

炎症制御機構における trypsin の役割と
PAR2 発現制御に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

小松 浩之

2013 年 3 月

目次

諸言	1
第1章 PGE ₂ によるPAR2の発現調節機構に対する研究	6
第1節 背景	6
1-1 Prostaglandin E ₂ とその生理作用	6
1-1-1 Prostaglandin E ₂	6
1-1-2 PGE ₂ の生合成	6
1-1-3 E-prostanoid receptors	6
1-1-4 PGE ₂ の生理作用	8
1-2 PARとPGE ₂ の相互作用	8
1-3 研究の目的	9
第2節 実験結果	11
2-1 PGE ₂ がPAR2活性化に与える影響	11
2-1-1 PGE ₂ がPAR2-APによるERKリン酸化に与える影響	11
2-1-2 PGE ₂ のPAR2活性化抑制作用に対するPGE ₂ 受容体阻害剤の影響	11
2-2 PGE ₂ がPAR2の局在に与える影響	14
2-2-1 膜表面PAR2発現に対するPGE ₂ の影響	14
2-2-2 PAR2局在に対するPGE ₂ の影響	16
2-3 細胞内cAMPがPAR2-APによるERKリン酸化に与える影響	18
第3節 考察	22
3-1 PGE ₂ によるPAR2活性化の抑制作用	22
3-2 PGE ₂ によるPAR2内在化	22
3-3 PGE ₂ がPAR4に与える影響	25
3-4 EP2およびcAMPシグナルがPAR2に与える影響	25
3-5 炎症性疾患にPGE ₂ によるPAR2制御機構が与える影響	26
3-5-1 炎症性疾患におけるPAR2の作用	26
3-5-2 呼吸器疾患におけるPAR2とPGE ₂ の相互作用	26
第4節 結論	28

第2章 マクロファージにおける LPS シグナルに対する trypsin の影響	30
第1節 背景	30
1-1 急性膵炎とマクロファージ	30
1-1-1 急性膵炎	30
1-1-2 急性膵炎におけるマクロファージの意義	30
1-2 Trypsin と PAR2 が急性膵炎に与える影響	31
1-3 LPS シグナルと PAR2 の相互作用	32
1-3-1 LPS シグナル伝達経路	32
1-3-2 TLR4 と PAR2 の相互作用	34
1-4 研究の目的	34
第2節 実験結果	36
2-1 マクロファージにおける LPS シグナルに対する trypsin の影響	36
2-1-1 LPS による NO 産生に対する trypsin の影響	36
2-1-2 LPS による iNOS 発現に対する trypsin の影響	38
2-1-3 LPS による炎症性サイトカイン産生に対する trypsin の影響	41
2-1-4 炎症性サイトカイン産生に対する PAR2 の関与	41
2-2 Trypsin の抑制作用に対する PAR の関与	44
2-2-1 Trypsin の抑制作用に対する PAR2 の影響	44
2-2-2 Trypsin の抑制作用に対する PAR1, 3, 4 の影響	47
2-3 Trypsin の抑制作用に対するプロテアーゼ活性の影響	50
2-4 LPS に対する trypsin の影響	50
2-5 LPS 受容体発現量に対する trypsin の影響	53
2-5-1 細胞膜上の LPS 受容体に対する trypsin の影響	53
2-5-2 培地中の sMD-2 および sCD14 に対する trypsin の影響	55
2-5-3 組換え CD14 に対する trypsin の影響	55
第3節 考察	58
3-1 マクロファージの炎症性メディエーター産生に対する trypsin の影響	58
3-2 Trypsin の抑制作用に対する PAR の関与	60
3-2-1 Trypsin 抑制作用に対する PAR2 の関与	60

3-2-3	Trypsin の抑制作用に対する PAR1, PAR3 および PAR4 の関与	60
3-3	LPS 受容体に対する trypsin の作用	61
3-2-1	TLR4 に対する trypsin の影響	61
3-2-2	MD-2 に対する trypsin の影響	62
3-2-3	CD14 に対する trypsin の影響	63
3-3	結論	64
第3章	総合考察	65
第4章	実験材料及び方法	70
4-1	細胞培養	70
4-1-1	腹腔マクロファージの採取及び培養	70
4-1-2	各種細胞株の培養	70
4-2	培地中の一酸化窒素量の測定	71
4-3	Western blot 法によるタンパク質発現量測定	71
4-3-1	タンパク質の抽出	71
4-3-2	Western blot 法	72
4-4	Real-time RT PCR 法による mRNA 発現量測定	72
4-4-1	mRNA の抽出および逆転写	72
4-4-2	Real-time PCR 法	73
4-5	昆虫細胞を用いた組換えヒト CD14 タンパク質の生産	73
4-6	プラスミド作成と細胞へのトランスフェクション	75
4-6-1	プラスミドの産生	75
4-6-2	プラスミドの細胞へのトランスフェクション	76
4-7	免疫組織染色法による Flag-PAR2 および Flag-PAR4 分布の観察	76
4-7-1	免疫組織染色法	76
4-7-2	Flag タグを付加した PAR の細胞内分布評価法	77
4-8	フローサイトメトリー法による細胞表面 PAR2 の評価	77
4-8-1	Flag-PAR2-mCherry を恒常的に過剰発現する HEK293T 細胞の作成	77
4-8-2	フローサイトメトリー法	77

4-9 使用藥品	79
4-10 統計處理	80
引用文獻	81
謝辭	99

諸言

細胞はその周囲の環境を迅速かつ的確に把握し、対応していかなければならない。さまざまな細胞外刺激に最初に対応するのは、細胞に発現する各種受容体である。プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor ; PAR) は、多くの細胞機能を調整する受容体であり、特定のセリンプロテアーゼにより活性化される。ヒトの遺伝子のおよそ 2% がプロテアーゼであり、消化吸収、生体防御、活性制御など様々な生理的役割を担っている¹。そのためプロテアーゼによるシグナルの一部を担う PAR は、広範な分布域と複雑で多様な機能を持つ。

PAR は、G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体 (GPCR) である。この受容体は、PAR1 ~ PAR4 の 4 つのサブタイプからなる PAR ファミリーを構成している。PAR は静止状態では、細胞外 N 末ペプチド鎖中に活性アミノ酸配列がマスクされた状態で存在している。プロテアーゼは、この細胞外に出ている N 末端側ペプチドの特定部位を不可逆的に切断し、露出したペプチド配列がリガンド (tethered ligand) となり、細胞外第二ループ部位に結合して PAR 自身が活性化される² (図 1A)。PAR1, PAR3 および PAR4 は thrombin 受容体として発見され、PAR2 は trypsin 受容体として知られているが、その他さまざまなプロテアーゼによっても活性化される。また、各 PAR サブタイプを特異的に活性化するペプチドとして、それぞれの PAR の tethered ligand 配列から合成されたペプチド (PAR 特異的活性化ペプチド ; PAR-AP) が存在する (図 1B)。各 PAR サブタイプの tethered ligand 配列は表 1 に示すとおりである。活性化された PAR は、共役する G タンパク質を介してシグナルを伝えるが、PAR サブタイプによって共役する G タンパク質は異なっている (表 1)³。

PAR ファミリーは、血管、免疫細胞、上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞、筋細胞など、哺乳動物の生体内のほぼ全ての細胞に幅広く分布しており^{4,5}、種々の生理機能の調節や病態の発現に関与することが明らかにされている。PAR1, PAR3 および PAR4 は thrombin の受容体であるため凝固系を促進する因子として働くことが知られている⁶⁻⁸。一方、PAR2 は thrombin によって活性化されず、trypsin 様プロテアーゼによって活性化される。PAR2 は、マスト細胞の tryptase、NK 細胞の granzyme A、好中球の proteinase 3 などの免疫系細胞が産生するプロ

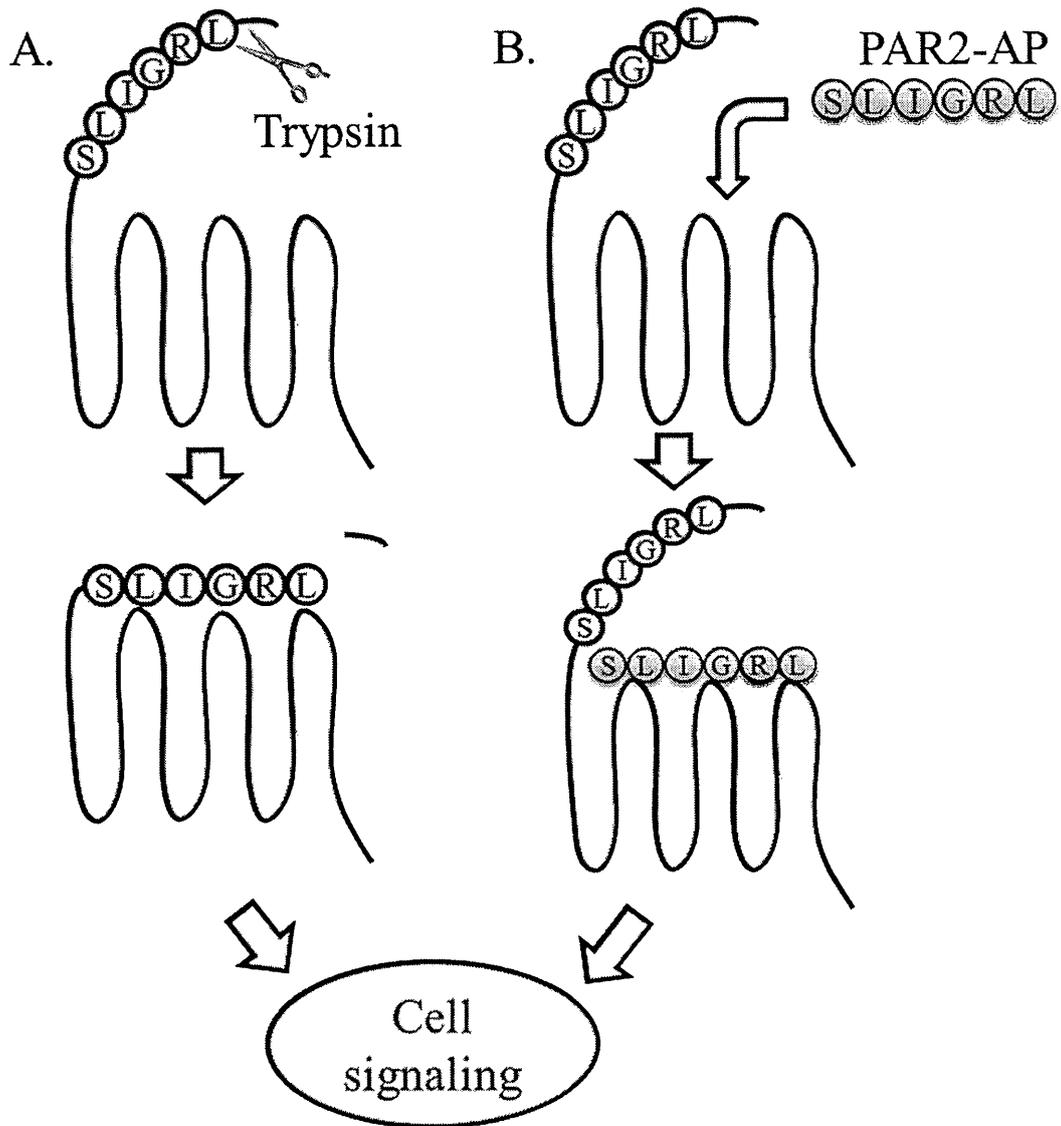


図1 マウス PAR2 の活性化様式

PAR2 の細胞外 N 末端へ trypsin が作用して切断することにより，残った N 末端のペプチド配列がリガンド (tethered ligand) となって PAR2 自身を活性化する (A)。PAR2 選択的活性化ペプチドの SLIGRL-NH₂ は PAR2 へ直接結合し，これを直接活性化する (B)。

表 1 各種 PAR の活性化切断サイト、活性化プロテアーゼおよび共役する G タンパク質

	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
Activating cleavage site	Arg ⁴¹ /Ser ⁴²	Arg ³⁶ /Ser ³⁷	Lys ³⁸ /Thr ³⁹	Arg ⁴⁷ /Gly ⁴⁸
Tethered ligand sequences	SFLLR (human) SFLLR (mouse/rat)	SLIGKV (human) SLIGRL (mouse/rat)	TFRGAP (human) SFNGGP (mouse)	GYPGQV (human) GYPGKF (mouse)
Activating proteases	Thrombin Trypsin TF-VIIa-Xa APC Plasmin MMP1 Granzyme A	Trypsin Tryptase TFVIIa TFVIIa-Xa Matryptase Kallikreins Protease 3 Granzyme A	Thrombin	Thrombin Trypsin TF-VIIa-Xa Kallikreins Plasmin Cathepsin G
Signaling effectors	G _q , G _i , G _{12/13}	G _q , G _i , G _{12/13}	G _q	G _q , G _{12/13}

テアーゼの他に、細菌が産生するプロテアーゼによっても活性化されることから、炎症反応の過程において重要な役割を担っていると考えられている^{9,10}。

様々な疾患において炎症反応を制御する PAR2 であるが、その制御機構は未だ不明な点も多い。炎症反応における PAR2 活性化の報告の多くは炎症を促進させるというものだが、炎症抑制作用を持つという報告もある (図 2)。呼吸器系組織では、PAR2 活性化が炎症性サイトカイン産生による炎症促進作用とともに prostaglandin E₂ (PGE₂) を介した炎症抑制作用を持つことが知られている¹¹⁻¹³。また、急性膵炎ではマクロファージによる炎症性サイトカイン産生が炎症の進行に重要であり、膵消化酵素である trypsin による PAR2 活性化の関与が示唆されている^{14,15}。一方、PAR2 活性化は、粘膜分泌亢進を介して炎症を抑制する作用を示すことが報告されている¹⁶。このように PAR2 による炎症の制御機構は複雑であり、PAR2 の発現調節機構や PAR2 アゴニストの作用を解明することは、PAR2 を介した炎症や病態を理解する上で非常に重要である。

本研究第 1 章では、PAR2 活性化によって産生される炎症性メディエーターのうち、PAR 機能をフィードバック的に制御している可能性のある PGE₂ が PAR2 の発現・機能にあたる影響を検討した。また第 2 章では、PAR2 アゴニストである trypsin が原因の一つと考えられる急性膵炎において、炎症の進行において主要な役割を担うマクロファージに対する trypsin の作用について研究を行った。

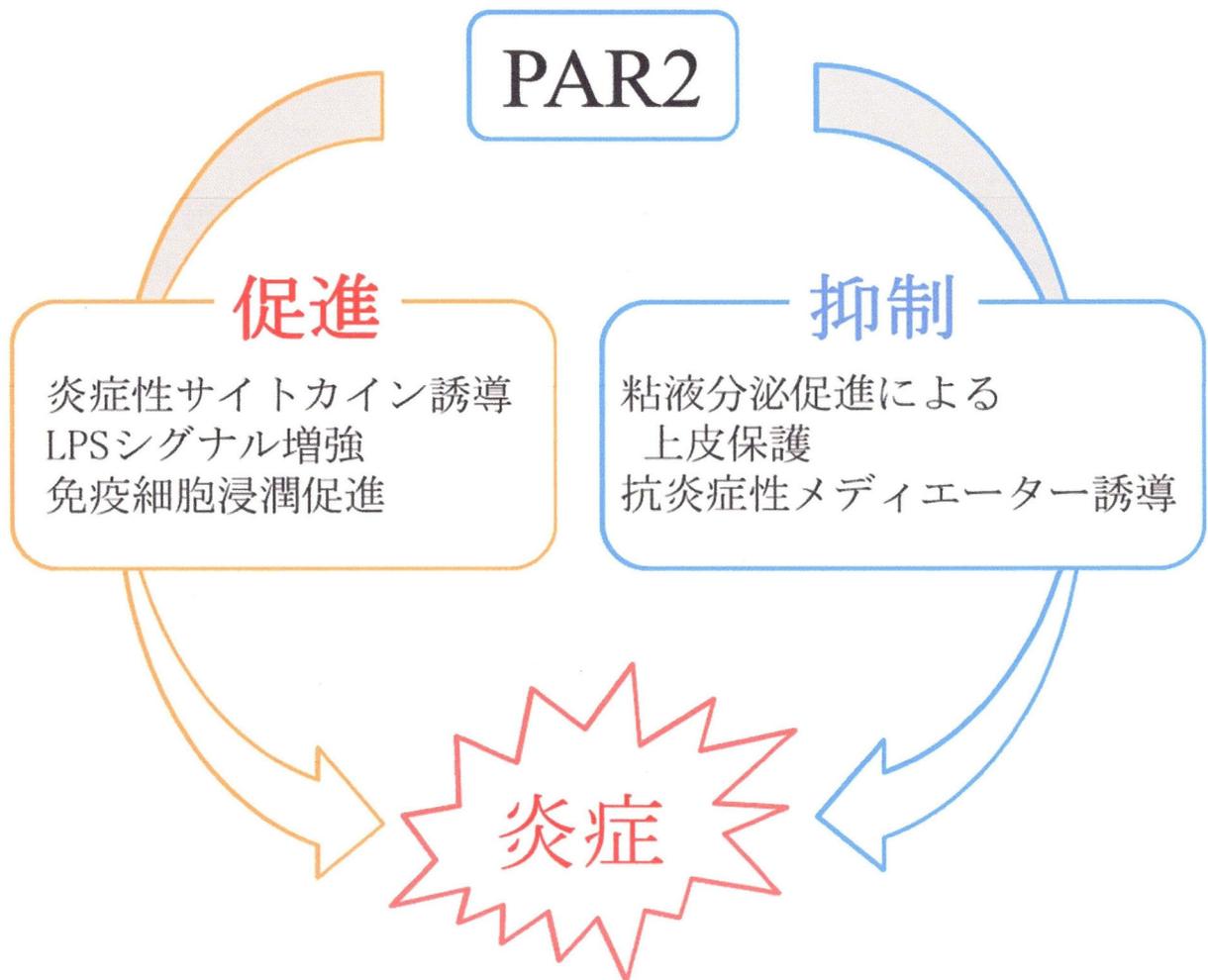


図2 PAR2による炎症制御機構の例

PAR2 活性化は組織や細胞によって、炎症を促進する作用と抑制する作用の両方が報告されている。

第1章 PGE₂によるPAR2の発現調節機構に対する研究

第1節 背景

1-1 Prostaglandin E₂とその生理作用

1-1-1 Prostaglandin E₂

プロスタグランジンの一種であるPGE₂は、様々な刺激により産生され、生体内のほぼ全ての細胞によって産生される¹⁷。その機能は、生体の恒常性の維持だけでなく外傷や刺激にも反応し、生体活動に幅広く関与している¹⁸。またPGE₂は、PARの活性化によって産生される数少ない抗炎症性メディエーターの一つでもある^{11-13,19}。特に呼吸器疾患において、PAR2による炎症抑制作用の多くをPGE₂が担っていると考えられているが¹³、PGE₂がPARの活性や発現に与える影響については、未だ十分に明らかになっていない。

1-1-2 PGE₂の生合成

PGE₂の合成過程には phospholipase A₂ (PLA₂) , cyclooxygenase (COX) , terminal PGE synthase (PGES) の3つの酵素がそれぞれ独立した段階で関与している。

細胞膜リン脂質に結合しているアラキドン酸がPLA₂により切り出されると²⁰、COXにより脱酸素化され、PGG₂を経て prostaglandin 前駆体であるPGH₂になる²¹。COXは構成型のCOX-1と誘導型のCOX-2の2つのアイソザイムを持つ。COX-1は、全身の組織に広く分布している酵素であり構成型と呼ばれる。COX-1は刺激により誘導されることはなく、常時細胞内に一定量存在している。一方、COX-2は脳や腎臓などで恒常的に発現するが、その他の組織では普段は発現が低く、炎症刺激によって発現が誘導される。最後に、合成されたPGH₂から、PGESの作用によりPGE₂が合成される²²。

1-1-3 E-prostanoid receptors

PGE₂の受容体であるE-prostanoid receptor (EP)はGPCRであり、EP1~EP4の4つのサブタイプからなる。各サブタイプは共役するGタンパク質が異なることからそれぞれ異なったシグナルを伝える²³ (表2)。

表2 E-prostanoid receptor シグナル²³

	EP1	EP2	EP3	EP4
signaling effectors	G _{αq}	G _{αs}	G _{αi} , G _{α12}	G _{αs}
signal	IP ₃ /Ca ²⁺ , DAG	cAMP ↑	cAMP ↓, Rho, IP ₃ /Ca ²⁺	cAMP ↑

EP 受容体と共役する G タンパク質およびそのセカンドメッセンジャー。
 IP₃ : inositol 1, 4, 5-trisphosphate, DAG : diacylglycerol, cAMP : cyclic AMP。

EP1 は三量体 G タンパク質の $G\alpha_q$ と共役しており、PLC を活性化する。その結果、細胞膜のリン脂質であるホスホチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (PIP_2) を加水分解することでイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP_3)、ジアシलगリセロール (DAG) を産生する。これらのセカンドメッセンジャーは、Protein Kinase C (PKC) の活性化および小胞体からの Ca^{2+} の放出を促す。EP2 および EP4 は $G\alpha_s$ と共役し、アデニル酸シクラーゼを活性化させ、セカンドメッセンジャーとして cyclic 3, 5-adenosine monophosphate (cAMP) を産生する。EP3 は、主に $G\alpha_i$ に共役し cAMP の減少を引き起こすと知られているが、その他にも $G\alpha_{12}$ に作用し、 IP_3 を介した Ca^{2+} 放出や Rho ファミリーを介したシグナル伝達も活性化することが知られている。

1-1-4 PGE₂ の生理作用

PGE₂ の炎症抑制機構として、樹状細胞、T 細胞、好中球やマクロファージなどの免疫細胞の活性化や、抗原提示を抑制する作用がよく知られている²⁴⁻²⁷。また PGE₂ は、腸内細菌叢に対する免疫寛容にも関与している。腸管上皮細胞から産生される PGE₂ は、腸内の樹状細胞やマクロファージによる腸内細菌叢への免疫応答を抑制することで、免疫寛容へ寄与している²⁸。PGE₂ は、このような幅広い炎症抑制作用を持つことから、炎症性疾患の治療方法の開発や創薬のターゲットとして注目されている²⁹。

一方、PGE₂ は炎症の初期において、血管平滑筋弛緩作用により局所血流を増加させ浮腫を促進し、痛覚刺激に対する感受性を増加させるなど、炎症を促進する働きを示す³⁰⁻³²。また PGE₂ には、免疫細胞の遊走を促進し炎症を進行させる作用もある³³。

以上のように、PGE₂ は、組織や細胞によって炎症抑制作用と炎症促進作用の両方を持ち、生体内において非常に複雑な働きをしていると考えられる。

1-2 PAR と PGE₂ の相互作用

PAR サブタイプのうち、PAR1、PAR2 および PAR4 の活性化は PGE₂ 産生を誘導する¹⁹。産生された PGE₂ はオートクライン的あるいはパラクライン的作用によって、細胞表面の受容体に結合し細胞内へシグナルを伝達する。

血管系において、トロンビンの PAR1 活性化は血管平滑筋の細胞増殖や遊走を起こし、血管障害後の内腔狭窄や心血管病などの病態を悪化させる^{34,35}。それに対し、血管障害時には血管平滑筋で PGE₂ が産生され、PAR1 発現を減少させ

るという報告もあり³⁶, トロンビンによる PAR1 活性化を, PGE₂ がネガティブフィードバック的に制御していると考えられている。さらに肺線維症では, 線維芽細胞の PAR1 タンパク質発現量が増加し, PAR1 活性化が細胞増殖, コラーゲン産生, ケモカイン放出などを促し, 線維化を亢進させる^{23,37,38}。一方で, 隣接した上皮から産生される PGE₂ はパラクライン的作用によって PAR1 発現を減少させ, PAR1 活性化による線維化を抑制することで抗線維化作用を示す³⁹⁻⁴¹。このように産生された PGE₂ は PAR1 に対してネガティブフィードバックとして作用する可能性が示唆されている。

一方で, PAR2 活性化による PGE₂ 産生は, 主に呼吸器系の細胞において報告されている⁴²⁻⁴⁴。肺上皮細胞においては, PAR2 活性化による各種 MAPK 経路の活性化が COX の活性化を介して PGE₂ 産生を促進する⁴²。呼吸器系疾患における PAR2 発現量増加や活性化は増悪因子となることがよく知られているが, PGE₂ が PAR2 に与える影響は未だ明らかになっていない。

1-3 研究の目的

以上のように, PAR1 活性化による PGE₂ 産生は, PAR1 機能をネガティブフィードバック的に制御する可能性が示唆されている。一方, PAR2 による PGE₂ 産生は炎症抑制作用を示すため¹³, PAR2-PGE₂ 産生軸は新たな治療点として注目されているにもかかわらず, PGE₂ が PAR2 シグナル自身に与える影響は検討されていない。そこで本研究では, PGE₂ が PAR2 活性化に与える影響を解明することを目的とした (図 3)。

