endothelial barrier function via the cAMP/PKA/Tiam1/Rac1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:565-571
- 6) Shinozawa T, Urade Y, Maruyama T, Watabe D. Tetranor PGDM analyses for the amyotrophic lateral sclerosis: positive and simple diagnosis and evaluation of drug effect. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;415:539-544.
- 7) Maier O, Böhm J, Dahm M, Brück S, Beyer C, Johann S. Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem Int.* 2013;62:1029-1038.