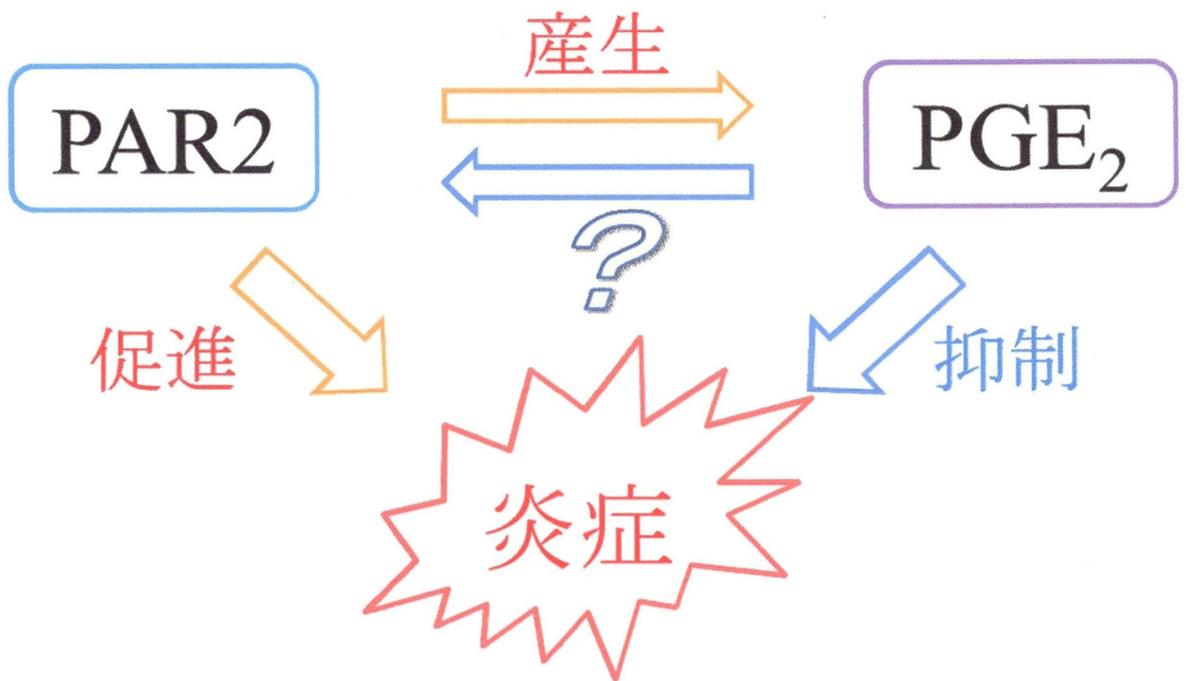


図3 PAR と PGE₂ の炎症へ相互作用

呼吸器系疾患では PAR2 活性化は炎症促進作用を, PGE₂ は炎症抑制作用を持つことが知られている。また, PAR2 活性化は PGE₂ 産生を介した炎症抑制作用も報告されている。PGE₂ は PAR1 発現を減少させるという報告がある一方で, PAR2 機能に与える影響は明らかになっていない。

第2節 実験結果

2-1 PGE₂がPAR2活性化に与える影響

2-1-1 PGE₂がPAR2-APによるERKリン酸化に与える影響

PAR2活性化の指標として、PAR2下流シグナルとして代表的なERKのリン酸化を測定した。HEK293T細胞に対して、PGE₂ (30 μM) を30分間前処置し、その後PAR2-AP (5 μM) を5分間処置した。PGE₂の単独処置では、無処置群と比較してERKリン酸化レベルの変化は認められなかった。一方、PAR2-APを処置するとERKリン酸化レベルは有意に上昇し、このERKリン酸化はPGE₂前処置により有意に抑制された(図4)。

以上より、PGE₂はPAR2活性化を抑制する作用を持つことが明らかとなった。

2-1-2 PGE₂のPAR2活性化抑制作用に対するPGE₂受容体阻害剤の影響

次に、EP1およびEP2阻害剤であるAH-6809とEP4阻害剤であるONO-AE3-208を用いて、PGE₂によるPAR2活性化抑制作用を担うEP受容体について検討した。PGE₂によるPAR1発現制御は、細胞内cAMPレベルの上昇が関与していることから^{41,45}、cAMPレベルを減少させる作用を持つEP3については検討を行わなかった。HEK293T細胞に、AH-6809 (20 μM) またはONO-AE3-208 (3 μM) を20分間、PGE₂ (30 μM) を30分間処置後、PAR2-AP (5 μM) を5分間処置した。PGE₂によるERKリン酸化抑制作用は、AH-6809処置により解除されたが、ONO-AE3-208処置では有意な変化は認められなかった(図5)。

これらの結果より、PGE₂によるPAR2シグナル活性の抑制は、EP1もしくはEP2を介していることが示唆された。

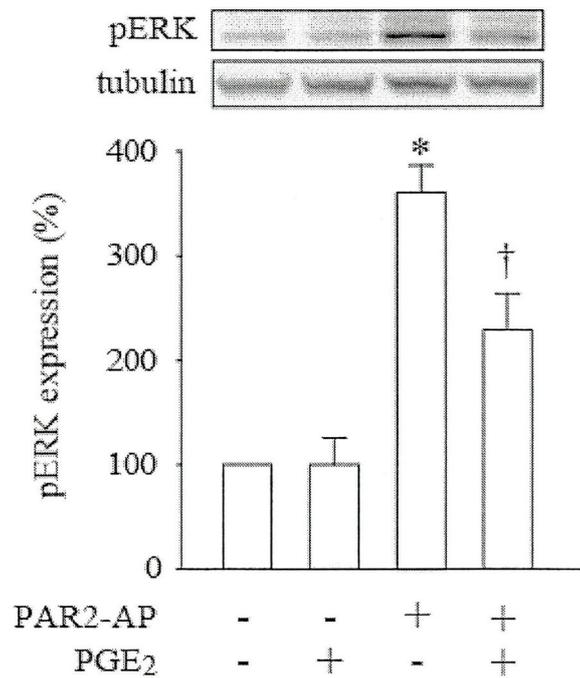


図4 PAR2活性化によるERKリン酸化に対するPGE₂の影響

HEK293T細胞に対して、PGE₂ (30 μM) を30分間前処置し、その後PAR2-AP (5 μM) を5分間処置した時のリン酸化ERK (pERK) および tubulin タンパク質発現量を western blot 法で測定した。無処置の pERK 発現量を 100% として表示した。n=4。* : $P < 0.05$ (無処置群との比較), † : $P < 0.05$ (PAR2-AP 単独処置との比較)。

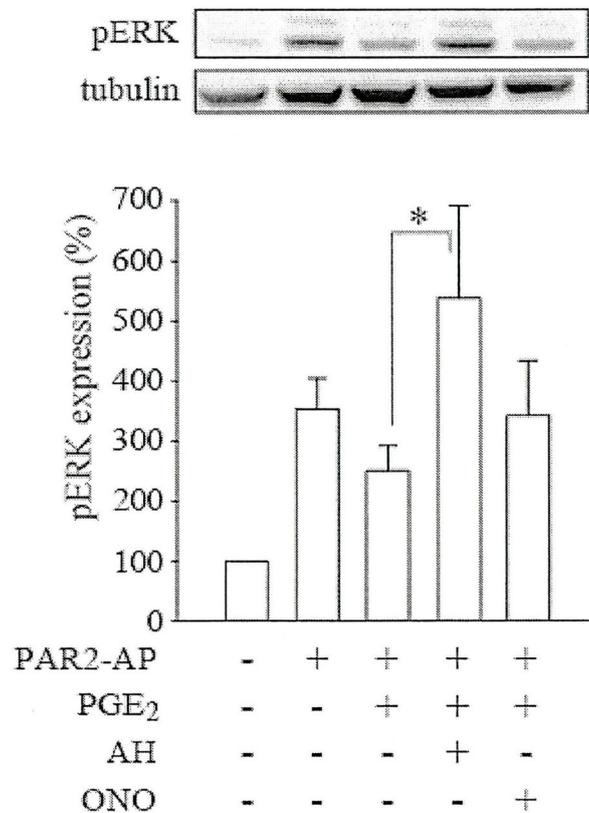


図5 PGE₂によるERKリン酸化抑制作用に与えるEP受容体阻害剤の影響

HEK293T細胞に対して、AH-6809 (AH; 20 μM) またはONO-AE3-208 (ONO; 3 μM) を20分間、PGE₂ (30 μM) を30分間処置後、PAR2-AP (5 μM) を5分間処置した時のリン酸化ERK (pERK) およびtubulinタンパク質発現量をwestern blot法で測定した。無処置のpERK発現量を100%として表示した。n=4。

* : $P < 0.05$ (PAR2-AP単独処置との比較) , † : $P < 0.05$ (PAR2-APおよびPGE₂処置との比較)。

2-2 PGE₂ が PAR2 の局在に与える影響

2-2-1 膜表面 PAR2 発現に対する PGE₂ の影響

PGE₂ の 30 分処置という短い時間で、PAR2 活性化による ERK のリン酸化が抑制されたことから、PGE₂ は PAR2 タンパク質や mRNA の発現量を減少させているのではなく、細胞膜表面タンパク質の発現量を減少させている可能性が示唆された。そこでフローサイトメトリー法を用いて、細胞膜表面の PAR2 発現量に対する PGE₂ の影響を検討した。Santa Cruz 社の PAR2 抗体である H-99 および SAM11 は PAR2 特異性が低く、内在性の PAR2 発現量を比較することができなかった。そこで本研究では、N 末端を Flag, C 末端を mCherry で標識した PAR2 を定常的に過剰発現する HEK293T 細胞 (Flag-PAR2-mC 細胞) を用いて実験を行った。抗 Flag 抗体を用いて静止状態の PAR2 を確認したところ、Flag-PAR2-mC 細胞表面に PAR2 が発現していることが確認された (図 6A)。PGE₂ (30 μM) の 30 分間処置により、細胞表面の PAR2 発現量は有意に減少した (図 6B, C)。

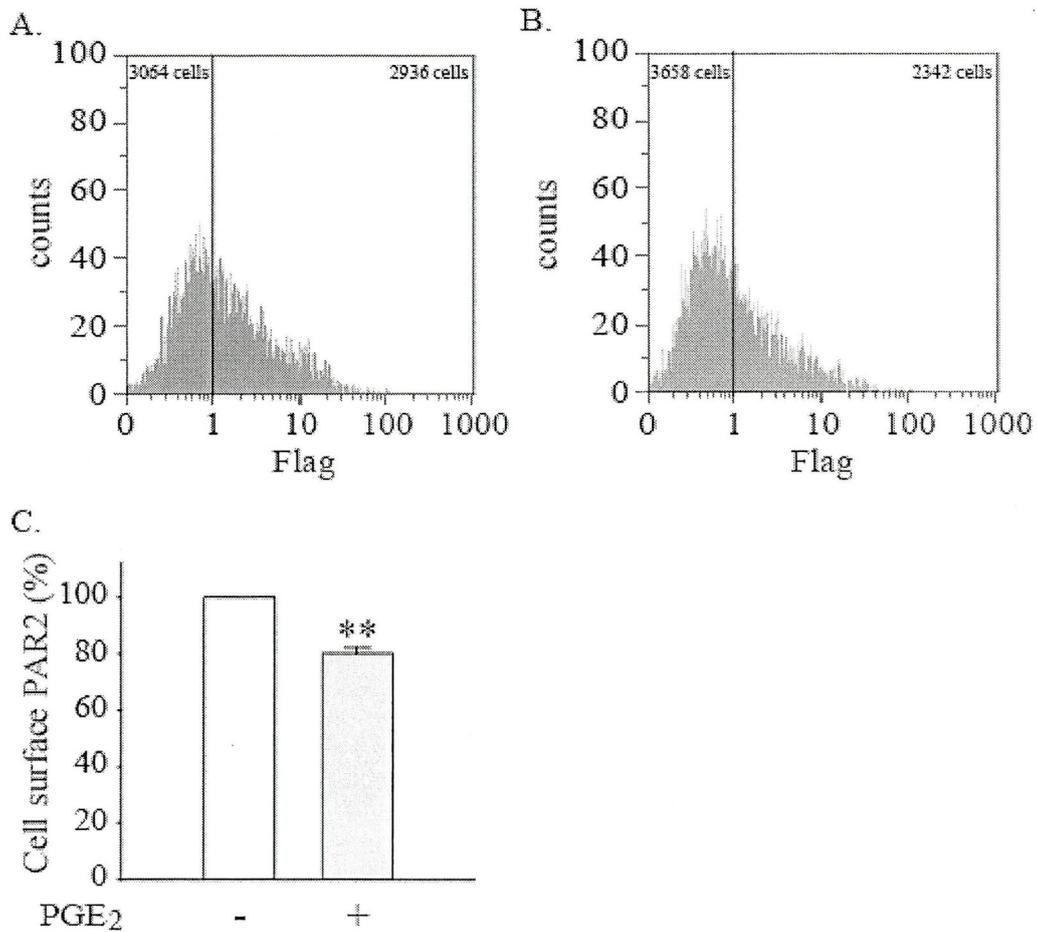


図6 細胞表面 PAR2 発現量に与える PGE₂ の影響

Flag-PAR2-mC 細胞対して、PGE₂ (30 μM をで 30 分間処置し、フローサイトメトリー法を用いて細胞表面 PAR2 発現量を検討した。細胞表面 PAR2 は Alexa Fluor 488 で標識した抗 Flag 抗体を用いて検出した A, B はそれぞれ無処置群と PGE₂ 処置群の代表例である。mCherry 陽性細胞を 6,000 個測定したときの無処置群 Flag 陽性細胞の数を 100%とした (C)。** : $P < 0.01$ (無処置群と比較)。n=3。

2-2-2 PAR2 局在対する PGE₂ の影響

次に、共焦点顕微鏡を用い PAR2 局在を視覚化することで、PGE₂ が PAR2 局在に与える影響を検討した。本実験では、細胞形態が円形で共焦点顕微鏡での受容体分布の観察に適しており、トランスフェクションによる PAR2 過剰発現が行いやすいマウス神経膠細胞種由来 N2a 細胞に、Flag 標識 PAR2 (Flag-PAR2 細胞) または Flag 標識 PAR4 (Flag-PAR4 細胞) を発現させて実験へ供した。Flag-PAR2 細胞または Flag-PAR4 細胞を PGE₂ (30 μM) で 1, 7, 24 時間処置し、受容体が細胞膜に局在している細胞、細胞膜および細胞内の両方に分布している細胞、細胞内のみに局在している細胞の 3 種類に分類した (実験方法 4-7-2 参照)。

図 7 に示す通り、静止状態 (control) では、およそ 70~80% の細胞が PAR2 または PAR4 を細胞表面に発現していた。PGE₂ の 1 時間処置により、細胞内のみに PAR2 を発現する細胞が増加し、細胞表面にのみ PAR2 を発現する細胞は 50% 未満となり、PAR2 を細胞膜および細胞内の両方に発現する細胞数は増加した。この変化は、PGE₂ 処置 7 時間および 24 時間後においても認められた。一方、細胞表面における PAR4 の発現量は、PGE₂ 処置により変化しなかった。

以上の結果から、PGE₂ は PAR2 内在化を促進することで、PAR2 シグナル活性を抑制する可能性が示唆された。

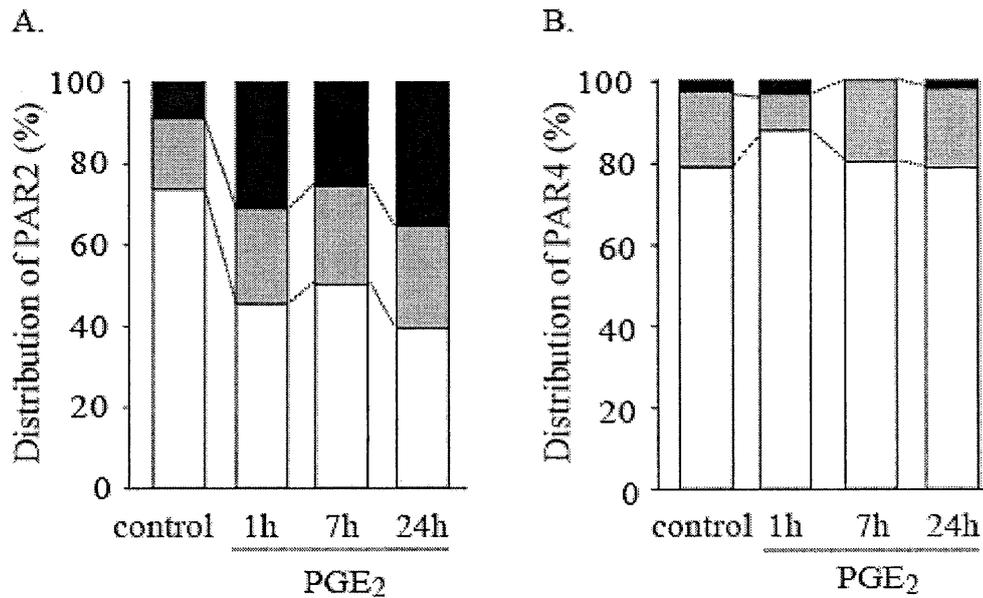


図7 PAR2 及び PAR4 の細胞内分布に与える PGE₂ の影響

Flag-PAR2 細胞 (A) または Flag-PAR4 細胞 (B) に対して, PGE₂ (30 μM) を 1, 7, 24 時間処置し, 共焦点顕微鏡で観察した。受容体が, 細胞膜に局在している細胞 (白), 細胞膜および細胞内の両方に分布している細胞 (灰), 細胞内のみ局在している細胞 (黒) の 3 通りに分類した (実験方法 4-7-2 参照)。観察した全細胞を 100% とし, 割合で表記した。n=3-6。

2-3 細胞内 cAMP が PAR2-AP による ERK リン酸化に与える影響

図5の結果より、PGE₂によるPAR2活性化抑制作用は、EP1またはEP2を介していることが明らかとなった。これまで、PGE₂によるPAR1発現量制御はEP2による細胞内cAMPの増加を介していることが報告されている⁴¹。一方、EP1はcAMPシグナルと共役していないことが知られている²³。以上より、PGE₂によるPAR2活性化抑制作用には、EP2による細胞内cAMP増加が関与している可能性が示唆された。そこで、細胞内のcAMPがPAR2活性化に与える影響を検討するため、アデニル酸シクラーゼを活性化させ細胞内cAMPレベルを上昇させる forskolin を用いて実験を行った。

N2a細胞に対するPGE₂ (3 μM) または forskolin (0.3 μM) の1時間処置により、細胞内cAMPレベルの上昇が観察された(図8)。そこで、Flag-PAR2細胞またはFlag-PAR4細胞を forskolin (0.3 μM) で1, 7, 24時間処置し、共焦点顕微鏡で観察したところ、PGE₂処置時と同様に細胞表面にPAR2を発現する細胞は減少したが、PAR4に変化は認められなかった(図9)。

さらにHEK293T細胞において、PAR2-APによるERKリン酸化に forskolin が与える影響を検討した。HEK293T細胞に forskolin (0.3 μM) を30分間前処置し、その後PAR2-AP (5 μM) を5分間処置した。その結果、forskolin前処置によりPAR2-APによるERKリン酸化が抑制された(図10)。

以上より、PGE₂によるPAR2シグナル活性の抑制はEP2による細胞内cAMP増加を介していることが示唆された。

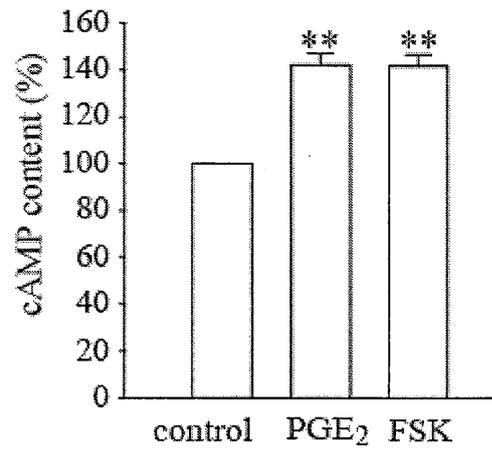


図 8 細胞内 cAMP 濃度に対する PGE₂ および forskolin の影響

N2a 細胞対して、PGE₂ (3 μM) または forskolin (FSK, 0.3 μM) を 1 時間処置し、細胞内 cAMP 濃度を測定した。** $P < 0.01$ vs. (control との比較)。n = 3-6。

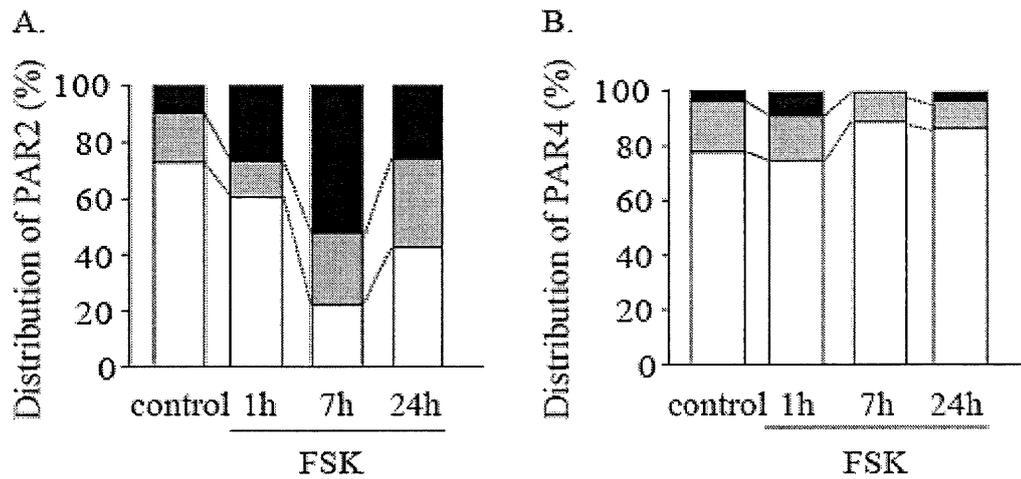


図9 PAR2 及び PAR4 の細胞内分布に与える forskolin の影響

Flag-PAR2 細胞 (B) または Flag-PAR4 細胞 (C) に対して, forskolin (0.3 μ M) を 1, 7, 24 時間処置し, 共焦点顕微鏡で観察し, 細胞膜に局在している細胞 (白), 細胞膜および細胞内の両方に分布している細胞 (灰), 細胞内のみ局在している細胞 (黒) の 3 通りに分類した (実験方法 4-7-2 参照)。観察した全細胞を 100% として割合で表記した。 n = 3-6。

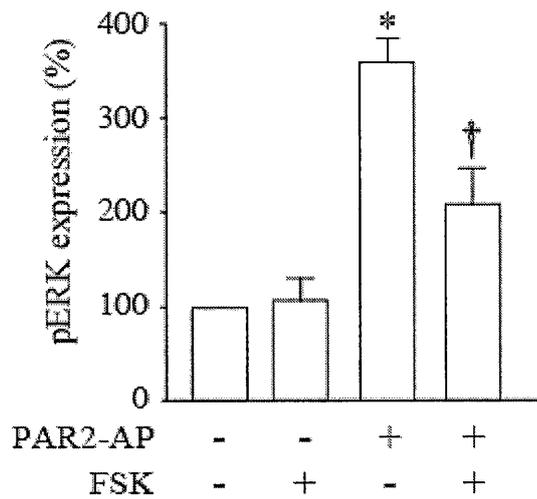


図 10 PAR2 活性化による ERK リン酸化に与える forskolin の影響

HEK293T 細胞に forskolin (FSK, 0.3 μ M) を 30 分間前処置し, その後 PAR2-AP (5 μ M) を 5 分間処置した時のリン酸化 ERK (pERK) および tubulin タンパク質発現量を western blot 法で測定した。無処置の pERK 発現量を 100% として表示した。* $P < 0.05$ (無処置との比較)。† $P < 0.05$ (PAR2-AP 単独処置との比較)。n = 4。

第3節 考察

本研究は、PAR2 活性化によって産生される代表的な抗炎症性メディエーターである PGE₂ が、PAR2 自身に与える影響を解明することを目的として行った。その結果、PGE₂ は PAR2-AP による ERK リン酸化を抑制することが明らかとなった (図 4)。ERK のリン酸化は、PAR2 活性化下流の代表的なシグナルであることから、PGE₂ は PAR2 の活性化を抑制する作用があると言える。そして PGE₂ は、PAR2 を内在化させることでその機能を抑制していることが示唆された (図 6, 7)。PGE₂ による PAR2 局在の調節機構についてはこれまで研究がおこなわれておらず、本研究が初めての報告となる。

3-1 PGE₂ による PAR2 活性化の抑制作用

図 4 より、PGE₂ は PAR2 活性化による ERK リン酸化を抑制することが明らかになった。これまで、PGE₂ は PAR1 活性化によって産生され、PAR1 機能をネガティブフィードバック的に制御する可能性が報告されている。また、PAR2 も ERK リン酸化や NF-κB を介する経路により PGE₂ 産生を促進することが知られている^{42,43}。本実験で得られた結果から、PGE₂ はネガティブフィードバック的に PAR2 活性化を調節し、PAR2 活性化レベルおよび PGE₂ 発現レベルを調節している可能性が考えられる。

3-2 PGE₂ による PAR2 内在化

Sokolova らは、PGE₂ は PAR1 mRNA の転写を阻害することで PAR1 発現量をダウンレギュレートすることを報告した⁴¹。しかし、この報告での PGE₂ 処置時間は 7 時間であり、本研究では PGE₂ の 30 分処置という短い時間で PAR2 機能が阻害された。また、タンパク分解阻害剤であるシクロヘキサミドを 1 時間処置した条件下においても、細胞膜表面に存在する PAR2 は 90%以上維持されることが報告されていることから⁴⁶、転写や翻訳阻害が起こったとしても 30 分で膜表面 PAR2 発現量が減少することは考えにくい。以上より、本研究で得られた PGE₂ の作用は、PAR 発現機構の調節でなく、PAR2 タンパク質の局在の変化など、異なる経路を介する可能性が示唆された。

本研究において、PGE₂が膜表面 PAR2 タンパク質を減少させている可能性を検討したところ、フローサイトメトリー法および免疫染色法を用いた実験により、PGE₂は PAR2 の内在化を促進することが明らかとなった（図 6, 7）。これらの結果から、PGE₂による PAR2 抑制作用の少なくとも一部は、この PAR2 内在化促進作用によることが示唆された。なお、フローサイトメトリー法および免疫染色法において、静止状態で細胞表面の PAR2 発現量が異なる結果となった。これは、用いた細胞や PAR2 過剰発現の手技が異なること、また、導入した PAR2 に付加したタグの違いが原因として考えられる。

通常、PAR2 は受容体活性化の結果として内在化される。細胞表面に存在する PAR2 は N 末端がプロテアーゼによる切断、もしくは PAR2-AP の結合により活性化される。活性化された PAR2 は共役する G タンパク質のシグナルを伝えるとともに、GPCR-kinase により速やかに C 末端がリン酸化される。リン酸化された C 末端をアダプタータンパク質である β -arrestin が認識し、結合することで内在化のシグナルが開始する。また β -arrestin は、PAR2 の細胞内ドメインをマスクすることで、新たな G タンパク質が結合することを防ぐ役割も担う。そして、PAR2 に結合した β -arrestin は、clathrin をリクルートすることでエンドソームの形成を促し内在化へと至る⁴⁷。本研究においても、PAR2 アゴニストである trypsin 処置により細胞表面 PAR2 発現量が減少することがフローサイトメトリー法により確認した（data not shown）。また、trypsin、PAR2-AP および PAR4-AP により膜表面に PAR を発現する細胞の減少を免疫染色法により確認した（data not shown）。これらの実験系では、各 PAR の Flag タグおよび mCherry タグまたは HA タグを付加した細胞を用いているが、一般に PAR の活性化は内在化を伴うことから、これらの細胞においても正常機能は維持されていると考えられる。

PGE₂は、マトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）の産生を誘導すること知られている⁴⁸。そして、MMP は PAR1 を活性化することが報告されている⁴⁹。そのため、PGE₂による PAR2 内在化機構として、PGE₂が PAR2 を活性化するプロテアーゼを産生し、そのプロテアーゼがオートクライン・パラクライン的に作用して、PAR2 を活性化し内在化を促した可能性が考えられる。しかし本研究では、PGE₂単独処置が ERK 活性化に影響を与えなかったことから（図 4）、PGE₂により産生された PAR2 アゴニストが PAR2 内在化には関与しないことが示唆された。

活性化により内在化し初期エンドソームに存在する PAR2 は、リソソームと融合するまでに様々な細胞内シグナルを活性化することが報告されている。内在化した PAR2 は、アダプタータンパク質である β -arrestin を足場として Raf をリクルートし、ERK シグナルを活性化させる⁴⁷。また、アクチン結合タンパク質である cofilin やその活性化因子である chronophin も、PAR2- β -arrestin 複合体と結合し細胞遊走を促進する^{50,51}。しかし、PGE₂ 単独処置が ERK 活性化に影響を与えなかったことから (図 4), PGE₂ により内在化した PAR2 は、 β -arrestin による ERK 活性化シグナルを伝えていないことが明らかとなった。

以上より、PGE₂ による PAR2 内在化は、少なくとも PAR2 による ERK シグナルに寄与していないことが示された。これまで、 β -arrestin により内在化する β_2 アドレナリン受容体においても β -arrestin 非依存的な内在化が存在することが報告されており⁵², PGE₂ が β -arrestin 非依存的に PAR2 の内在化を促している可能性が考えられる。また、 β -arrestin と受容体の複合体形成には、受容体活性化による 3 次元構造の変化が必要となる⁵³。本研究で明らかとなった PGE₂ による PAR2 内在化は、通常の活性化による内在化とは違う経路によるため、PAR2- β -arrestin 複合体が形成されない可能性が考えられる。さらに、 β -arrestin 非依存的に内在化された PAR2 が未知のシグナルを伝えている可能性も考えられる。今後の研究では、PAR2 を内在化させる因子とともに、PGE₂ によって内在化された PAR2 が伝えるシグナルの有無を明らかにしていく必要がある。

一般に、 β -arrestin により内在化した受容体は、リソソームに運ばれ分解を受けるとともに、アゴニストとの結合が解除され細胞膜に戻りリサイクルされる⁵⁴。一方、PAR はプロテアーゼによって非可逆的な分解を受けるため、内在化した PAR2 はリソソームに運ばれ分解を受け、リサイクルされないと考えられている⁴⁷。PGE₂ による PAR2 内在化においては、PAR2 は切断を受けていないため、細胞膜にリサイクルされる可能性が考えられる。しかし本研究において、PGE₂ による PAR2 内在化が少なくとも 24 時間持続したことから (図 6), この可能性は低いと思われる。今後、PGE₂ によって PAR2 タンパク質発現量が制御されているかを明らかにする必要がある。

3-3 PGE₂ が PAR4 に与える影響

本研究において、PGE₂ は PAR2 内在化を促進したが、PAR4 の局在には影響を与えなかった (図 7)。このことから、PGE₂ の作用は特異性があると考えられる。前述のとおり、PAR2 内在化を担うアダプタータンパク質は β -arrestin である。一方、PAR4 の内在化を担うアダプタータンパク質は明らかにされておらず⁴⁷、アダプタータンパク質の違いが、PGE₂ による内在化に対する感受性の違いとなっている可能性が考えられる。

PAR4 活性化は、PAR1 や PAR2 と同様に PGE₂ の産生を誘導する¹⁹。PAR4 は、PAR サブタイプの中でも研究が進んでいないものの1つであり、PAR4 に対する PGE₂ の影響についても、これまで全く検討されていない。本研究結果から、PGE₂ は PAR4 局在に影響を与えなかったが、発現レベルで影響を与える可能性は否定できない。これまで報告されている PAR1 や、今回発見した PAR2 へのネガティブフィードバック機構と同様に、PGE₂ は PAR4 発現も制御している可能性があり、今後の研究が待たれるところである。

3-4 EP2 および cAMP シグナルが PAR2 に与える影響

EP 阻害剤および forskolin を用いた実験から、PGE₂ による PAR2 機能抑制作用は、EP2 および cAMP シグナルを介していることが示唆された (図 5, 8-10)。EP2 の活性化は、肺線維症や喘息の発症を抑制することが報告されており⁵⁵⁻⁵⁸、そのシグナルは呼吸器疾患における新たな治療薬として期待されている。

cAMP のシグナル下流には、Protein kinase A (PKA) を介した経路と exchange protein directly activated by cAMP (Epac) を介した経路がある。PKA 経路では、cAMP が PKA 調整サブユニット PKA regulatory subunit (PKA-R) の cAMP-binding sites A, B に結合することで、触媒サブユニット PKA catalytic subunit (PKA-c) が放出され、標的タンパク質をリン酸化する。一方、Epac は、PKA と同様に cAMP 結合ドメインを持ち、guanine nucleotide exchange factor (GEF) として作用することで、G タンパク質から GDP を解離させシグナルを伝える⁵⁹。

β_2 アドレナリン受容体は、EP 受容体と同様に細胞内 cAMP を上昇させ、PKA を活性化する。 β_2 アドレナリン受容体の内在化は、PAR2 と同様に β -arrestin を介して行われるが、Liu らは PKA が β -arrestin 被依存的に β_2 アドレナリン受容体の内在化を起こすことを報告した⁵²。また、カプサイシン受容体である TRPV1 も PKA 活性化を介して内在化され、リソソームで分解される⁶⁰。さらに、PKA

は、GPCR 以外の膜タンパク質であるアクアポリンの内在化も誘導するなど⁶¹、近年 PKA による膜タンパク質の内在化作用が報告されている。これらの作用には、PKA による受容体のリン酸化が必要であると報告されている⁵²。

本研究で得られた PGE₂ の PAR2 内在化作用にも、PKA による PAR2 のリン酸化が関与している可能性が考えられる。一般に、cAMP による受容体の内在化作用は主に PKA 系を介すると考えられており、Epac の直接的な関与を否定する報告もあることから⁶²、今後は PGE₂ による PAR2 の内在化作用における PKA の関与を検討する必要がある。現在、PKA 阻害剤として cAMP-binding sites を直接阻害する Rp-cAMPS, PKA-c と ATP の結合を阻害する H-89 や KT5720 などが使用されており、これら阻害剤を用いた実験や、PKA の Loss of function および Gain of function による実験を行うことで明らかにすることができると思われる。

3-5 炎症性疾患に PGE₂ による PAR2 制御機構が与える影響

3-5-1 炎症性疾患における PAR2 の作用

多くの組織において、PAR2 活性化は炎症促進作用を持つことが知られている。PAR2 の活性化は、IL-6, IL-8 や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を誘導し⁶³⁻⁶⁵、免疫細胞浸潤を促進することで炎症を促進することが報告されている^{66,67}。また、免疫細胞浸潤促進、浮腫形成、痛覚過敏など、さまざまな作用を介して神経性炎症、膵炎、腸炎、皮膚炎などで炎症の増悪因子として働くことが知られている⁶⁸。これらの報告は、本研究で得られた PGE₂ による PAR2 抑制作用が、炎症を抑制する方向に働く可能性を示唆している。一方、急性膵炎においては、PAR2 活性化が電解質やアミラーゼの分泌を促進し、管腔内のクリアランスを保つことで炎症を抑制する作用を示すことが報告されている^{69,70}。このような疾患では、PGE₂ による PAR2 抑制作用が炎症促進作用を示す可能性が考えられ、PAR2 および PGE₂ の相互関係は組織や疾患ごとに十分検討する必要がある。

3-5-2 呼吸器疾患における PAR2 と PGE₂ の相互作用

前述のとおり、肺線維症において、PGE₂ による PAR1 のネガティブフィードバック機構の存在が示唆されている^{23,37-41}。また、PAR2 活性化による PGE₂ の

産生は主に肺上皮細胞で報告されており⁴²⁻⁴⁴，PAR2-PGE₂産生軸は呼吸器疾患においても注目されている¹³。

肺線維症や気管支ぜんそくではPAR2発現量が増加しており^{71,72}，PAR2活性化が炎症を促進することが報告されている⁷³。また，モルモットでは，慢性気管支炎におけるTRPV1を介した咳の発生をPAR2活性化が増悪化させる⁷⁴。さらに，PAR2 KOマウスを用いた実験より，PAR2活性化がアレルギー性気管支炎における好酸球浸潤および気道の過敏反応性を促進することが明らかとなっている⁶⁶。以上のように呼吸器疾患においてPAR2の活性化は増悪因子になることが知られている。一方，PAR2活性化による炎症抑制作用も報告されており，マウスのアレルギー性気道炎モデルでは，鼻腔内にPAR2アゴニストを投与することで気道の好酸球増多症や過敏反応性を抑制するという報告がある⁷⁵。

このような炎症に対するPAR2活性化作用の違いは，異なる組織や細胞におけるPAR2下流シグナルの差に依存する可能性が考えられる。呼吸器疾患においてPAR2活性化による炎症抑制作用は，主にPGE₂産生を介していることが報告されているが^{13,75}，PAR2活性化によるPGE₂の産生は，平滑筋細胞や上皮細胞でしか報告されていない^{64-66,15}。以上より，細胞種におけるPAR2活性化によるPGE₂産生作用の有無が，炎症作用と抗炎症作用の違いになっている可能性が考えられる。

前述のとおり，呼吸器疾患においてPGE₂は炎症抑制作用を示し，新たな治療点として注目されている^{13,75}。PGE₂の抗炎症作用は様々な経路が報告されており，肺線維症では，PGE₂が線維芽細胞の増殖・遊走を抑制し，コラーゲンの産生を抑制することで線維化を抑制する^{76,77}。また，平滑筋細胞の増殖を阻害することで気道閉塞を抑制する⁷⁸。さらに，免疫細胞の遊走を抑制することで炎症の抑制作用を示す²⁴⁻²⁷。

このように，PGE₂は呼吸器疾患に対して治療的に働き，その過程にはPAR2によるPGE₂産生が重要であると考えられている¹³しかし，PGE₂がPAR2自身に与える影響はこれまで検討されておらず，本研究で明らかとなったPGE₂によるPAR2活性化抑制作用は，PAR2-PGE₂軸のメカニズムを解明しPGE₂シグナルを臨床応用へつなげるための一助となるだろう。

第4節 結論

以上、本研究結果から、PGE₂はPAR2の活性化を抑制することが明らかとなった。また、その作用機序の少なくとも一部には、EP2を介した細胞内cAMP上昇によるPAR2の内在化が関与することが示唆された(図11)。PGE₂は、PAR2活性化により産生されることが報告されていることから、PGE₂によるPAR2機能のネガティブフィードバック的制御機構の存在が示唆された。PAR2およびPGE₂は、種々の疾患において炎症促進を示すとともに抑制作用も示し、複雑な作用を持つ。今回示唆されたフィードバック機構により、PAR2およびPGE₂の機能バランスが制御され、その結果、炎症のステージが調節されている可能性が考えられる。本研究で示唆されたPAR2とPGE₂の相互作用を明らかにしていくことで、PAR2やPGE₂が関与する複雑な炎症反応のメカニズムを理解することができると思われる。

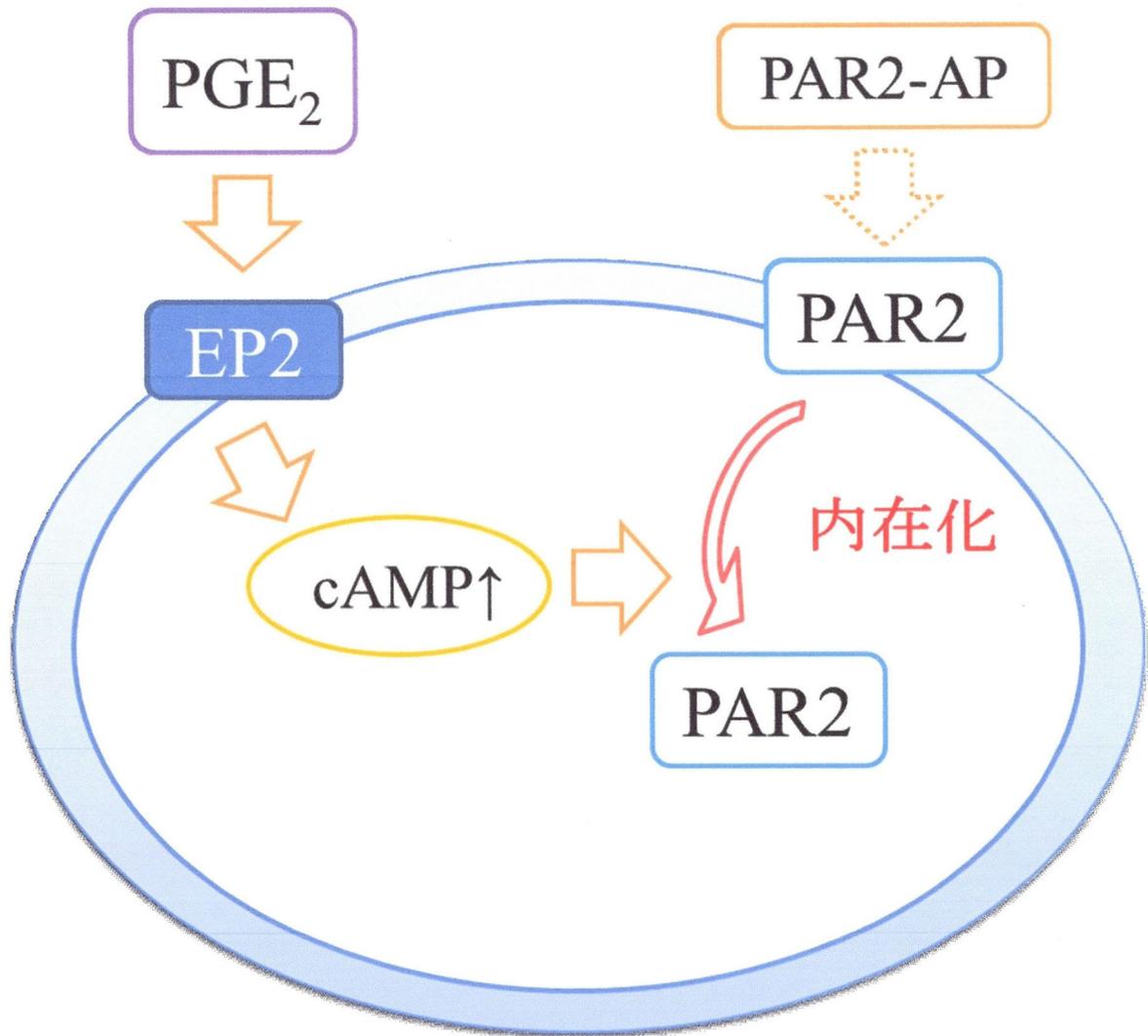


図 11 PGE₂による PAR2 の制御機構

PGE₂はEP2を介して細胞内cAMPを上昇させる。その結果、細胞表面PAR2が内在化し、PAR2アゴニストが作用できなくなることからPAR2活性化が阻害される。

第2章 マクロファージにおける LPS シグナルに対する trypsin の影響

第1節 背景

1-1 急性膵炎とマクロファージ

1-1-1 急性膵炎

Trypsin は、健常な膵臓内では非活性状態に保たれており、分泌された後に消化管内でのみ活性をもつ。しかし、膵管閉塞などの原因により trypsin が膵臓から漏れ出し異所性に活性化すると、trypsin の蛋白分解作用による自己消化によって急性膵炎が発症する。急性膵炎の多くは、軽微な症状に留まるが、およそ20%の症例で多臓器不全を伴う重篤な症状を示す⁷⁹。自己消化に引き続き生じる過剰な免疫応答や、膵臓や腹腔の細菌感染の有無は症状の重篤度や死亡率に大きく影響することが知られているが⁷⁹、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。治療技術が発達した現在においても、重症例の死亡率は20%程度と高く⁸⁰、発症機構の解明が早急に望まれている。

1-1-2 急性膵炎におけるマクロファージの意義

急性膵炎では、trypsin による自己消化によって障害を受けた膵臓や腹腔臓器の細胞がケモカインを放出し、マクロファージやリンパ球などの免疫細胞を炎症局所に遊走させ活性化させる。また、炎症に引き続く細菌感染も免疫細胞を活性化させる。活性化された免疫細胞では、過剰な炎症性メディエーター産生が誘導され、全身に炎症を波及させることで多臓器不全の原因となる。そのため、炎症性メディエーターの産生量は、急性膵炎の重篤度や予後を決定づける重要な因子になると考えられている^{81,82}。

免疫細胞の中でも腹腔マクロファージや血中から炎症部に遊走したマクロファージは、自然免疫の初期反応において中心的な役割を担う細胞である。マクロファージは急性膵炎においても炎症性メディエーターである一酸化窒素 (NO) の主要な供給源となることが知られている¹⁴。また、IL-1 β 、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインの主要な供給源でもあり、産生されたサイトカインはパラクライン・オートクライン的に作用することで、その他の免疫細胞から

のサイトカイン産生を促進する¹⁵。急性膵炎に続発する細菌感染においても、グラム陰性菌内毒素 lipopolysaccharide (LPS) などによってマクロファージは活性化され、IL-1 β , TNF- α や NO などの炎症性メディエーターを産生する¹⁵。

以上の理由より、マクロファージは急性膵炎における炎症性メディエーターの主要な産生源として非常に注目されている。最近の研究では、急性膵炎の実験モデルにおいて、障害を受けた膵臓に活性化したマクロファージが集積していること、またマクロファージの膵臓への遊走を阻害することで急性膵炎の症状を有意に抑えることが報告された⁸³。また、急性膵炎モデルマウスにおいて、マクロファージ遊走を制御する因子である macrophage migration inhibitory factor (MIF) 発現レベルが血中および腹水中で上昇しており、さらに MIF 中和抗体処置により急性膵炎の症状が改善することが示された⁸²。以上の報告から、急性膵炎においてマクロファージが重要な働きをしていることは明らかである。しかし、遊走したマクロファージがどのようにして急性膵炎の進行に関わっているのかは十分に明らかになっておらず、さらなる研究が望まれている。

1-2 Trypsin と PAR2 が急性膵炎に与える影響

前述の通り、急性膵炎の病態は trypsin による自己消化がきっかけとなる。Trypsin はタンパク質分解作用によって組織にダメージを与えるだけでなく、PAR2 を活性化することで細胞内にシグナルを伝える。膵臓では、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、膵管上皮細胞および腺細胞に PAR2 が発現しており⁸⁴、急性膵炎の進行に伴い強く活性化される⁸⁵。

胆汁酸を逆行させることで誘発した急性膵炎モデルでは、PAR2 KO により炎症が抑制されることが報告されていることから、PAR2 活性化が炎症の増悪因子となっていると考えられる¹⁶。また、炎症時に遊走するリンパ球、顆粒球、マクロファージなどの免疫系細胞においても PAR2 が発現しており⁸⁶⁻⁸⁸、活性化により炎症性サイトカイン産生を促進する^{65,89,90}。このことから、trypsin に暴露された免疫細胞の PAR2 活性化が急性膵炎で認められる過剰な炎症性メディエーター産生に影響を与えている可能性が考えられる。

1-3 LPS シグナルと PAR2 の相互作用

1-3-1 LPS シグナル伝達経路

急性膵炎に引き続いて起こる細菌感染によって生じる LPS は、免疫細胞のみならず様々な細胞で免疫応答を引き起こす。LPS シグナルを直接細胞内に伝える受容体は toll-like receptor 4 (TLR4) であるが、その他 LPS binding protein (LBP), cluster differentiation antigen 14 (CD14) および myeloid differentiation protein 2 (MD-2) が LPS 共受容体として関与している (図 12)。

LBP は肝細胞や上皮細胞, 筋細胞などによって産生され, 血漿中に存在する糖タンパク質である⁹¹。LBP は LPS と CD14 の親和性を増加させる役割を担う⁹²。

CD14 は LPS と結合し, LPS を TLR4 まで輸送する⁹³。この CD14 と TLR4 の結合に LBP は必須ではなく, LBP がなくとも CD14 は TLR4 と結合する⁹⁴。CD14 KO マウスでは LPS の反応性が大きく減弱することから⁹⁵, TLR4 を介するシグナル伝達において重要な役割をしていると考えられている。CD14 は, glycosylphosphatidylinositol (GPI) 結合型タンパク質である膜結合型の membrane-bound CD14 (mCD14) と, 可溶型の soluble CD14 (sCD14) の 2 つのタイプが存在する⁹⁶。mCD14 は, マクロファージ, 単球, 好中球などの免疫細胞の膜上に存在し, LPS による免疫応答を仲介する⁹⁷。sCD14 は, mCD14 がプロテアーゼにより切断され sCD14 として遊離することで産生される経路と⁹⁸, 単球から分泌型としてエキソサイトーシスにより放出されることで産生される経路が存在する⁹⁹。sCD14 は, mCD14 を持たない 筋細胞や上皮細胞などの LPS 反応性を増加させることで炎症を全身に波及させると考えられている^{100,101}。

MD-2 は TLR4 の細胞外ドメインに結合する¹⁰²。CD14 と同様に可溶型の soluble MD-2 (sMD-2) と膜結合型の membrane-bound MD-2 (mMD-2) が存在する。mMD-2 は細胞膜上に TLR4 と結合して存在し, sMD-2 は血漿中に存在するがその分泌システムはよくわかっていない。どちらのタイプの MD-2 も LPS と直接結合し^{102,103}, TLR4/MD-2 複合体は細胞内にシグナルを伝えるために必須となる¹⁰⁴。

TLR4 は 1 型膜貫通型タンパク質であり, 種々の病原体を感知して自然免疫を作動させる TLR ファミリーに属する。細胞内ドメインである Toll-IL-1R (TIR)

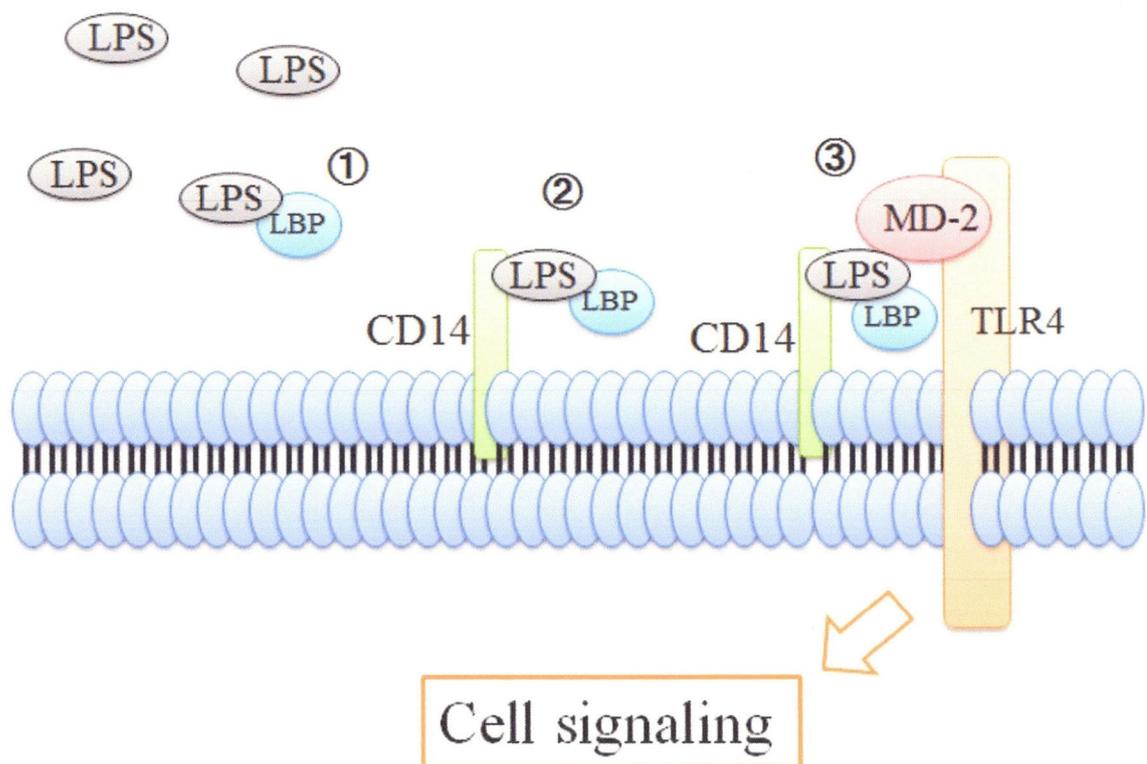


図 12 LPS シグナルの活性化

① 血漿中に存在する LBP に結合することで、LPS の CD14 に対する親和性が増加する。② CD14 との結合により TLR4 との親和性が増加する。③ LPS は、TLR4 と結合することで細胞内シグナルを伝える。この時、TLR4 への MD-2 の結合が必須となる。

ドメインに myeloid differentiation factor 88 (MyD88) や TIR- containing adapter molecule (TRIF) などのアダプタータンパク質が結合している。MyD88 を介した経路は NFκB の活性化により炎症反応を促し, TRIF を介した経路は IFN response factor 3 (IRF3) の活性化により Type 1 IFN 遺伝子発現を誘導する¹⁰⁵。マクロファージにおける TLR4 活性化は TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ などの炎症性サイトカイン産生を誘導し, これらサイトカインがオートクライン・パラクライン的に作用することで獲得免疫のプロセスが開始する^{106,107}。

1-3-2 TLR4 と PAR2 の相互作用

LPS は, PAR2 シグナルを増強することから¹⁰⁸, PAR2 と LPS 受容体はシグナル伝達レベルで cross-talk していると考えられている。そして近年, PAR2 と TLR4 が共役していることが報告された^{109,110}。Rallabhandi らは, マクロファージにおいて, PAR2 による NFκB 活性化の一部には TLR4 が必要であり, PAR2 と TLR4 が物理的に結合していることを明らかにした。さらに, PAR2 KO マウスのマクロファージにおいて LPS 反応性が低下し, TLR4 KO マウスのマクロファージにおいて PAR2-AP 反応性が低下することから, PAR2 と TLR4 は互いにシグナルを増強していることが示唆された¹⁰⁹。しかし, PAR2 と TLR4 が互いの機能を増強するメカニズムやその疾患における意義など, PAR2 と TLR4 の相互作用に関する詳細な研究はほとんど行われていない。

1-4 研究の目的

細菌感染を伴う重篤な急性膵炎において, マクロファージは trypsin と LPS の両方に暴露され活性化をうける。LPS によるマクロファージの活性化は, 炎症性サイトカイン産生を誘導し, 急性膵炎の増悪化の一端を担っていると考えられる。また, PAR2 が LPS シグナルを活性化することも報告されている¹⁰⁸。本研究では, 急性膵炎の発症時には, マクロファージにおいて trypsin による PAR2 の活性化が LPS シグナルを増強することで炎症を増悪化していると仮説を立て (図 13), マクロファージの LPS シグナルに対する trypsin 機能を解明することを目的とした。

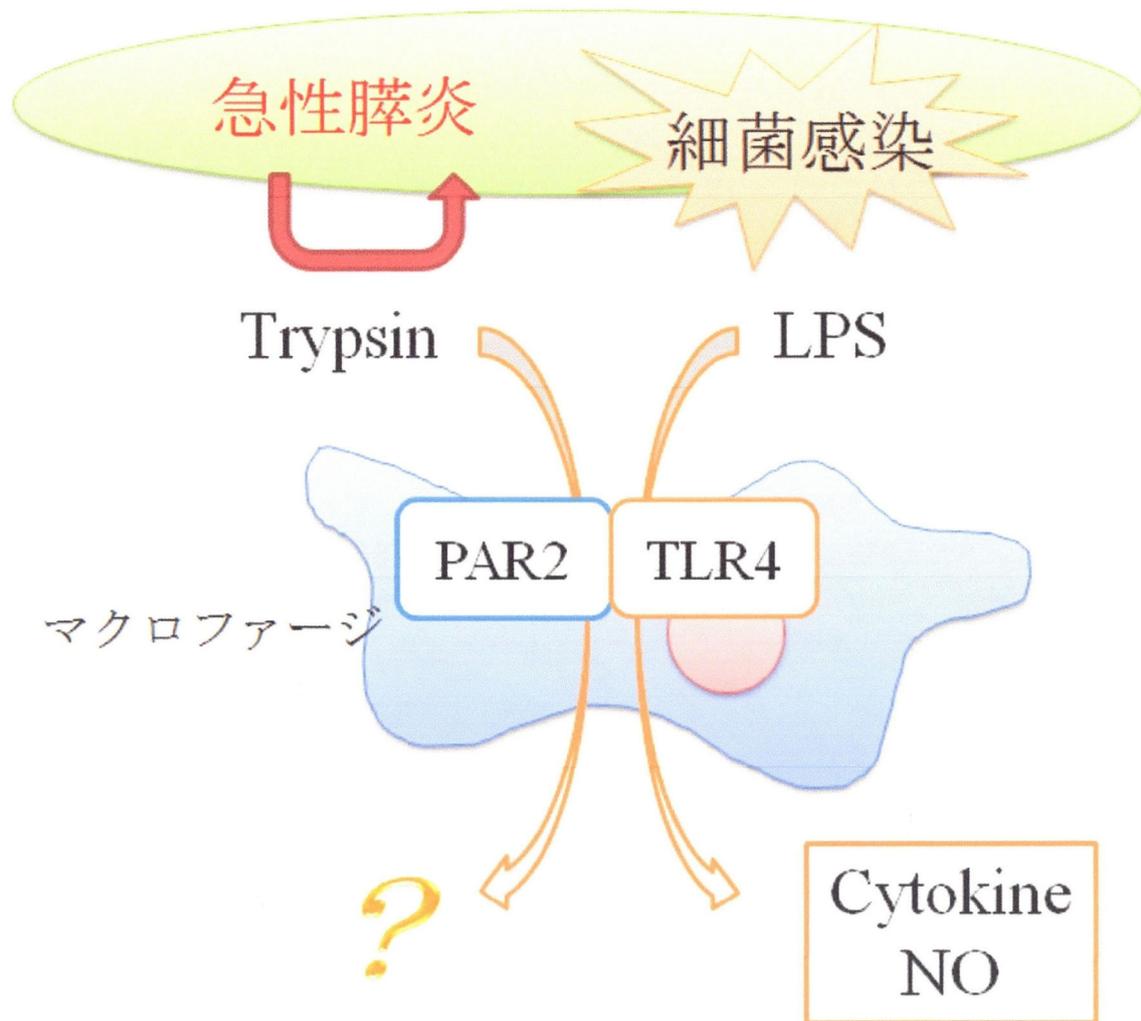


図 13 マクロファージにおける LPS シグナルに対する trypsin 機能の解明

急性膵炎において、マクロファージは trypsin と LPS に暴露される。PAR2 は TLR4 と共役して LPS シグナルを増強することから、trypsin による PAR2 の活性化が LPS によるサイトカイン産生を増強していると仮説を立てた。

第2節 実験結果

2-1 マクロファージにおける LPS シグナルに対する trypsin の影響

2-1-1 LPS による NO 産生に対する trypsin の影響

ddY マウスより採取した腹腔マクロファージ (ddY 腹腔マクロファージ) , RAW264.7 細胞および DH82 細胞を用いて, LPS 処置による NO 産生量を比較した。DMEM-free 培地中で 0.01-1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を処置したところ, NO 産生量は LPS の濃度依存性に増加した (data not shown)。腹腔マクロファージでは 0.1 $\mu\text{g/ml}$, RAW264.7 細胞および DH82 細胞では 0.01 $\mu\text{g/ml}$ で最大の NO 産生量が得られたため, 以後はこれらの濃度で実験を行った。

次に, それぞれのマクロファージにおける LPS による NO 産生に対する trypsin の作用を検討した。LPS を単独または trypsin (0.01-1 μM) と同時に 24 時間処置し, 培地中の NO 濃度を測定したところ, ddY 腹腔マクロファージ (A), RAW264.7 細胞 (B) および DH82 細胞 (C) のいずれにおいても trypsin (1 μM) 処置により LPS による NO 産生は有意に抑制された (図 14)。一方, trypsin (1 μM) の単独処置は, いずれの細胞においても NO 産生に影響を与えなかった (data not shown)。

以上より, 当初の予想に反して trypsin は LPS による NO 産生を抑制する作用を持つことが明らかとなった。

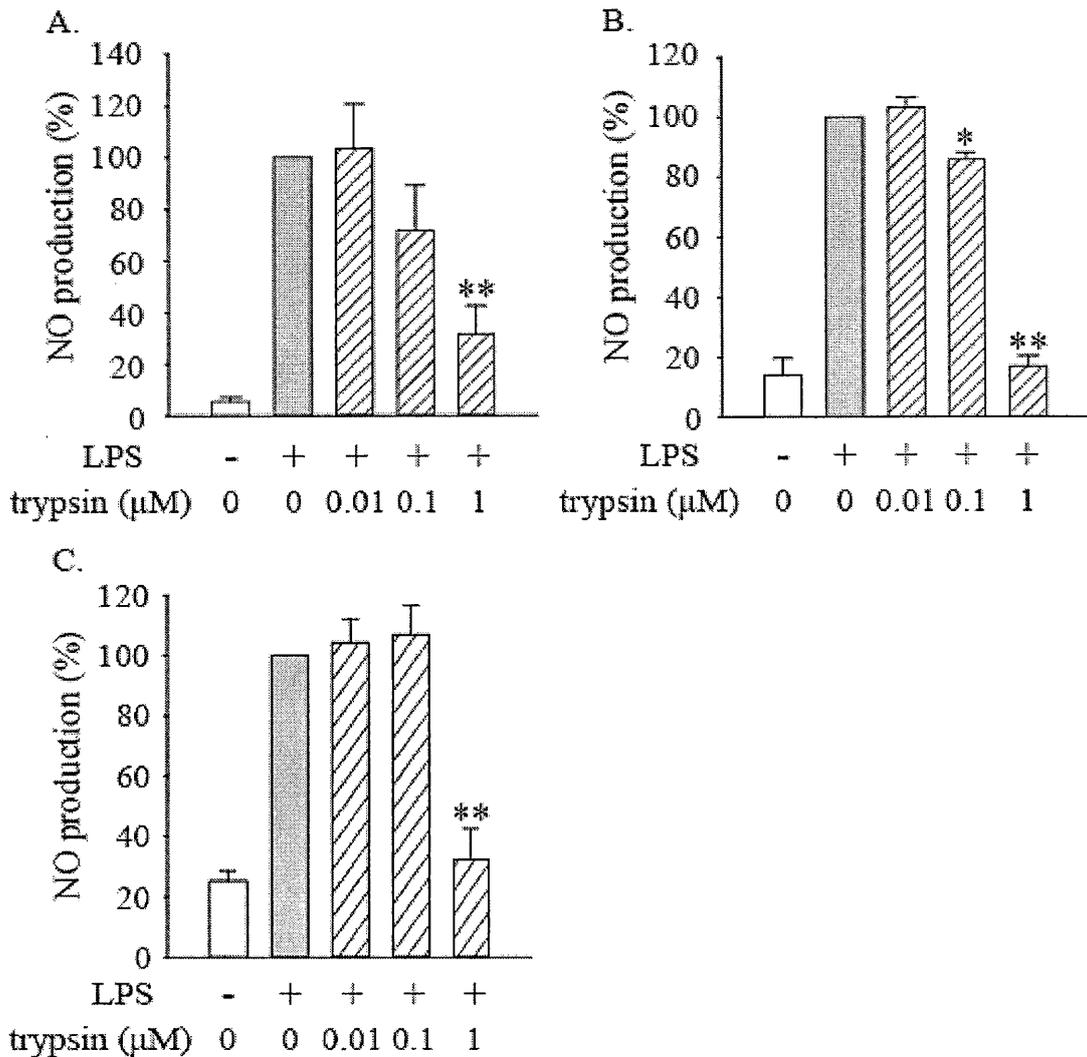


図 14 LPS による NO 産生に対する trypsin の影響

ddY 腹腔マクロファージ (A) , RAW264.7 細胞 (B) および DH82 細胞 (C) に対して, LPS を単独または trypsin (0.01 - 1 μM) と同時に処置し, 24 時間後に培地中の NO 濃度を Griess 法で測定した。ddY 腹腔マクロファージでは 0.1 $\mu\text{g/ml}$, RAW264.7 細胞および DH82 細胞では 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を処置した。LPS を単独処置した場合の NO 産生量を 100%として表示した。n=3-6。** : $P < 0.01$ (LPS 単独処置との比較)。

2-1-2 LPS による iNOS 発現に対する trypsin の影響

Trypsin が NO 産生を抑制したことから、LPS により誘導され NO を合成する誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible NO synthase : iNOS) の発現量について検討した。

RAW264.7 細胞に対して LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) を 20 時間処置したところ、iNOS タンパク質の発現量が増加した。このとき trypsin (0.01-1 μM) を同時に処置することで iNOS 発現量の増加は有意に抑制された (図 15)。

次に、real-time PCR による検討を行ったところ、RAW264.7 細胞に対して LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) を 8 時間処置すると iNOS mRNA の発現量が増加した。また、タンパク質と同様に、trypsin (1 μM) を同時に処置することで iNOS 発現量は減少した。一方、trypsin 単独処置は iNOS mRNA 発現量に影響を与えなかった (図 16)。

以上より、trypsin は iNOS 発現量を抑制することで NO 産生を抑制することが示された。

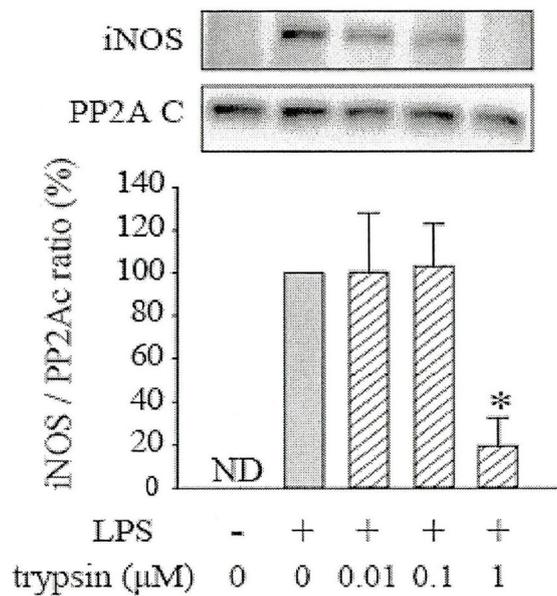


図 15 LPS による iNOS タンパク質発現に対する trypsin の影響

RAW264.7 細胞に対して、LPS (0.01 μg/ml) を単独または trypsin (0.01-1 μM) と同時に処置し、20 時間後の iNOS および PP2A C タンパク質発現量を western blot 法で測定した。iNOS の発現量は PP2A C と相対的に評価した。n=3。* : $P < 0.05$ (LPS 単独処置との比較)。

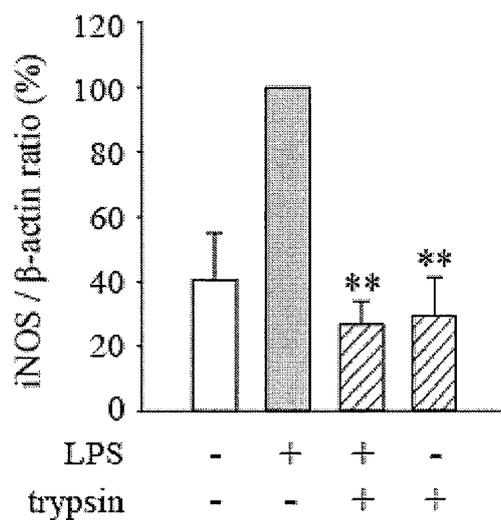


図 16 LPS による iNOS mRNA 発現に対する trypsin の影響

RAW264.7 細胞に対して、LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) または trypsin (1 μM) を処置し、8 時間後の iNOS および $\beta\text{-actin}$ の mRNA 発現量を Real-time PCR 法で測定した。iNOS の発現量は $\beta\text{-actin}$ と相対的に評価した。LPS を単独処置した場合のそれぞれの iNOS 発現量を 100%として表示した。n=5-6。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (LPS 単独処置との比較)。

2-1-3 LPS による炎症性サイトカイン産生に対する trypsin の影響

次に, trypsin の抑制作用が iNOS 発現に特異的であるかを検討するため, LPS により誘導される炎症性サイトカインである IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現量に対する影響を検討した。RAW264.7 細胞に対して, LPS (0.01 μ g/ml) または trypsin (1 μ M) を 8 時間処置したところ, LPS によって IL-1 β および IL-6 の発現量が増加した。そして, 増加したサイトカイン発現量は, trypsin (1 μ M) を同時に処置することで減少した (図 17A, B)。また, trypsin 単独処置は無処置群に比べて IL-1 β および IL-6 mRNA 発現量の増加傾向を示したが, 有意な差は認められなかった (図 17)。

以上より, trypsin の抑制作用は NO 特異的ではなく, LPS シグナルの下流全てを抑制している可能性が示唆された。

2-1-4 炎症性サイトカイン産生に対する PAR2 の関与

Trypsin 単独処置により炎症性サイトカイン産生はわずかな増加傾向が認められたため (図 17), 炎症性サイトカイン産生に対する PAR2 活性化の影響を検討した。RAW264.7 細胞に対して, PAR2 特異的活性化ペプチドである PAR2-AP (100 μ M) を 18 時間処置したところ, PAR2-AP により IL-1 β および IL-6 mRNA 発現量が有意に増加した (図 18)。

以上より, trypsin 単独処置による炎症性サイトカイン産生は PAR2 を介した作用だと考えられる。

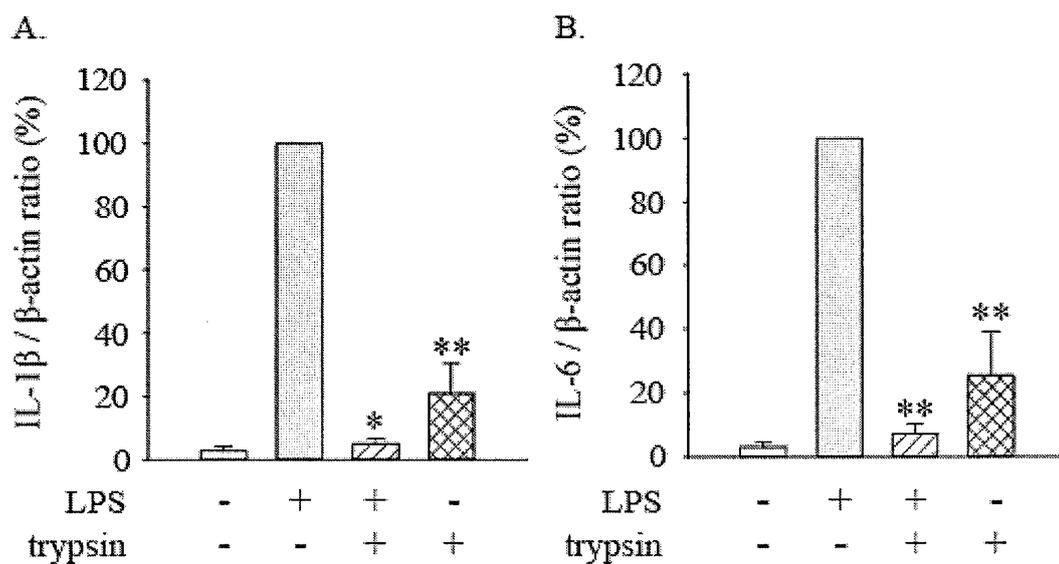


図 17 LPS による炎症性サイトカイン産生に対する trypsin の影響

RAW264.7 細胞に対して LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) または trypsin (1 μM) を処置し、8 時間後の IL-1 β (A), IL-6 (B) および β -actin の mRNA 発現量を Real-time PCR 法で測定した。IL-1 β および IL-6 の発現量は β -actin と相対的に評価した。LPS を単独処置した場合のサイトカイン発現量を 100%として表示した。n=4-6。* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ (LPS 単独処置との比較)。

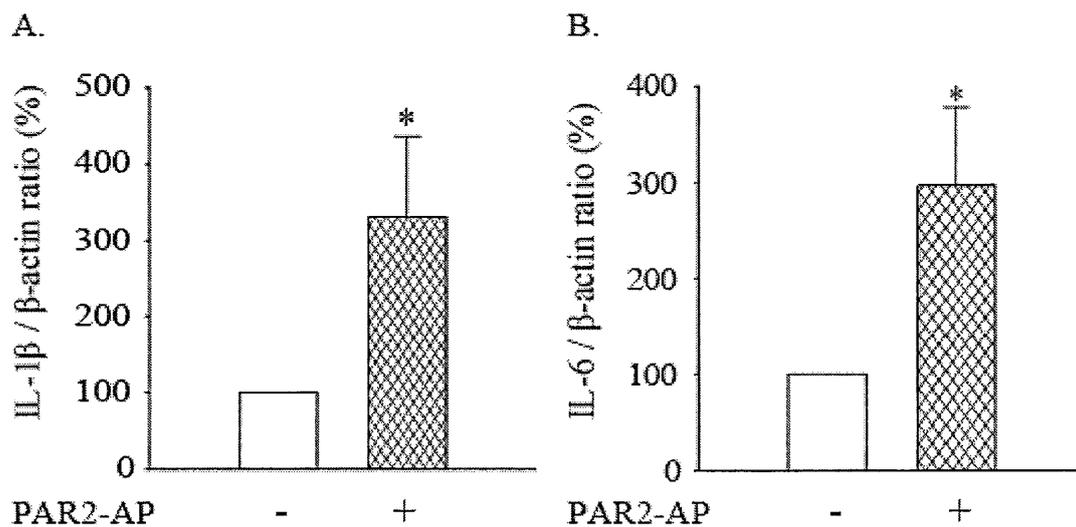


図 18 PAR2-AP による炎症性サイトカイン産生への影響

RAW264.7細胞に対してPAR2-AP(100 μM)を処置し, 18時間後のIL-1β(A), IL-6 (B) および β-actin の mRNA 発現量を Real-time PCR 法で測定した。IL-1β および IL-6 の発現量は β-actin と相対的に評価した。無処置時のサイトカイン発現量を 100%として表示した。n=4-6。* : $P < 0.05$ (無処置との比較)。

2-2 Trypsin の抑制作用に対する PAR の関与

2-2-1 Trypsin の抑制作用に対する PAR2 の影響

次に, trypsin の主要なシグナル伝達経路である PAR2 の関与を検討するため, 野生型 (WT) C57B6/J マウスおよび PAR2 KO マウスの腹腔マクロファージを用いて, LPS による NO 産生に対する trypsin 処置の影響を検討した。LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$) を単独または trypsin (0.01 - 1 μM) と同時に 24 時間処置したところ, WT 腹腔マクロファージにおいて NO 産生が促進され, trypsin 処置により NO 産生が抑制された (図 19A)。一方, PAR2KO 腹腔マクロファージにおいても trypsin の濃度依存性の NO 産生抑制作用が認められた (図 19B)。ただし, 野生型マウスの腹腔マクロファージに対する LPS 刺激による NO 産生量は $38.9 \pm 8.2 \mu\text{M}$ だったのに対し, PAR2 KO マウスの腹腔マクロファージでは $15.7 \pm 7.6 \mu\text{M}$ であった。

さらに, ddY 腹腔マクロファージ及び RAW264.7 細胞を用いて, LPS による NO 産生に対する PAR2-AP の作用を検討した。LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$ または 0.01 $\mu\text{g/ml}$) を単独または PAR2-AP (0.1-10 μM) と同時に 24 時間処置したところ, PAR2-AP 処置は LPS による NO 産生を抑制しなかった (図 20)。

以上より, trypsin による LPS シグナル抑制作用に PAR2 が関与していないことが明らかとなった。

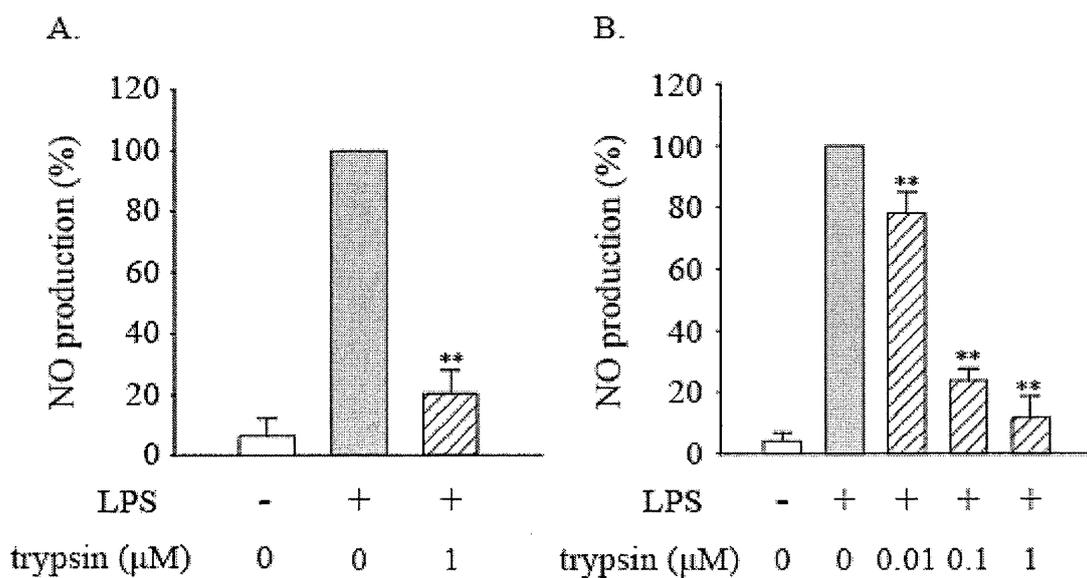


図 19 PAR2 KO マウス腹腔マクロファージにおける trypsin 抑制作用の検討

WT(A) および PAR2 KO (B) の腹腔マクロファージに対して, LPS (0.1 μg/ml) を単独または trypsin (0.01-1 μM) と同時に処置し, 24 時間後に培地中の NO 濃度を Griess 法で測定した。LPS 単独処置した場合の NO 産生量を 100%として表示した。n=5-6。** : $P < 0.01$ (LPS 単独処置との比較)。

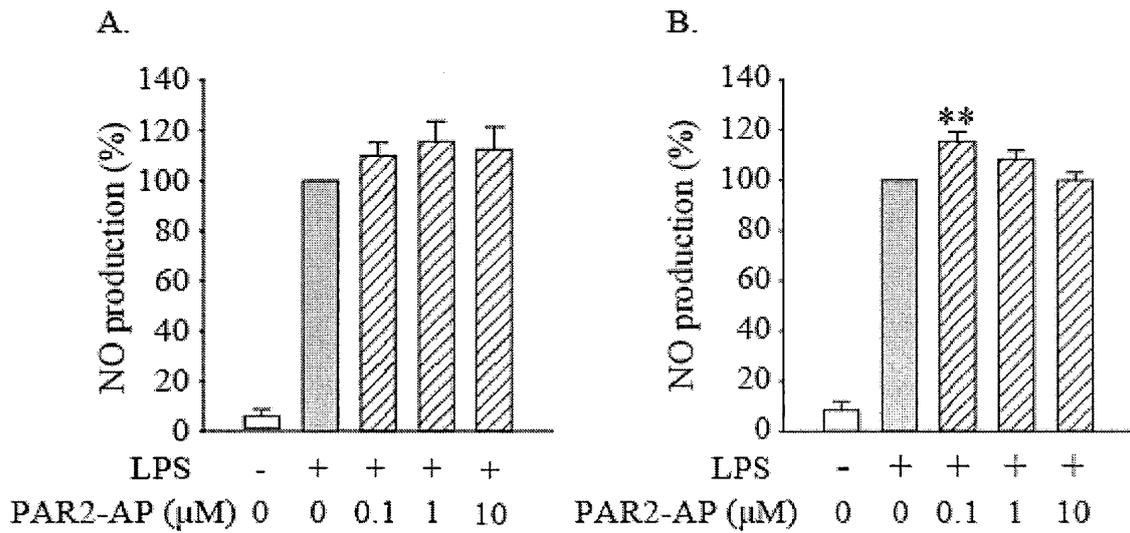


図 20 LPS による NO 産生に対する PAR2-AP の影響

ddY 腹腔マクロファージ (A) および RAW264.7 細胞 (B) に対して, LPS を単独または PAR2-AP (0.1-10 μM) と同時に処置し, 24 時間後に培地中の NO 濃度を Griess 法で測定した。腹腔マクロファージでは 0.1 μg/ml, RAW264.7 細胞では 0.01 μg/ml の LPS を処置した。LPS を単独処置した場合の NO 産生量を 100% として表示した。n=5-23。** : $P < 0.01$ (LPS 単独処置との比較)。

2-2-2 Trypsin の抑制作用に対する PAR1, 3, 4 の影響

次に, trypsin による抑制作用における PAR2 以外の PAR サブタイプの関与を検討した。ddY 腹腔マクロファージと RAW264.7 細胞に, 各々 0.1 $\mu\text{g/ml}$ と 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を, 単独または PAR1 特異的活性化ペプチドである PAR1-AP (0.1-10 μM), PAR4 特異的活性化ペプチドである PAR4-AP (1-100 μM) と同時に処置し, 培地中の NO 産生量を測定した。PAR1-AP の処置は, ddY 腹腔マクロファージ及び RAW264.7 細胞いずれの細胞においても LPS による NO 産生に影響を与えなかった (図 21A, B)。一方, PAR4-AP は, ddY 腹腔マクロファージにおいては LPS による NO 産生を抑制したが, RAW264.7 細胞においては NO 産生を濃度依存性に促進した (図 21C, D)。しかし, ddY 腹腔マクロファージにおける PAR4-AP の NO 産生抑制作用は, trypsin の抑制作用と比較すると著しく小さいものであった。

さらに, PAR1, 3, 4 を活性化させる生理活性物質である thrombin を用いて検討を行った。ddY 腹腔マクロファージと RAW264.7 細胞に, 各々 0.1 $\mu\text{g/ml}$ と 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を, 単独または thrombin (3 U/ml) と同時に処置し, 培地中の NO 産生量を測定したところ, trypsin 処置により観察された抑制作用は認められなかった (図 22)。

以上より, trypsin による LPS シグナル抑制作用には, いずれの PAR も関与していないことが示唆された。

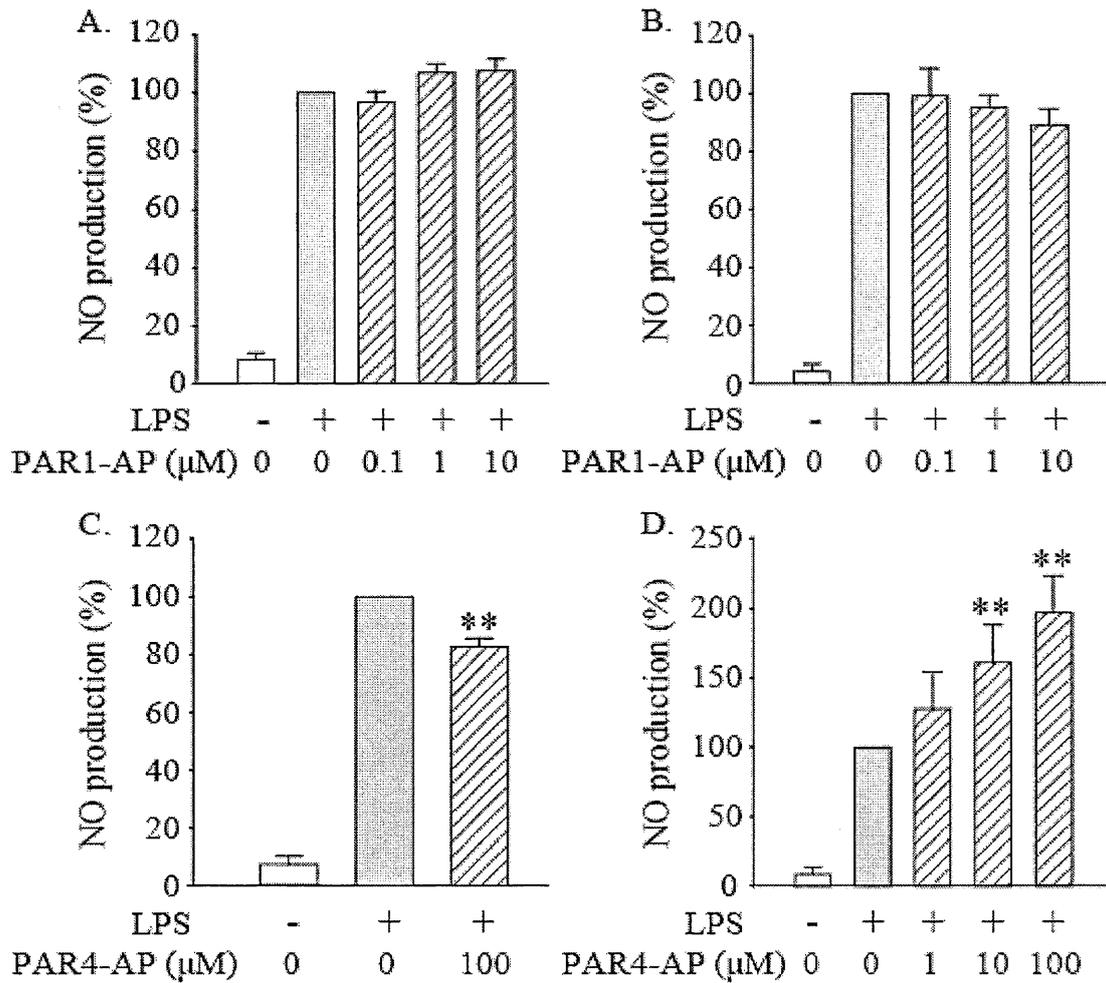


図 21 Trypsin の抑制作用に対する PAR1, 4 の影響

ddY 腹腔マクロファージ (A, C) および RAW264.7 細胞 (B, D) に対して、LPS を単独または PAR1-AP (0.1 - 10 μM) (A, B), PAR4-AP (1 - 100 μM) (C, D) と同時に処置し、24 時間後に培地中の NO 濃度を Griess 法で測定した。ddY 腹腔マクロファージでは 0.1 μg/ml, RAW264.7 細胞では 0.01 μg/ml の LPS を処置した。LPS を単独処置した場合の NO 産生量を 100% として表示した。n=4-10。

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ (LPS 単独処置との比較)。

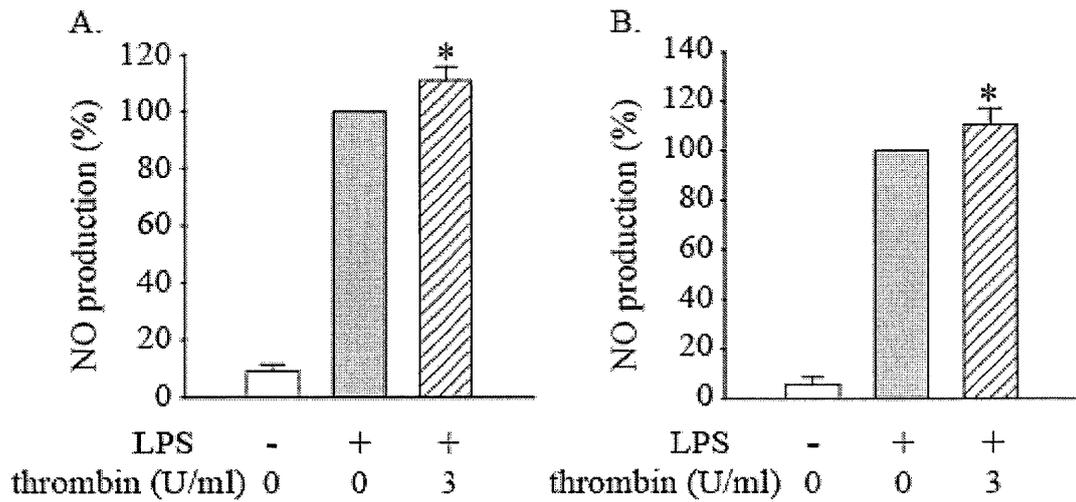


図 22 LPS による NO 産生に対する thrombin の影響

ddY 腹腔マクロファージ (A) および RAW264.7 細胞 (B) に対して、LPS を単独または thrombin (3 Unit/ml) と同時に処置し、24 時間後に培地中の NO 濃度を Griess 法で測定した。ddY 腹腔マクロファージでは 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、RAW264.7 細胞では 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を処置した。LPS を単独処置した場合の NO 産生量を 100%として表示した。n=6。* : $P < 0.05$ (LPS 単独処置との比較)。

2-3 Trypsin の抑制作用におけるプロテアーゼ活性の影響

次に, trypsin の抑制作用におけるプロテアーゼ活性の必要性を検討した。プロテアーゼ活性の阻害には, 鶏卵白 (CEW) 由来および大豆 (SW) 由来の trypsin 阻害剤を用いた。RAW264.7 細胞に対して, LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) を単独または trypsin (1 μM) および trypsin 阻害剤 (SB ; 10 $\mu\text{g/mL}$, CEW ; 30 $\mu\text{g/mL}$) と同時に 24 時間処置し, 培地中の NO 濃度を測定したところ, trypsin による NO 産生抑制作用は trypsin 阻害剤により解除された (図 23)。

以上より, trypsin の LPS シグナル抑制作用にはプロテアーゼ活性が必要であることが示された。

2-4 LPS に対する trypsin の影響

これまでの実験は LPS と trypsin を同時に処置しているため, trypsin が LPS を直接分解することで LPS シグナルを抑制する可能性が考えられた。そこで, ddY 腹腔マクロファージに trypsin (1.0 μM) を 1 時間前処置し, 洗浄により trypsin を除去した後, LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) を 24 時間処置し, 培地中の NO 量を測定したところ, trypsin 前処置は LPS による NO 産生を抑制した (図 24)。
以上より, trypsin の LPS シグナル抑制作用に, trypsin による LPS の分解は関与しないことが示された。

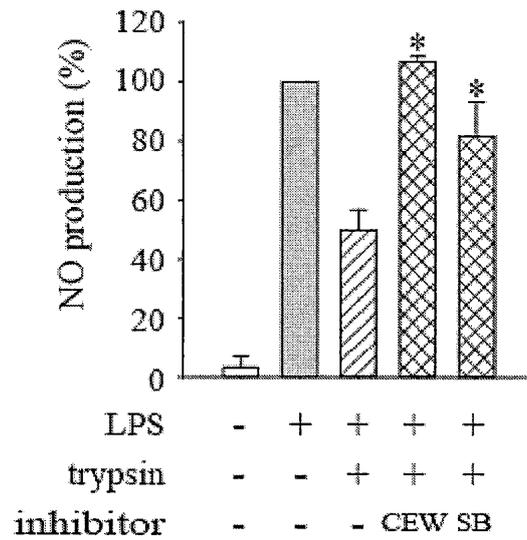


図 23 Trypsin の抑制作用に対する trypsin 阻害剤の影響

RAW264.7 細胞に対して、LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) を単独または trypsin (1 μM) を同時に処置し、24 時間後の培地中の NO 濃度を Griess 法で測定した。また trypsin 処置時に鶏卵白由来 (CEW; 30 $\mu\text{g/mL}$) または大豆由来 (SB; 10 $\mu\text{g/mL}$) の trypsin 阻害剤を処置することで、trypsin のプロテアーゼ活性を阻害した。LPS を単独処置した場合の NO 産生量を 100%として表示した。n=3-7。* : $P < 0.05$ (LPS と trypsin の同時処置との比較)。

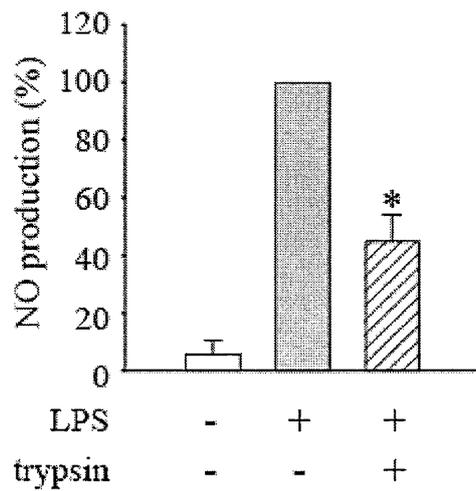


図 24 LPS による NO 産生に対する trypsin 前処置の影響

ddY 腹腔マクロファージに対して、trypsin (1 μ M) を 1 時間前処置し、培地交換後に LPS (0.1 μ g/ml) を処置し、24 時間後に培地中の NO 濃度を Griess 法で測定した。LPS (0.1 μ g/ml) を単独処置した場合の NO 産生量を 100%として表示した。n=5。* : $P < 0.05$ (LPS 単独処置との比較)。

2-5 LPS 受容体発現量に対する trypsin の影響

2-5-1 細胞膜上の LPS 受容体に対する trypsin の影響

次に，trypsin が LPS 受容体を分解することで LPS シグナルを抑制している可能性があるため，LPS 受容体である TLR4 ， mMD-2 および mCD14 タンパク質発現量に trypsin が与える影響を検討した。なお，生体において LBP は血漿タンパク質であり，培養細胞においては FBS より供給される。しかし，本実験では trypsin 処置中には培地中の FBS を除去しているため，trypsin の抑制作用に LBP は関与しないと考えられることから検討を行っていない。

RAW264.7 細胞に対して，trypsin (1 μ M) を 30 分処置した後，TLR4，mMD-2 および mCD14 発現量を測定したところ，trypsin 処置により TLR4 および mMD-2 発現量に変化は認められなかった。一方，mCD14 発現量は trypsin 処置により減少した (図 25)。

以上より，trypsin の LPS シグナル抑制作用の一部は，mCD14 発現量の減少を介している可能性が示唆された。

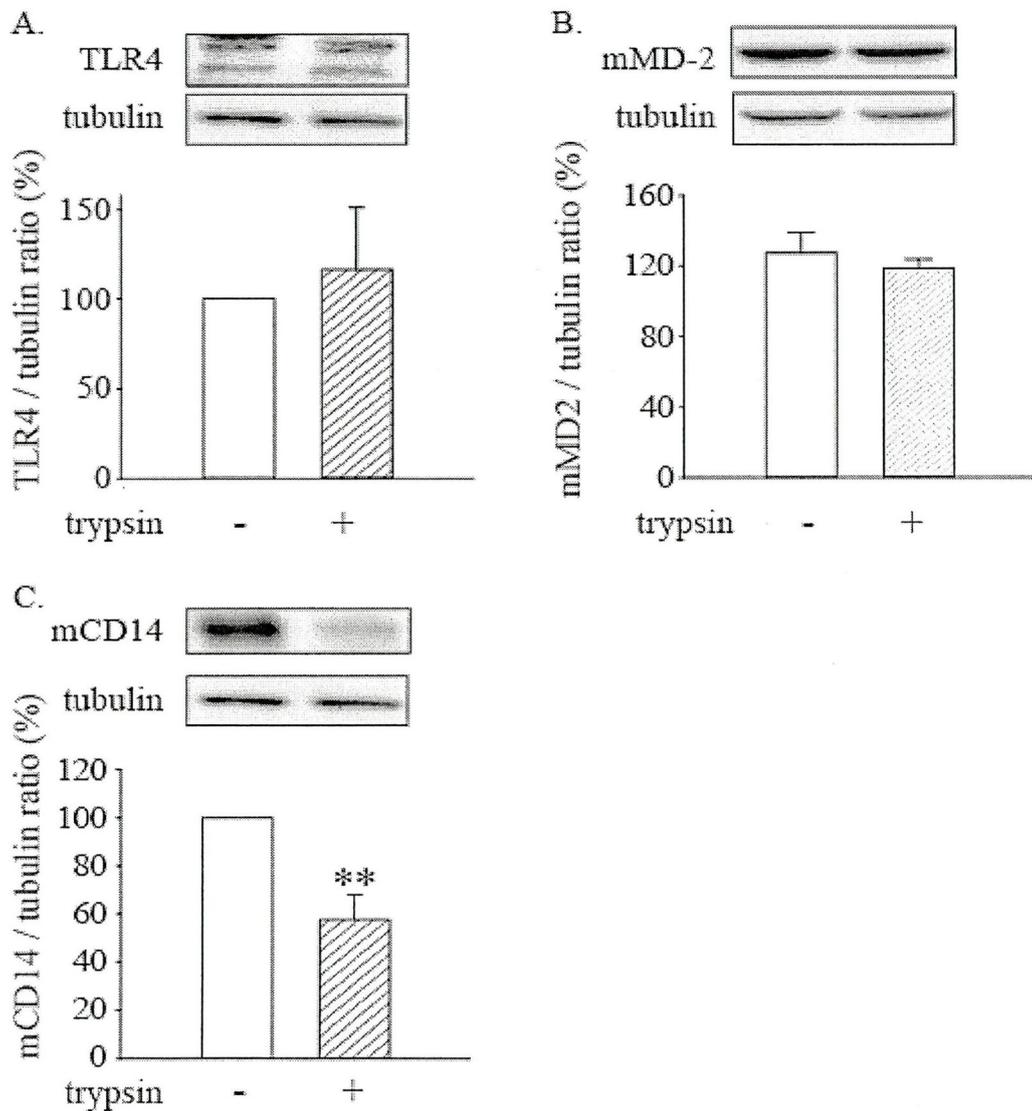


図 25 細胞膜状の LPS 受容体に対する trypsin の影響

RAW264.7 細胞に対して trypsin (1.0 μ M) で 30 分処置した後, TLR4 (A), mMD-2 (B), mCD14 (C) および tubulin のタンパク質発現量を western blot 法で測定した。TLR4, mMD-2 および mCD14 発現量は tubulin と相対的に評価し, 無処置時のタンパク質発現量を 100% として表示した。n=4-12。* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ (無処置との比較)。

2-5-2 培地中の sMD-2 および sCD14 に対する trypsin の影響

MD-2 および CD14 には、膜結合型 (mMD-2, mCD14) の他に、培地中に分泌される可溶型 (sMD-2, sCD14) が存在する。そのため、RAW264.7 細胞を trypsin (1 μ M) で 30 分処置し、培地中の sMD-2 と sCD14 を検討したところ、sMD-2 発現量は完全に消失し、sCD14 発現量も有意に減少した (図 26A, B)。

sMD-2 および sCD14 発現量を減少させる作用機序として、trypsin が sMD-2 や sCD14 を直接分解する可能性と、trypsin によるシグナル伝達により分泌が抑制される可能性が考えられる。そこで RAW264.7 細胞を 30 分間培養した培養液を回収し、細胞非存在下で trypsin (1 μ M) を 30 分間処置したところ、細胞非存在下でも trypsin 処置により sCD14 および sMD-2 発現が消失した (図 26C)。

以上より、trypsin による sCD14 および sMD-2 の分解が、LPS シグナル抑制作用に関与している可能性が示唆された。

2-5-3 組換え CD14 に対する trypsin の影響

Trypsin 処置により、mCD14 および sCD14 のタンパク質発現量はどちらも減少したことから、CD14 は、trypsin による LPS シグナル抑制作用において主要なターゲットタンパク質であると考えられる。そこで、trypsin による CD14 への直接作用を、より詳細に検討した。精製した組換え CD14 タンパク質に対して、trypsin (1 μ M) を 37°C で 30 分間処置したところ、trypsin 処置により組換え CD14 タンパク質発現は消失した (図 27)。

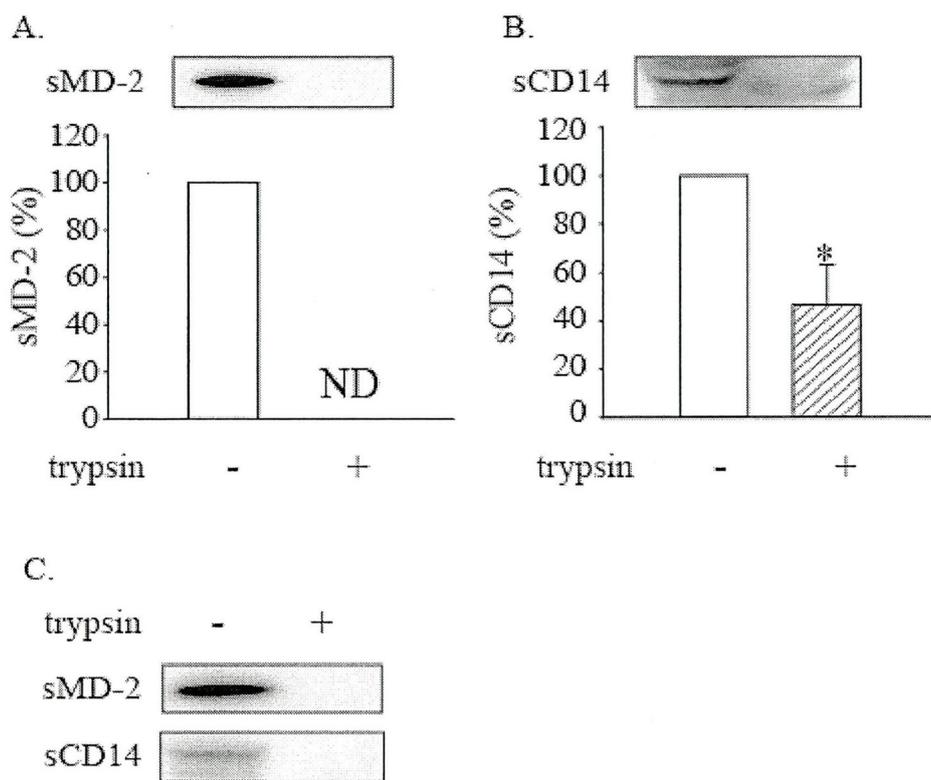


図 26 培地中の sMD-2 および sCD14 に対する trypsin の影響

RAW264.7 細胞に対して, trypsin (1.0 μ M) を 30 分処置した後, 培地中の sMD-2 (A) および sCD14 (B) を western blot 法で測定した。無処置時のタンパク質発現量を 100%として表示した。また, RAW264.7 細胞を 30 分間培養した培養液を回収し, 細胞非存在下で trypsin (1 μ M) を 30 分間処置したときの sMD-2 および sCD14 発現量を western blot 法で測定した (C)。n=3-4。* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ (無処置との比較)。

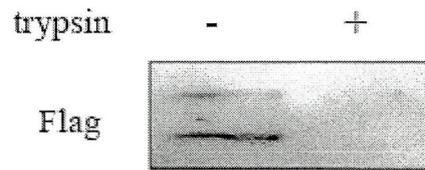


図 27 組換え CD14 に対する trypsin の影響

N 末端に Flag タグ，C 末端に His タグを付加した組換え CD14 タンパク質を作成し，TALON ビーズを用いて His タグが付加されたタンパク質を精製した。精製した CD14 タンパク質を 37°C で 30 分間 trypsin (1 μ M) で処置した後，Flag 抗体を用いて western blot 法で測定した。

第3節 考察

本研究は、マクロファージにおける trypsin を介した PAR2 活性化が、LPS シグナルに与える影響を解明することを目的に行った。その結果、当初の予想に反して、PAR 非依存的な trypsin の LPS シグナル抑制作用が明らかとなった。そして trypsin の抑制作用は、LPS 受容体である TLR4 の共受容体である sMD-2, sCD14 および mCD14 分解を介していることが示唆された (図 28)。以上の結果は、急性膵炎における trypsin の新たな機能の発見となると共に、プロテアーゼによる LPS シグナル調節機構という新たな概念を提唱するものとなった。

3-1 マクロファージの炎症性メディエーター産生に対する trypsin の影響

本研究結果から、マクロファージにおいて trypsin は LPS による NO や炎症性サイトカイン産生を抑制する作用を持つことが明らかとなった (図 14-17)。急性膵炎における trypsin の異所性活性化は増悪因子であり、PAR2 活性化が炎症性サイトカインを増加させる報告もあることから^{65,89,90}、今回得られた trypsin が LPS による炎症性サイトカイン産生を抑制するという結果は、当初の予想と反するものとなった。

一方、RAW264.7 細胞においては、trypsin 単独処置により IL-1 β および IL-6 発現の増加傾向が認められた (図 17)。また、RAW264.7 細胞において、PAR2-AP 処置により IL-1 β および IL-6 発現量が小さくはあるが有意に増加したことから (図 18)、trypsin は PAR2 を介して炎症性サイトカイン発現を増加させていると思われる。

以上の結果より、マクロファージにおいては、trypsin の PAR2 を介した炎症性サイトカイン産生作用よりも LPS シグナル抑制作用が強く発現するため、LPS と trypsin 同時処置では抑制作用が現れている可能性が考えられる。

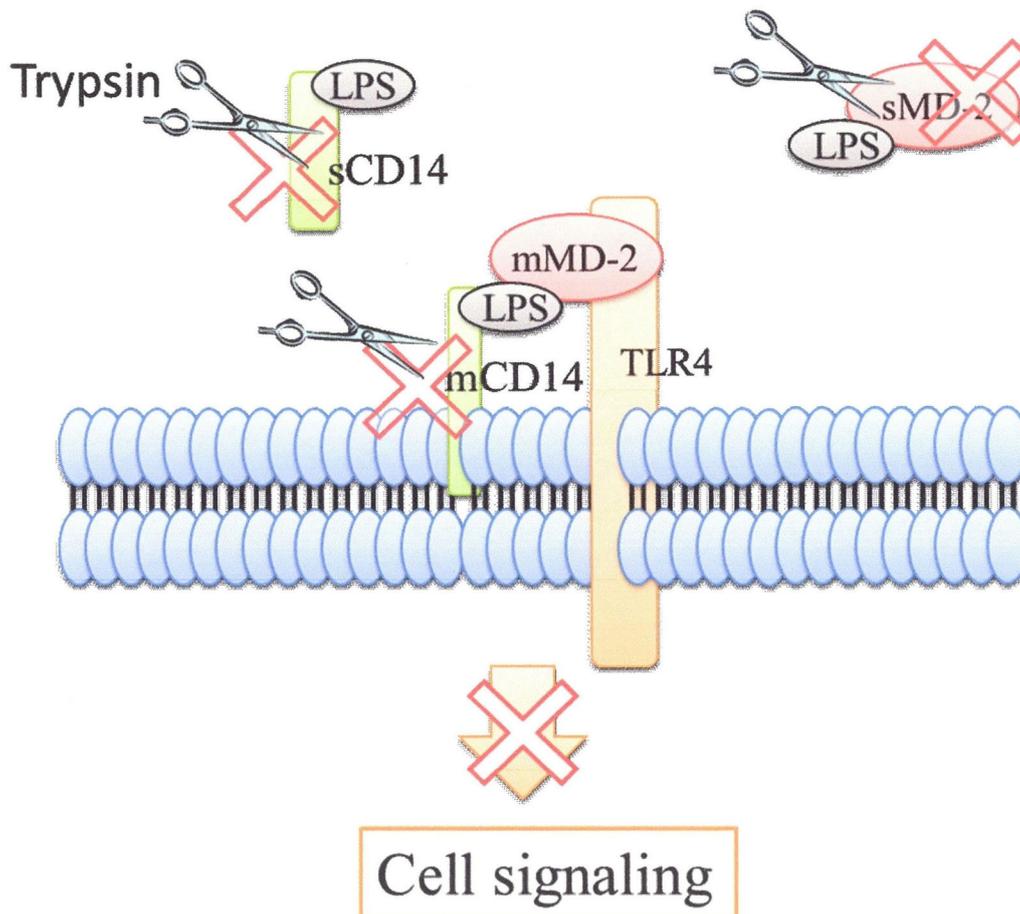


図 28 Trypsin による LPS シグナル抑制作用

mCD14 は細胞膜に存在し、LPS と TLR4 の親和性を増加させる。同様に、可溶性の sCD14 や sMD-2 も LPS と結合し、TLR4 活性化による LPS シグナルを増強する。Trypsin は、sCD14、mCD14 および mMD-2 を分解することで LPS シグナルを阻害する。

3-2 Trypsin の抑制作用に対する PAR の関与

3-2-1 Trypsin 抑制作用に対する PAR2 の関与

PAR2 は trypsin 受容体として古くから知られており, trypsin は一般的な PAR2 アゴニストとして用いられている。また近年, PAR2 活性化は LPS 受容体である TLR4 シグナルと相互作用しているを持つことが報告された¹⁰⁹。しかし, WT および PAR2 KO マウスに LPS を腹腔内した時の死亡率に有意な差はみられず, *in vivo* での PAR2 と LPS シグナル伝達の関係は明らかになっていない¹¹¹。

本研究では, trypsin による NO 産生抑制作用における PAR2 の関与を明らかにするために, WT と PAR2 KO マウスから単離した腹腔マクロファージを用いて検討を行った。その結果, WT, PAR2 KO マウスともに trypsin 処置で LPS による NO 産生が抑制された (図 19)。また, PAR2-AP 処置では trypsin と同様の抑制作用は認められなかった (図 20)。以上より, trypsin による LPS シグナル抑制作用において, PAR2 活性化は関与していないことが明らかとなった。

しかし, PAR2 KO マウスにおいては WT マウスと比較して LPS による NO 産生量が有意に減少したという報告もされている¹¹²。本研究においても, 野生型マウスの腹腔マクロファージと比べて, PAR2 KO マウスの腹腔マクロファージの LPS 刺激による NO 産生量は少なかった。以上より, これまで報告されていたとおり¹⁰⁸⁻¹¹⁰, PAR2 活性化は LPS によるシグナル伝達において何らかの作用は示す可能性が考えられ, 今後更なる検討が必要と思われる。

3-2-3 Trypsin の抑制作用に対する PAR1, PAR3 および PAR4 の関与

近年の研究から, trypsin は PAR2 のみならず, PAR1 および PAR4 も活性化することが明らかとなっている¹¹³。そこで, PAR1-AP および PAR4-AP が LPS シグナルに与える影響を検討したが, RAW264.7 細胞および ddY 腹腔マクロファージどちらにおいても trypsin と同様の抑制作用は認められなかった (図 21)。PAR4-AP は, ddY 腹腔マクロファージにおける NO 産生を抑制したが, その作用は trypsin に比べて著しく小さかった (図 21C)。また, PAR1, PAR3 および PAR4 を活性化する thrombin によっても trypsin と同様の抑制作用は認められなかった (図 22)。以上の結果から, 当初の予想に反して trypsin の抑制作用に PAR が関与していないことが明らかとなった。

興味深いことに本研究では、PAR4-APはLPS処置によるRAW264.7のNO産生を亢進し、ddY腹腔マクロファージにおいてはNO産生を抑制するという異なる作用を示した(図21C, D)。PAR4は他のPARサブタイプと同様に様々な炎症に関与していると考えられている。LPS処置により肺組織におけるPAR4発現量が上昇することが報告されており¹¹⁴、またNOに関しては、血管内皮細胞においてPAR4活性化がNO産生を促進する作用があると報告されている¹¹⁵。さらに呼吸器上皮細胞株において、PAR4作動薬は細胞内カルシウム濃度を上昇させ、IL-6やIL-8などの炎症性サイトカインの放出を促進することが報告されている¹¹⁶。しかし、PAR1やPAR2に比べてPAR4の研究は進んでおらず、免疫細胞におけるPAR4の機能はほとんど明らかになっていない。本研究で認められたRAW264.7細胞とddY腹腔マクロファージにおけるPAR4-AP作用の違いも、細胞種によるPAR4発現量の違いやPAR4下流のシグナルの違いが影響していると考えられるがその詳細は不明である。PAR4はマクロファージのみならずマスト細胞やミクログリアなどの免疫細胞にも発現が確認されており^{117,118}、免疫応答におけるPAR4の役割を明らかにするためにも、免疫細胞における複雑なPAR4機能を検討していく必要がある。

3-3 LPS受容体に対するtrypsinの作用

3-2-1 TLR4に対するtrypsinの影響

TrypsinのPAR2抑制作用に、プロテアーゼ活性が必要であることが明らかとなったことから(図23)、trypsinがLPSを直接分解している可能性が考えられた。しかし、マクロファージへtrypsinを前処置し、trypsin非存在下でLPS処置してもLPSによるNO産生が抑制されたことから、trypsinの抑制作用はLPSの分解によるものではないことが明らかとなった。そこで、trypsinはLPS受容体であるTLR4、MD-2およびCD14に作用している可能性が考えられた。

TLR4は、LPSシグナルを細胞内に伝達する役割を担う受容体である。そこでtrypsinによって分解されるターゲットがTLR4である可能性を検討した。しかし、本研究ではtrypsin処置によってTLR4タンパク質発現量の変化は認められなかった(図25A)。de Zoeteらも、trypsinより基質特異性が低いセリンプロテアーゼであるprotease KがマクロファージのTLR4を切断しないことを報告している

¹¹⁹。一方、TLR ファミリーの TLR7, TLR9 および TLR15 はエンドソーム内でプロテアーゼによって切断される^{119,120}。TLR4 とプロテアーゼによって切断される TLR ファミリーとの違いとして考えられるのは、プロテアーゼ切断サイトの有無である。TLR9 や TLR15 などはプロテアーゼによって認識、切断されるモチーフを持っているが、TLR4 にはこのようなモチーフがないため、プロテアーゼによる影響を受けない可能性が考えられる^{119,120}。また、TLR4 の膜輸送には、糖鎖付加などの翻訳後修飾が重要な働きをしていることから¹²¹、翻訳後修飾がプロテアーゼによる切断からの保護を担っている可能性も考えられる。また、LPS は TLR4 を膜表面に局在させる働きがあり、マクロファージにおいてもその作用は報告されている¹²²⁻¹²⁴。つまり、静止状態では TLR4 が細胞内部に分布しており、trypsin による影響を受けにくかった可能性がある。しかし、静止状態でも細胞膜上に TLR4 は発現しており、trypsin 処置により TLR4 タンパク質発現量に減少傾向が認められなかったことから、TLR4 が trypsin により直接分解される可能性は考えにくい。

3-2-2 MD-2 に対する trypsin の影響

また TLR4 と同様に、膜結合型の mMD-2 発現量も trypsin により変化が認められなかった (図 25B)。通常、mMD-2 は TLR4 と結合して細胞膜に存在している。TLR4 は trypsin による分解を受けなかったため、TLR4 の結合が mMD-2 のプロテアーゼによる分解に保護的に働いている可能性が考えられる。また、上記のとおり静止状態では膜上の TLR4 発現量は低下しており、TLR4 と複合体を形成している mMD-2 も細胞内に存在し、プロテアーゼとの接触が阻害されている可能性がある。

一方、可溶型の sMD-2 は trypsin 処置により完全に分解された (図 26A)。mMD-2 との違いの原因として、細胞外に分泌された sMD-2 は trypsin と直接接触するため、trypsin の影響を受けやすかったという可能性が考えられる。また図 26C に示すとおり、細胞非存在下でも trypsin 処置により sMD-2 発現量が消失したことから、trypsin 刺激により細胞から分泌されるプロテアーゼは関与していないことが示唆された。

sMD-2 は mMD-2 と同様に LPS と結合し、TLR4 を発現する細胞の LPS シグナルを誘発する¹²⁵。そのため、trypsin による sMD-2 分解によって、マクロファ-

ジにおける LPS シグナルだけでなく、sMD-2 が作用する他の細胞の LPS シグナルも阻害されることを示している。

3-2-3 CD14 に対する trypsin の影響

興味深いことに trypsin によって mMD-2 は分解されなかったが、mCD14 は分解された (図 25C)。mCD14 は GPI 結合型タンパク質として細胞膜に存在するのに対して、mMD-2 は常に TLR4 と結合している。この TLR4 との結合の有無が trypsin に対する感受性の差の原因となっている可能性が考えられる。

そして、trypsin は sMD-2 と同様に sCD14 も分解し、この作用は trypsin 刺激により細胞から分泌されるプロテアーゼによるものではないことが明らかとなった (図 26B, C)。RAW264.7 において、MMP-12 は mCD14 を切断し sCD14 を産生することが報告されるなど⁹⁸、これまで mCD14 のプロテアーゼによる切断は sCD14 を産生するものだと考えられてきた。Trypsin においても、高濃度 trypsin (40 μ M) が mCD14 発現量を減少させることも報告されている¹²⁶。したがって trypsin も mCD14 を切断し sCD14 を産生すると可能性が示唆されていた。しかし、本研究では trypsin により sCD14 は産生されず、発現量は減少した。このことからプロテアーゼによる mCD14 切断は、必ずしも sCD14 産生誘導となるわけではないことが明らかとなり、その他のプロテアーゼに関しても詳細な検討が必要である。

sMD-2 と sCD14 への trypsin の作用を比較すると、sMD-2 は細胞存在下・非存在下どちらの条件においても完全に分解されたのに対して、sCD14 は細胞非存在下では完全に分解されたが、細胞存在下ではおよそ 50%しか発現量が減少しなかった (図 26)。この違いの理由として、細胞存在下では常に多量に sCD14 が供給されるため、trypsin により分解されないタンパク質が検出されている可能性が考えられる。また別の可能性として、sMD-2 の方が sCD14 より trypsin に対する感受性が高いため、すぐに分解され sMD-2 のバンドが検出されない可能性が考えられる。

sMD-2 と同様に、sCD14 は血中に遊離し mCD14 を持たない細胞の LPS 反応性を増加させることで全身に炎症を波及させる作用がある^{100,101}。このことから、trypsin による sMD-2 や sCD14 の分解は炎症の波及を抑制する作用があると考えられる。しかし、trypsin により mMD-2 発現量が変化しなかったため、マクロ

ファージ自身の LPS シグナルに対して sMD-2 の減少は大きな影響を与えないと思われる。一方 CD14 では、sCD14 および mCD14 の発現量がどちらも減少することから、マクロファージにおける trypsin の LPS シグナル抑制作用には CD14 発現量減少作用が MD-2 に比べてより重要であると考えられる。

これまで CD14 は、TLR4 活性化を増強する共受容体としての作用しか持たないと考えられてきた。しかし近年の研究で、CD14 は LPS によって活性化される独自のシグナルを持つことがわかってきた。Zanoni らは、LPS が TLR4 非依存的、CD14 依存的に細胞内 Ca^{2+} を増加させ、NFAT (nuclear factor of activated T cells) を活性化させることを明らかにした¹²⁷。さらに、LPS による CD14 の活性化は TLR4 の内在化に必須であることが報告された¹²⁸⁻¹³⁰。TLR4 内在化は、インターフェロンを産生する TRIF/TRAM 経路やマクロピノサイトーシスの誘導に必須であることから¹²⁸⁻¹³⁰、CD14 は単なる TLR4 の共受容体ではなく、むしろ LPS シグナルの起点となるタンパク質ではないかと考えられるようになってきた。以上より、CD14 発現制御機構は LPS シグナルを理解する上で重要であり、本研究で得られた結果も今後の LPS シグナルに対する研究の一助となるだろう。

3-3 結論

本研究より、急性膵炎の原因となる trypsin がマクロファージにおける LPS シグナルを抑制するという新たな炎症制御機構が明らかとなった。さらに当初の予想に反して、trypsin の抑制作用は PAR 非依存的であり、CD14 や sMD-2 といった LPS 受容体の分解作用を介していることが示唆された。これらの結果は、急性膵炎を含めた複雑な炎症制御機構を理解する一助となるだろう。

そして近年では、LPS シグナルに対する CD14 の役割がより重要であると考えられるようになっている。CD14 に対する様々なプロテアーゼの作用を検討していくことで、プロテアーゼによる CD14 発現調節を介した免疫機構という新たな概念の提唱することができるであろう。

第3章 総合考察

本研究は、広範な分布域を示し、多くの炎症や疾患に関わる PAR2 機能の制御機構と、その代表的なアゴニストである trypsin の炎症における機能を明らかにすることを目的に実験を行った。

第1章では、様々な炎症性刺激によって産生される PGE₂ が PAR2 機能を抑制していることを明らかにした。PGE₂ は PAR2 活性化によっても産生されることから、PAR2 機能に対してネガティブフィードバック的作用を持っていると考えられる。以上の結果は、PAR2 が関与する炎症メカニズムの解明の一助となるものだと考えられる。さらに第2章では、trypsin の異所性活性化が原因となる急性膵炎において、炎症の進行に主要な役割を果たすマクロファージに対する trypsin と PAR2 の影響を検討した。その結果、PAR2 活性化がマクロファージによる炎症性サイトカイン産生を促進する一方で、trypsin は PAR 非依存的に LPS シグナルを抑制する作用を持つことが明らかとなった。この抑制作用は LPS 受容体の分解を介しており、trypsin による新たな炎症制御機構を発見する結果となった。

急性膵炎では血中 PGE₂ 濃度が増加していることが知られている¹³¹。また、呼吸器系組織の上皮細胞や消化管の筋繊維芽細胞では、PAR2 活性化による PGE₂ 産生が報告されていることから^{42-44,132}、急性膵炎においても PAR2 活性化が PGE₂ の供給源となっている可能性がある。さらに、急性膵炎における PGE₂ 産生を阻害することで全身性炎症反応が緩和される^{133,134}。一方、慢性膵炎において、PGE₂ はマクロファージなどの免疫細胞の遊走を促進し、炎症を増悪化させるという報告もある³³。以上より膵炎では呼吸器系疾患とことなり、PGE₂ は主に増悪因子として働いていると考えられているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。

本研究第1章では PGE₂ による PAR2 機能の抑制作用が明らかとなった。急性膵炎において、PAR2 は炎症促進とともに炎症抑制作用も持つことが報告されている^{135,136}。そのため、PGE₂ の PAR2 機能抑制作用が炎症促進に働くか抑制に働くかは組織や細胞によって異なると考えられる。しかし、PGE₂ が持つ炎症促進作用の少なくとも一部は PAR2 の機能抑制を介している可能性が示唆される。また、上記のとおり PAR2 活性化により PGE₂ 産生される可能性があり、PAR2

と PGE₂ は互いにバランスを取りながら炎症のステージを調整している可能性が考えられる (図 29)。

急性膵炎の進行に主要な役割を果たすマクロファージに関して言えば、本研究で得られた結果のとおり PAR2 活性化は炎症性サイトカイン産生を促進する。そのため、マクロファージにおいては、PGE₂ による PAR2 機能抑制作用は炎症抑制的に働くと思われる。マクロファージに作用する PGE₂ として、マクロファージ自身によって産生されオートクラインとして作用するものが考えられる。マクロファージにおいては、trypsin は PGE₂ 産生を誘導しないが¹³⁷、LPS により PGE₂ 産生が促進される¹³⁸。産生された PGE₂ はマクロファージに発現する PAR2 を内在化させることで、PAR2 活性化による炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆される。さらに PAR2 は、TLR4 シグナルを増強することから^{109,110}、PAR2 内在化は LPS シグナルも抑制する可能性がある。つまり、LPS によって誘導された PGE₂ は PAR2 を介して LPS シグナルをネガティブフィードバック的に調節するという新たな免疫制御機構が考えられる。

また上皮細胞や間葉系細胞において、trypsin が PAR2 を活性化することで産生された PGE₂ がパラクライン的にマクロファージに作用する可能性が考えられる^{42-44,132}。つまり、マクロファージに対して trypsin は、LPS 共受容体分解を介した経路のみならず、PAR2 内在化による TLR4 機能阻害を介した LPS シグナル抑制作用を持つことが示唆される (図 30)。さらに本研究より、trypsin は sCD14 や sMD-2 を分解することが明らかとなった。急性膵炎では全身性に炎症が波及することで多臓器不全が生じるため、trypsin による sCD14 や sMD-2 の分解は炎症の波及を抑制することで LPS による炎症抑制作用を担っている可能性がある。

以上の結果から、trypsin は急性膵炎の原因となるが、LPS シグナルに対する作用に限って言えば、LPS 受容体を分解する経路と PGE₂ を介した経路によって炎症抑制作用を持つ可能性が考えられる。これは急性膵炎における trypsin の作用として初めて示唆されたものであり、今後の研究でより詳細に明らかにしていく必要がある。

以上のように、本研究では trypsin による LPS シグナル抑制作用と PGE₂ による PAR2 機能抑制作用が明らかとなった。LPS シグナルの阻害や PAR2 活性化の抑制作用が炎症や病態にどのように関与するかは、対象となる組織や炎症の重篤度など様々な因子によって異なる。今後もプロテアーゼや PAR の病態時にお

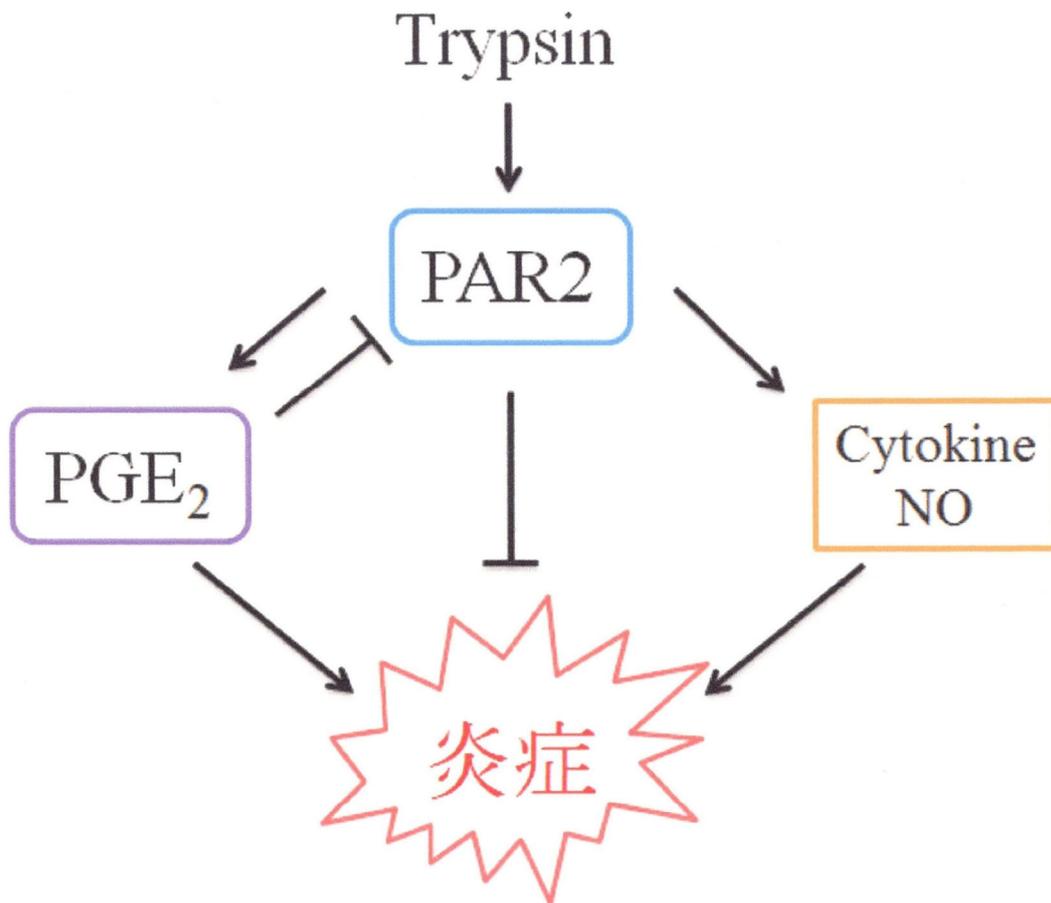


図 29 急性膵炎における PGE₂ と PAR2 の炎症との関係

Trypsin による PAR2 活性化は、炎症抑制作用とともに炎症性サイトカイン産生や PGE₂ 産生作用を介した炎症促進作用を持つ。一方、PGE₂ は PAR2 の内在化を促進することで PAR2 機能を阻害する。この PAR2 と PGE₂ 機能のバランスにより、炎症のステージが制御されている可能性が示唆される。

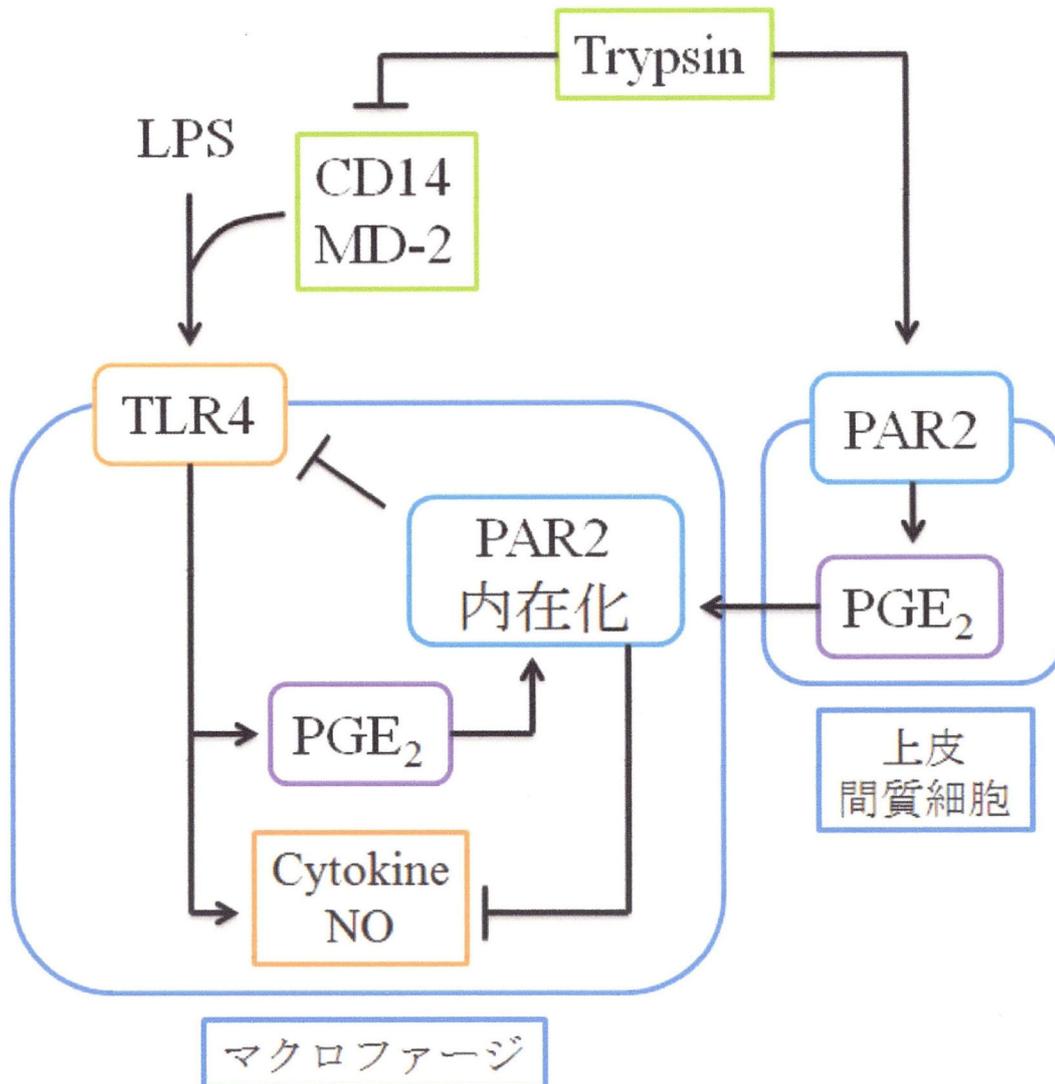


図 30 急性膵炎における trypsin および PGE₂ による LPS シグナル制御機構

マクロファージにおいて、PGE₂ は PAR2 内在化を介して PAR2 活性化による炎症性サイトカインを抑制するとともに TLR4 機能を抑制する。また、trypsin は LPS 受容体分解を介して LPS シグナルを抑制するとともに、周囲の細胞からの PGE₂ 産生を促進することでマクロファージの LPS シグナルを抑制する可能性が考えられる。

ける作用を解明していくことで、急性膵炎のみならず PAR2 や PGE₂ が関与する呼吸器疾患や消化管疾患などのメカニズムの解明につながり、創薬への新たな知見を提供できることとなるだろう。

第4章 実験材料及び方法

4-1 細胞培養

4-1-1 腹腔マクロファージの採取及び培養

6-11 週齢の雄性 ddY マウスおよび C57BL/6J マウス (野生型: WT, PAR2 KO) を使用した。マウスは、ジエチルエーテルで麻酔した後、頸動脈を切断して放血致死させた。腹腔内マクロファージは Naoki Abe らの方法に従い、一部変更して単離した¹³⁹。腹部を 70%エタノールで消毒後、腹壁を露出し、Hanks' balanced salt solution (HBSS) 5~10 ml を 25 ml シリンジを用いて腹腔内投与した。腹部をよくもみ、細胞懸濁液を回収して、1000×g, 4°C で 10 分間遠心した (himac CF 7D2, HITACHI)。上清を除去後、沈渣を 1% Antibiotic-Antimycotic (AA) を含む RPMI1640 で再混濁した。細胞は 96 well プレートに 2.5×10^5 cell/well で播き、5% CO₂, 37°C で 2 時間静置後、RPMI1640 で液交換した。その際、プレートに接着しているものをマクロファージとして使用した。なお動物の飼育ならびに使用にあたっては、山口大学の定める「国立大学法人山口大学における動物使用に関する規則」ならびに「山口大学農学部動物実験指針」に基づいて適正な管理のもと行った。

4-1-2 各種細胞株の培養

本研究では培養細胞株として HEK293T 細胞 (Takara), N2a 細胞 (東京大学 一條秀憲教授より供与), RAW264.7 細胞 (東京大学 一條秀憲教授より供与) および DH82 細胞 (大阪府立大学 東泰孝准教授より供与) を用いた。各種培養細胞株は 1% AA, 10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM 培地) を用い、37°C, 5% CO₂ に保ったインキュベーター (MCO-5AC, SANYO) 内で培養し、各種薬物処置も同様の条件で行った。HEK293T 細胞および N2a 細胞の継代は、培地を除去して HEPES Buffered saline (HBS: HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) で 1 回洗浄した後、Trypsin/EDTA (0.5% trypsin, ethylenediamine tetraacetic acid 5.3mM 含有 HBS) を加えてピペティングすることにより細胞を浮遊させて行った。また、trypsin 処置により分離しにくい細胞である RAW264.7 細胞および DH82 細胞は、培地を除去し HBS

で一回洗浄した後、DMEM 培地を 3-4ml 加え、セルスクレーパーを用いて細胞を浮遊させた後、継代を行った。なお、培養に必要な器具は全て滅菌して用いた。

4-2 培地中の一酸化窒素量の測定

腹腔マクロファージ、RAW264.7 細胞および DH82 細胞を 96 well プレートに 2.5×10^5 cell/well を播種し、細胞接着のための 2 時間静置した後、各種薬品を 24 時間処置した。FBS による trypsin の失活を防ぐため、薬品処置中の溶媒は FBS と AA を含まない DMEM 培地 (DMEM-free 培地) を用いた。

薬品処置後の細培養液中に含まれる NO 量は Griess reagent system (Promega) を用いて測定した。以下、このシステムの実験手技を簡単に説明する。細胞培養液 50 μ l に sulphanilamide 50 μ l を加え 5 分間振とうし、さらに naphthylene-diamine を 50 μ l 加え 10 分間室温で振とうした後に、540 nm の吸光度を micro plate reader で測定した (DTX800, Beckman Coulter)。標準曲線は FBS 除去 DMEM 培地 1 ml に 0.1 M nitrite standard を 1 μ l 加えたものを段階希釈して標準曲線を作成した。

4-3 Western blot 法によるタンパク質発現量測定

4-3-1 タンパク質の抽出

培地を除去した細胞を HBS で洗浄し、lystate buffer を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞懸濁液を常温で数分間静置した後に、4°C、15,000 \times g で 15 分間遠心し、上清をタンパク質サンプルとして使用した。Lysate buffer の組成は以下のとおりである。Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, sodium pyrophosphate 20 mM, Triton X 100 0.01%, Roche Complete 1 tablet/50 ml。なお、得られたサンプルのタンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて Lowry 法により測定した。

また、RAW264.7 細胞により培地中に放出されたタンパク質は、RAW264.7 細胞を 30 分間培養した培地中の総タンパク質を 10% trichloroacetic acid および 0.1% sodium deoxycholate 混和し、on ice で一晩静置後、沈殿をサンプリングした。

4-3-2 Western blot 法

タンパク質サンプル 10-40 μg を SDS ポリアクリルアミドゲル (8-12%) で泳動し分離した後、転写装置を用いて PVDF 膜に転写した (AE6677, ATTO)。PVDF 膜を 2% スキムミルク含有 TBS-T により室温で 30 分間ブロッキング処置した後、一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩処置した。TBS-T の組成は以下のとおりである。2-Amino-2-hydroxymethyl -1, 3-propanediol (Tris-HCl) (pH 7.4) 25 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0.05%。洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間処置し、ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で発光させ撮影した (LAS3000 mini, FUJIFILM)。撮影したバンドは ImageJ を用いて測定し数値化した (National Institutes of Health)。PP2A C および tubulin は loading control として用いた。

4-4 Real-time RT PCR 法による mRNA 発現量測定

4-4-1 mRNA の抽出および逆転写

培地を除去した後に細胞を HBS で洗浄し、TRIzol reagent (Invitrogen) を 500 μl 加えて可溶化した。数回ピペッティングした後、得られた細胞懸濁液を 1.5ml チューブに移し、室温で 5 分間静置した。クロロホルムを 200 μl 加え、十分に混和した後、2-3 分間室温で静置した。その後、4°C, 12,000 $\times\text{g}$ で 15 分間遠心し、上清に RNase free 超純水とクロロホルムをそれぞれ 200 μl 加え 2-3 分間室温で静置した。さらに 12,000 $\times\text{g}$ で 15 分間遠心し、上清にイソプロパノールを 500 μl 加えボルテックスした。10 分間室温で静置した後、4°C, 12,000 $\times\text{g}$ で 15 分間遠心した。その後、直ちに上清を捨て、エタノールで洗浄した後、4°C, 7,500 $\times\text{g}$ で 5 分間遠心した。そして、エタノールを捨て適度に乾燥させたのち、RNase free 超純水でペレットを溶解した。なお、total RNA 量は Nano Drop を用いて定量した (ND-1000, Nano Drop Technologies)。Total RNA の逆転写は Reverse Transcription kit を用いて行った (QIAGEN)。Total RNA 0.25 μg に対し、gDNA wipeout buffer を 0.5 μl 加え、反応液が 3.5 μl になるよう RNase free 超純水を加えた。ドライバスで 42°C, 2 分間処置した後 (Dry Bath Incubator, Major Science), Primer Mix, 5x RT buffer, Reverse Transcriptase をそれぞれ 0.5 μl 加え、総量を 5

μl とし、42°C、15 分間反応させた後、95°C、2 分間にて酵素を失活させることにより cDNA を作成した。得られた cDNA は使用まで-20 度で保存した。

4-4-2 Real-time PCR 法

上記で得られた cDNA を含む反応液 0.2 μl に SYBR Green Master Mix (5 μl) (QIAGEN), PCR Forward Primer (2.5μM : 1.2 μl), PCR Reverse Primer (2.5μM : 1.2 μl), dH₂O (2.4 μl) を加え計 5 μl とし、StepOne Software を用いて PCR を行った (Applied Biosystems)。反応条件は 95°C 15 分間で Denature した後、94°C、15 秒間、60°C、30 秒間、72°C、30 秒間を 40 回繰り返し増幅した。Melt curve stage では 95°C、15 秒間、60°C で 1 分間の後、0.3°C ずつ段階的に 95 度まで上昇させた。なお、用いた primer 配列は表 3 に示すとおりである。各種 mRNA 発現量は β-actin を loading control として相対的に評価した。

4-5 昆虫細胞を用いた組換えヒト CD14 タンパク質の生産

カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) P6E 株¹⁴⁰ およびカイコ培養細胞株 BmN4¹⁴¹ を用いたバキュロウイルス遺伝子発現ベクター系を用いて組換えヒト CD14 タンパク質を作成した。

Human CD14 (transcript variant 1) cDNA (accession no. NM_000591.3 : 山口大学 清水隆准教授より供与) を、ExTaq polymerase (Takara) を用いた PCR で増幅した。この時、N 末端のシグナルペプチドは Flag タグに、C 末端の膜結合ドメインは His タグにそれぞれ置換した。PCR に用いたプライマーは次のとおりである : Forward (5'-ATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGACCACGCCAG AACCTTGTGAGCTGGACGATG-3'), Reverse (5'-TTAATGATGATGATGATGATGCAGCACCAGGGTTCCTCCGACACCCACCCGACAG-3)。

得られた Flag-CD14-His cDNA を pCR2.1 vector (Invitrogen) に挿入した。シーケンスを確認後、制限酵素 *EcoRV* および *SacI* により目的の cDNA を含む断片を切り出し、トランスファーベクタープラスミド pBm14 (Baculotechnologies) の強力な BmNPV ポリヘドリンプロモーターの直後に挿入して、組換えプラスミド pBm14/Flag-CD14-His を作製した。この pBm14/Flag-CD14-His (5 μg) を BmNPV DNA (1 μg) とともに FuGENE HD (8 μl; Roche) を用いて、BmN4 細胞 (5 × 10⁵) にコトランスフェクションし、室温で 4 時間放置後、トランスフェ

表 3. Real-Time PCR に用いた primer セット

β-actin	Forward	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C
	Reverse	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C
iNOS	Forward	TCC TCA CTG GGA CAG CAC AGA ATG
	Reverse	GTG TCA TGC AAA ATC TCT CCA CTG CC
IL-1β	Forward	GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT
	Reverse	CCT CAT CCT GGA AGG TCC AC
IL-6	Forward	CAC GGC CTT CCC TAC TTC AC
	Reverse	TGC AAG TGC ATC ATC GTT GT

クション液を 10% FBS (JRH Biosciences) を含むグレース昆虫細胞培養培地 (Invitrogen) と交換し、27 °C で培養した。培養 7 日後に培養上清を回収し、BmN4 細胞を用いたプラーク法により、多角体を生産しない組換えウイルス (vBmFlag-CD14-His) を純化し、ウイルスゲノム DNA の配列決定により、目的の cDNA の挿入を確認した。純化した vBmFlag-CD14-His は BmN4 細胞でさらに増殖され、その培養上清に含まれるウイルスのタイターをプラーク法で検定後、感染用ウイルスストックとして -80 °C で保存した。

Flag-CD14-His タンパク質を生産するために、vBmFlag-CD14-His ストック液を BmN4 細胞に感染多重度 5 (PFU/cell) で感染させ、10%FBS を含むグレース昆虫細胞培養培地を用いて、27 °C で培養した。培養 7 日後に低速遠心で培養上清と細胞を分離し、さらに超遠心で培養上清からウイルス粒子を除去することにより、感染末期に細胞から培地中に放出された Flag-CD14-His タンパク質を含む超遠心上清を回収した。

その後、Vivaspin20 (Vivascience) を用いておよそ 20 倍に濃縮し、溶媒を equilibration buffer に置換した。なお、equilibration buffer の組成は以下のとおりである：50 mM MOPS; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole; 10% glycerol; Roche complete protease inhibitor mixture, 1 tablet/30 ml; pH 7.4。濃縮した Flag-CD14-His タンパク質を含むサンプル 400 μ l あたりに 20 μ l の Talon metal affinity resin (Takara) を加え、一晩 4 °C で処置することで Flag-CD14-His タンパク質を精製した。

4-6 プラスミド作成と細胞へのトランスフェクション

4-6-1 プラスミドの産生

E.coli Competent Cells 10 μ l (DH5 α , Takara) を on ice で解凍した後、各種プラスミドを 0.5 μ l 加え、on ice で 30 分間静置した。ドライバスにより 42°C で 45 秒間ヒートショックを加えた後、on ice で 2 分間静置し、100 μ l LB Broth 培地 (Sigma) を加え、37°C で 30 分間振とう培養した (IK100J, Yamato)。このうち 10 μ l を LB agar プレート培地 (ampicillin 100 μ g/ml 添加; Sigma) に播種し 37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し、ガラス管に入った LB Broth 培地 (ampicillin 100 μ g/ml 添加) 5 ml に加え 37°C、180 r.p.m で一晩振とう培養した

(BioShaker BR-22FP, Taitec)。培養液を 11.5 ml 丸底チューブに移し、室温にて 3,000 r.p.m で 10 分間遠心し (Himac CR20, HITACHI), 上清を除いた後に Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。なお必要な器具は滅菌して用いた。

4-6-2 プラスミドの細胞へのトランスフェクション

N2a 細胞は 24 well プレートに 1well あたり 2.5×10^4 個を播種して一晩静置した。各プラスミド 0.5 μg を DMEM-free 培地へ添加した後, Arrest-In 2.5 μl を含む DMEM-free 培地 47.5 μl 溶液と混合して 20 分間静置した。その後, 150 μl の DMEM-free 培地を加え 250 μl とし, 細胞に処置した。6 時間後に 20% FBS 含有・AA 無添加 DMEM を 250 μl 加え 18 時間培養した。

使用したプラスミドは次のとおりである。pcDNA3.1 Human PAR2 (Flag-PAR2; N 末端に Flag tag 付加, C 末端に HA tag 付加: University of California, Dr. Nigel W Bunnett より供与)。pBJKS (+) Human PAR-4 (Flag-PAR4; N 末端に Flag tag 付加: University of California, Dr. Shaun R. Coughlin より供与)。

4-7 免疫組織染色法による Flag-PAR2 および Flag-PAR4 分布の観察

4-7-1 免疫組織染色法

Flag-PAR2 もしくは Flag-PAR4 をトランスフェクションした HEK293T 細胞は, trypsin により N 末端の Flag タグが切断されることを防ぐため, Trypsin / EDTA を使用せずピペティングにより浮遊させた。分離した細胞は microscope cover glass (Fisherbrand) 上に播種し, DMEM-free 培地中で 4 時間静置後に各種薬品を処置した。その後培地を除去し, 4% paraformaldehyde 含有 TBS を用いて 4°C, 20 分間固定を行った。TBS-T (0.05% Tween 20 含有 TBS) で洗浄して, 0.2% Triton-X100 含有 TBS-T で 10 秒間脱膜化を行った。その後, 3% bovine serum albumin fraction V (BSA) 含有 TBS-T で, 室温で 30 分間振とう (Mini Shaker 3D, LMS) しブロッキングを行った。一次抗体として anti-Flag (1:400) を加えて 4°C で一晩遮光して振とうした。TBS-T で洗浄後, 二次抗体として Alexa Flour 488 (1:5000) を加えて, 遮光して 60 分間振とうした。標本は aqueous permanent

mounting medium (Dbiosys) を用いて micro slide glass (Matunami) に封入して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した (LSM510, Carl Zeiss)。

4-7-2 Flag タグを付加した PAR の細胞内分布評価法

Flag-PAR2 および Flag-PAR4 の細胞内分布評価法は、細胞膜に局在しているもの (Localized cell surface) , 細胞膜および細胞内の両方に分布しているもの (Partially internalized) , 細胞内のみで局在しているもの (Completely internalized) に分類した (図 31) 。1 標本につき 3 視野すべての細胞 (50–300 個) をすべて分類し、全体の割合として評価した。

4-8 フローサイトメトリー法による細胞表面 PAR2 の評価

4-8-1 Flag-PAR2-mCherry を恒常的に過剰発現する HEK293T 細胞の作成

pLV-mcC は、pLV-Venus¹⁴² の seYFP (Venus) を mCherry に、C 末端のマルチクローニングサイト (BamHI, NotI, EcoRI) を N 末端に置換することで作成した。N 末端に Flag が付加された PAR2 cDNA は Flag-PAR2 から PCR で増幅し、pLV-mcC の BamHI/EcoRI サイトに挿入した。

ウイルスベクターの作成には HEK293T 細胞を用いた。1×10⁶ 個の HEK293T 細胞を 60mm ディッシュに播き、翌日 pLV-mcC (3 μg) , packaging plasmid (psPAX2 ; 2.3 μg) , VSVG coat protein plasmid (pDM2.G ; 1.3μg) と 10 μl の lipofectamine LTX (Invitrogen) を 1 ml の Opti-MEM 中で混合し 30 分間静置した。48 時間培養した後にウイルスを含む培地を 0.22 μm のフィルター (Millipore) でろ過しウイルスベクターを分離した。

作成したウイルスベクターを HEK293T 細胞に 8 時間感染させることで、Flag-PAR2-mCherry を恒常的に過剰発現する HEK293T 細胞 (Flag-PAR2-mc 細胞) を作成した。

4-8-2 フローサイトメトリー法

Flag-PAR2-mc 細胞は 6 well プレートに 1well あたり 1.5×10⁶ 個を播種し、一晚培養した後、PGE₂ (30 μM) を 30 分間処置した。処置した細胞は 1% sodium azide

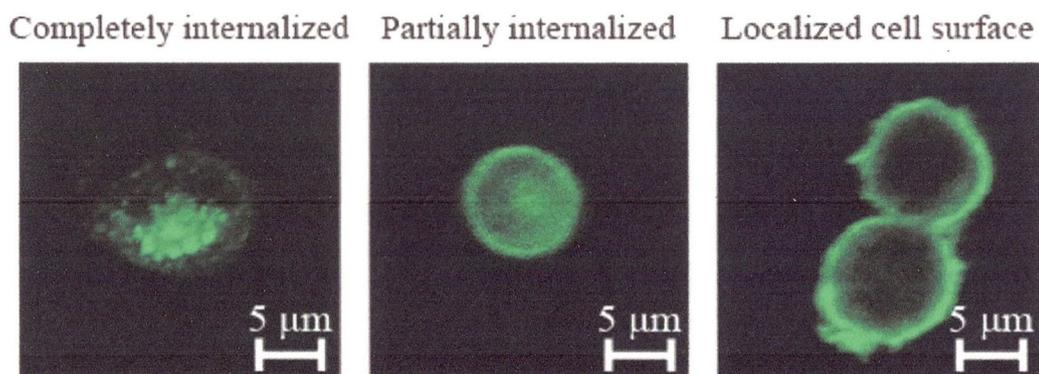


図 31 PAR の細胞内分布評価法

各 PAR が細胞膜にのみ局在し細胞膜の蛍光を発するもの (Localized cell surface; 左), 細胞膜および細胞内の両方に分布し, 全体が蛍光を発する (Partially internalized), 細胞内のみ局在し, 細胞膜に傾向が認められないもの (Completely internalized) に分類した。

を含む PBS-EDTA (0.5%) により浮遊させた。浮遊させた細胞をピペッティングした後、96 well プレートに 2×10^5 cell/well 播種した。4°C, 6,000×g で5分間遠心後、2% FBS および 1% sodium azide を含む PBS で洗浄し、各種抗体を on ice で30分処置した。なお、PBSの組成は次のとおりである：NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 1.47 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, 2% FBS, 0.01% sodium azide, pH7.4。

4-9 使用薬品

本研究では以下の薬物を使用した。rabbit anti- MD-2 epitope antibody (AbD Serotec) , chicken anti-HA epitope antibody (Aveslab) , rabbit anti-iNOS antibody, rabbit PP2A C subunit antibody (BD Biosciences) , SFLLR-NH₂ (PAR1-AP) , SLIGRL- NH₂ (PAR2-AP) (Bechem) , anti-phospho-ERK p44/42 antibody, Alexa 488 rabbit anti-Flag antibody, Alexa 488 rabbit isotype control (Cell signaling) , sodium orthovanadate (Na_3VO_4) (ICN Biomedicals) , Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) , Alexa fluor 488 goat anti-chicken IgG (H+L) , Alexa fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) , Alexa fluor 594 goat anti-chicken IgG (H+L) , antibiotic-antimycotic, DEPC Treated Water Pyrogen-free, Dulbecco's modified Eagle's solution, Hanks' balanced salt solution, Medium 199 Earle's liquid, UltraPure™ Agarose (Invitrogen) , glycine (aminoacetic acid) (Nacalai tesque) , Sulphanilamide, naphthylenediamine, 0.1 μM nitrite standard Promega) , bovine serum albumin fraction V, complete EDTA-free (protease inhibitor cocktail) , (Roche) rabbit anti-TLR4 antibody (Santa Cruz) , Lipopolysaccharide from Escherichia coli, Soybean trypsin inhibitor, chicken egg white trypsin inhibitor, AH-6809, rabbit anti-Flag antibody, triton X-100, 2-mercaptoethano (SIGMA) , Arrest-In Transfection Reagent rabbit, anti- tubulin antibody (Thermo) , rabbit anti-CD14 antibody (Trevigen, ONO-AE3-208 (小野薬品工業株式会社) , GYPGKF- NH₂ (PAR4-AP) (扶桑薬品工業株式会社) 。その他の試薬は和光純薬工業株式会社から購入した。

4-10 統計処理

2 群を越える群間での有意差検定には one-way ANOVA を用いた後、Mann–Whitney rank sum test もしくは Student's t test を行い、危険率 (P) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

引用文献

- 1 Southan, C. A genomic perspective on human proteases. *FEBS Lett* 498, 214-218, doi:S0014-5793(01)02490-5 [pii] (2001).
- 2 Déry, O., Corvera, C., Steinhoff, M. & Bunnett, N. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274, C1429-1452 (1998).
- 3 Sekiguchi, F. [Development of agonists/antagonists for protease-activated receptors (PARs) and the possible therapeutic application to gastrointestinal diseases]. *Yakugaku Zasshi* 125, 491-498, doi:JST.JSTAGE/yakushi/125.491 [pii] (2005).
- 4 Saito, T. & Bunnett, N. Protease-activated receptors: regulation of neuronal function. *Neuromolecular Med* 7, 79-99, doi:NMM:7:1-2:079 [pii] 10.1385/NMM:7:1-2:079 (2005).
- 5 Soh, U., Dores, M., Chen, B. & Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* 160, 191-203, doi:BPH705 [pii] 10.1111/j.1476-5381.2010.00705.x (2010).
- 6 Shahzad, K. & Isermann, B. The evolving plasticity of coagulation protease-dependent cytoprotective signalling. *Hamostaseologie* 31, 179-184, doi:1162 [pii] 10.5482/ha-1162 (2011).
- 7 Vretenbrant, K., Ramström, S., Bjerke, M. & Lindahl, T. L. Platelet activation via PAR4 is involved in the initiation of thrombin generation and in clot elasticity development. *Thromb Haemost* 97, 417-424, doi:07030417 [pii] (2007).
- 8 Nakanishi-Matsui, M. et al. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404, 609-613, doi:10.1038/35007085 (2000).
- 9 Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells to cause inflammation and pain. *Semin Thromb Hemost* 32 Suppl 1, 39-48, doi:10.1055/s-2006-939553 (2006).

- 10 Holzhausen, M., Spolidorio, L. C. & Vergnolle, N. Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, 177-180, doi:S0074-02762005000900030 [pii] /S0074-02762005000900030 (2005).
- 11 Lee, K. E. et al. Regulation of German cockroach extract-induced IL-8 expression in human airway epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 37, 1364-1373, doi:CEA2797 [pii] 10.1111/j.1365-2222.2007.02797.x (2007).
- 12 Cocks, T. M. & Moffatt, J. D. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14, 183-191, doi:S1094-5539(01)90285-8 [pii] 10.1006/pupt.2001.0285 (2001).
- 13 Henry, P. J. The protease-activated receptor2 (PAR2)-prostaglandin E2-prostanoid EP receptor axis: a potential bronchoprotective unit in the respiratory tract? *Eur J Pharmacol* 533, 156-170, doi:S0014-2999(05)01380-4 [pii] 10.1016/j.ejphar.2005.12.051 (2006).
- 14 Ma, Z. H. et al. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res* 54, 522-527, doi:10.1007/s00011-005-1388-z (2005).
- 15 Shrivastava, P. & Bhatia, M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 16, 3995-4002 (2010).
- 16 Laukkarinen, J. M., Weiss, E. R., van Acker, G. J., Steer, M. L. & Perides, G. Protease-activated receptor-2 exerts contrasting model-specific effects on acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem* 283, 20703-20712, doi:M801779200 [pii] 10.1074/jbc.M801779200 (2008).
- 17 Serhan, C. & Levy, B. Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8609-8611, doi:1733589100 [pii]

- 10.1073/pnas.1733589100 (2003).
- 18 Smith, W. et al. The biosynthesis and actions of prostaglandins in the renal collecting tubule and thick ascending limb. *Adv Exp Med Biol* 259, 131-147 (1989).
- 19 Asokanathan, N. et al. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 168, 3577-3585 (2002).
- 20 Das, S., Rafter, J., Kim, K., Gygi, S. & Cho, W. Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A(2) activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278, 41431-41442, doi:M304897200 [pii]
- 10.1074/jbc.M304897200 (2003).
- 21 Smith, W., DeWitt, D. & Garavito, R. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69, 145-182, doi:69/1/145 [pii]
- 10.1146/annurev.biochem.69.1.145 (2000).
- 22 Kudo, I. & Murakami, M. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 38, 633-638 (2005).
- 23 Toh, H., Ichikawa, A. & Narumiya, S. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett* 361, 17-21, doi:0014-5793(95)00129-W [pii] (1995).
- 24 Baratelli, F. E. et al. Prostaglandin E2-dependent enhancement of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 production limits dendritic cell migration through extracellular matrix. *J Immunol* 173, 5458-5466, doi:173/9/5458 [pii] (2004).
- 25 Nataraj, C. et al. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 108, 1229-1235, doi:10.1172/JCI13640 (2001).
- 26 Aronoff, D. M., Canetti, C. & Peters-Golden, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 173, 559-565 (2004).
- 27 Peacock, C. D., Misso, N. L., Watkins, D. N. & Thompson, P. J. PGE 2 and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate prolong eosinophil survival in

- vitro. *J Allergy Clin Immunol* 104, 153-162, doi:S0091674999004005 [pii] (1999).
- 28 Chinen, T. et al. Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance. *Nat Commun* 2, 190, doi:ncomms1181 [pii] 10.1038/ncomms1181 (2011).
- 29 Matsuoka, T. & Narumiya, S. Prostaglandin receptor signaling in disease. *ScientificWorldJournal* 7, 1329-1347, doi:10.1100/tsw.2007.182 (2007).
- 30 Kawabata, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol Pharm Bull* 34, 1170-1173, doi:JST.JSTAGE/bpb/34.1170 [pii] (2011).
- 31 Giuliano, F. & Warner, T. D. Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 1001-1006, doi:10.1124/jpet.102.041244 (2002).
- 32 Williams, T. J. & Peck, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* 270, 530-532 (1977).
- 33 Reding, T. et al. A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis. *Gut* 55, 1165-1173, doi:gut.2005.077925 [pii] 10.1136/gut.2005.077925 (2006).
- 34 Barnes, J., Singh, S. & Gomes, A. Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. *Mol Cell Biochem* 263, 227-239 (2004).
- 35 Cheung, W., D'Andrea, M., Andrade-Gordon, P. & Damiano, B. Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 3014-3024 (1999).
- 36 Pape, R., Rauch, B., Rosenkranz, A., Kaber, G. & Schrör, K. Transcriptional inhibition of protease-activated receptor-1 expression by prostacyclin in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 534-540, doi:ATVBAHA.107.159483 [pii] 10.1161/ATVBAHA.107.159483 (2008).
- 37 Sower, L., Froelich, C., Carney, D., Fenton, J. n. & Klimpel, G. Thrombin induces IL-6 production in fibroblasts and epithelial cells. Evidence for the

- involvement of the seven-transmembrane domain (STD) receptor for alpha-thrombin. *J Immunol* 155, 895-901 (1995).
- 38 Ludwicka-Bradley, A. et al. Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibroblasts via cleavage of proteolytically activated receptor-I and protein kinase C-gamma activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 235-243 (2000).
- 39 Sekiguchi, F. et al. Delayed production of arachidonic acid contributes to the delay of proteinase-activated receptor-1 (PAR1)-triggered prostaglandin E2 release in rat gastric epithelial RGM1 cells. *J Cell Biochem* 112, 909-915, doi:10.1002/jcb.23005 (2011).
- 40 Peters, T. & Henry, P. J. Protease-activated receptors and prostaglandins in inflammatory lung disease. *Br J Pharmacol* 158, 1017-1033, doi:BPH449 [pii] 10.1111/j.1476-5381.2009.00449.x (2009).
- 41 Sokolova, E., Hartig, R. & Reiser, G. Downregulation of protease-activated receptor-1 in human lung fibroblasts is specifically mediated by the prostaglandin E receptor EP2 through cAMP elevation and protein kinase A. *FEBS J* 275, 3669-3679, doi:EJB6511 [pii] 10.1111/j.1742-4658.2008.06511.x (2008).
- 42 Moriyuki, K., Sekiguchi, F., Matsubara, K., Nishikawa, H. & Kawabata, A. Proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E(2) release, but not cyclooxygenase-2 upregulation, requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt / nuclear factor-kappaB pathway in human alveolar epithelial cells. *J Pharmacol Sci* 111, 269-275, doi:JST.JSTAGE/jphs/09155FP [pii] (2009).
- 43 Nagataki, M., Moriyuki, K., Sekiguchi, F. & Kawabata, A. Evidence that PAR2-triggered prostaglandin E2 (PGE2) formation involves the ERK-cytosolic phospholipase A2-COX-1-microsomal PGE synthase-1 cascade in human lung epithelial cells. *Cell Biochem Funct* 26, 279-282, doi:10.1002/cbf.1434 (2008).
- 44 Moriyuki, K., Sekiguchi, F., Matsubara, K., Nishikawa, H. & Kawabata, A. Curcumin Inhibits the proteinase-activated receptor-2-triggered

- prostaglandin E2 production by suppressing cyclooxygenase-2 upregulation and Akt-dependent activation of nuclear factor- κ B in human lung epithelial cells. *J Pharmacol Sci* 114, 225-229, doi:JST.JSTAGE/jphs/10126SC [pii] (2010).
- 45 Schrör, K. et al. Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins. *Thromb Haemost* 103, 884-890, doi:09-09-0627 [pii] 10.1160/TH09-09-0627 (2010).
- 46 Ricks, T. & Trejo, J. Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *J Biol Chem* 284, 34444-34457, doi:M109.048942 [pii] 10.1074/jbc.M109.048942 (2009).
- 47 Arora, P., Ricks, T. K. & Trejo, J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *J Cell Sci* 120, 921-928, doi:120/6/921 [pii] 10.1242/jcs.03409 (2007).
- 48 Yen, J. H., Kocieda, V. P., Jing, H. & Ganea, D. Prostaglandin E2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in dendritic cells through two independent signaling pathways leading to activator protein 1 (AP-1) activation. *J Biol Chem* 286, 38913-38923, doi:M111.252932 [pii] 10.1074/jbc.M111.252932 (2011).
- 49 Tressel, S. L. et al. A matrix metalloprotease-PAR1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol Med* 3, 370-384, doi:10.1002/emmm.201100145 (2011).
- 50 Zoudilova, M. et al. Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *J Biol Chem* 282, 20634-20646, doi:M701391200 [pii] 10.1074/jbc.M701391200 (2007).
- 51 Zoudilova, M. et al. beta-Arrestins scaffold cofilin with chronophin to direct localized actin filament severing and membrane protrusions downstream of

- protease-activated receptor-2. *J Biol Chem* 285, 14318-14329, doi:M109.055806 [pii]
10.1074/jbc.M109.055806 (2010).
- 52 Liu, R. et al. Palmitoylation Regulates Intracellular Trafficking of $\beta(2)$ Adrenergic Receptor/Arrestin/Phosphodiesterase 4D Complexes in Cardiomyocytes. *PLoS One* 7, e42658, doi:PONE-D-12-10557 [pii]
10.1371/journal.pone.0042658 (2012).
- 53 Nobles, K. N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T. G. & Lefkowitz, R. J. The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J Biol Chem* 282, 21370-21381, doi:M611483200 [pii]
10.1074/jbc.M611483200 (2007).
- 54 Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465 (2002).
- 55 Li, Y. J. et al. Prostaglandin E₂ inhibits human lung fibroblast chemotaxis through disparate actions on different E-prostanoid receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 99-107, doi:2009-0163OC [pii]
10.1165/rcmb.2009-0163OC (2011).
- 56 Huang, S., Wettlaufer, S. H., Hogaboam, C., Aronoff, D. M. & Peters-Golden, M. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L405-413, doi:00232.2006 [pii]
10.1152/ajplung.00232.2006 (2007).
- 57 Feng, C., Beller, E. M., Bagga, S. & Boyce, J. A. Human mast cells express multiple EP receptors for prostaglandin E2 that differentially modulate activation responses. *Blood* 107, 3243-3250, doi:2005-07-2772 [pii]
10.1182/blood-2005-07-2772 (2006).

- 58 Hartney, J. M. et al. Prostaglandin E2 protects lower airways against bronchoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L105-113, doi:00221.2005 [pii]
10.1152/ajplung.00221.2005 (2006).
- 59 Branham, M. T. et al. Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J Biol Chem* 284, 24825-24839, doi:M109.015362 [pii]
10.1074/jbc.M109.015362 (2009).
- 60 Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A. & Planells-Cases, R. Agonist- and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *J Biol Chem* 287, 19462-19471, doi:M111.289751 [pii]
10.1074/jbc.M111.289751 (2012).
- 61 Kumari, S. S., Varadaraj, M., Yerramilli, V. S., Menon, A. G. & Varadaraj, K. Spatial expression of aquaporin 5 in mammalian cornea and lens, and regulation of its localization by phosphokinase A. *Mol Vis* 18, 957-967 (2012).
- 62 Zucchetti, A. E. et al. Prevention of estradiol 17beta-D-glucuronide-induced canalicular transporter internalization by hormonal modulation of cAMP in rat hepatocytes. *Mol Biol Cell* 22, 3902-3915, doi:mbc.E11-01-0047 [pii]
10.1091/mbc.E11-01-0047 (2011).
- 63 Tanaka, Y., Sekiguchi, F., Hong, H. & Kawabata, A. PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 622-626, doi:S0006-291X(08)01993-1 [pii]
10.1016/j.bbrc.2008.10.018 (2008).
- 64 Shi, J. et al. Induction of IL-6 and IL-8 by house dust mite allergen Der p1 in cultured human nasal epithelial cells is associated with PAR/PI3K/NFkappaB signaling. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 72, 256-265, doi:000312687 [pii]
10.1159/000312687 (2010).

- 65 Kang, O. H. et al. Trypsin induces tumour necrosis factor- α secretion from a human leukemic mast cell line. *Cell Biochem Funct* 21, 161-167, doi:10.1002/cbf.1014 (2003).
- 66 Schmidlin, F. et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol* 169, 5315-5321 (2002).
- 67 Noorbakhsh, F. et al. Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med* 203, 425-435, doi:jem.20052148 [pii] 10.1084/jem.20052148 (2006).
- 68 Rothmeier, A. S. & Ruf, W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol* 34, 133-149, doi:10.1007/s00281-011-0289-1 (2012).
- 69 Nguyen, T. D. et al. Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2. *J Clin Invest* 103, 261-269, doi:10.1172/JCI2539 (1999).
- 70 Kawabata, A., Nishikawa, H., Kuroda, R., Kawai, K. & Hollenberg, M. D. Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): regulation of salivary and pancreatic exocrine secretion in vivo in rats and mice. *Br J Pharmacol* 129, 1808-1814, doi:10.1038/sj.bjp.0703274 (2000).
- 71 Knight, D. A. et al. Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108, 797-803, doi:S0091-6749(01)82736-6 [pii] 10.1067/mai.2001.119025 (2001).
- 72 Sokolova, E., Grishina, Z., Bühling, F., Welte, T. & Reiser, G. Protease-activated receptor-1 in human lung fibroblasts mediates a negative feedback downregulation via prostaglandin E2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L793-802, doi:00343.2004 [pii] 10.1152/ajplung.00343.2004 (2005).

- 73 Boitano, S. et al. *Alternaria alternata* serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L605-614, doi:ajplung.00359.2010 [pii] 10.1152/ajplung.00359.2010 (2011).
- 74 Gatti, R. et al. Protease-activated receptor-2 activation exaggerates TRPV1-mediated cough in guinea pigs. *J Appl Physiol* 101, 506-511, doi:01558.2005 [pii] 10.1152/jappphysiol.01558.2005 (2006).
- 75 De Campo, B. A. & Henry, P. J. Stimulation of protease-activated receptor-2 inhibits airway eosinophilia, hyperresponsiveness and bronchoconstriction in a murine model of allergic inflammation. *Br J Pharmacol* 144, 1100-1108, doi:0706150 [pii] 10.1038/sj.bjp.0706150 (2005).
- 76 White, E. S. et al. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast migration by E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in PTEN activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 135-141, doi:2004-0126OC [pii] 10.1165/rcmb.2004-0126OC (2005).
- 77 Moore, B. B. et al. Bleomycin-induced E prostanoid receptor changes alter fibroblast responses to prostaglandin E2. *J Immunol* 174, 5644-5649, doi:174/9/5644 [pii] (2005).
- 78 Sastre, B. et al. PGE(2) decreases muscle cell proliferation in patients with non-asthmatic eosinophilic bronchitis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 95, 11-18, doi:S1098-8823(11)00025-6 [pii] 10.1016/j.prostaglandins.2011.03.002 (2011).
- 79 Petrov, M. S., Shanbhag, S., Chakraborty, M., Phillips, A. R. & Windsor, J. A. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 139, 813-820, doi:S0016-5085(10)00864-4 [pii] 10.1053/j.gastro.2010.06.010 (2010).

- 80 Pandol, S. J., Saluja, A. K., Imrie, C. W. & Banks, P. A. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 132, 1127-1151, doi:S0016-5085(07)00309-5 [pii] 10.1053/j.gastro.2007.01.055 (2007).
- 81 Kingsnorth, A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 40, 1-4 (1997).
- 82 Sakai, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 124, 725-736, doi:S0016508502159774 [pii] 10.1053/gast.2003.50099 (2003).
- 83 Saeki, K. et al. CCL2-induced migration and SOCS3-mediated activation of macrophages are involved in cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 142, 1010-1020.e1019, doi:S0016-5085(12)00025-X [pii] 10.1053/j.gastro.2011.12.054 (2012).
- 84 Matej, R., Housa, D. & Olejár, T. Acute pancreatitis: proteinase-activated receptor-2 as Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Physiol Res* 55, 467-474, doi:798 [pii] (2006).
- 85 Olejár, T., Matej, R., Zadinová, M. & Poucková, P. Expression of proteinase-activated receptor 2 during taurocholate-induced acute pancreatic lesion development in Wistar rats. *Int J Gastrointest Cancer* 30, 113-121, doi:IJGC:30:3:113 [pii] 10.1385/IJGC:30:3:113 (2001).
- 86 Mari, B. et al. Thrombin and trypsin-induced Ca(2+) mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB J* 10, 309-316 (1996).
- 87 Howells, G. L. et al. Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J Cell Sci* 110 (Pt 7), 881-887 (1997).
- 88 Moraes, T. J. et al. Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonas infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L368-377, doi:00036.2007 [pii] 10.1152/ajplung.00036.2007 (2008).

- 89 Pan, S. L. et al. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in PAR2-induced endothelial IL-8 production and leukocyte adhesion. *Shock* 30, 496-502, doi:10.1097/SHK.0b013e3181673233 (2008).
- 90 Shpacovitch, V. M. et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J Leukoc Biol* 76, 388-398, doi:jl.0503221 [pii] 10.1189/jl.0503221 (2004).
- 91 Zweigner, J., Schumann, R. R. & Weber, J. R. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect* 8, 946-952, doi:S1286-4579(05)00374-6 [pii] 10.1016/j.micinf.2005.10.006 (2006).
- 92 Yu, B. & Wright, S. D. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem* 271, 4100-4105 (1996).
- 93 Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433 (1990).
- 94 Jerala, R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* 297, 353-363, doi:S1438-4221(07)00068-9 [pii] 10.1016/j.ijmm.2007.04.001 (2007).
- 95 Haziot, A. et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4, 407-414, doi:S1074-7613(00)80254-X [pii] (1996).
- 96 Kitchens, R. L. & Thompson, P. A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res* 11, 225-229, doi:10.1179/096805105X46565 (2005).
- 97 Lazarov, S., Balutsov, M. & Ianev, E. [The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock]. *Vutr Boles* 32, 33-40 (2000).

- 98 Senft, A. P., Korfhagen, T. R., Whitsett, J. A., Shapiro, S. D. & LeVine, A. M. Surfactant protein-D regulates soluble CD14 through matrix metalloproteinase-12. *J Immunol* 174, 4953-4959, doi:174/8/4953 [pii] (2005).
- 99 Stelter, F. et al. The myeloid differentiation antigen CD14 is N- and O-glycosylated. Contribution of N-linked glycosylation to different soluble CD14 isoforms. *Eur J Biochem* 236, 457-464 (1996).
- 100 Antal-Szalmás, P. Evaluation of CD14 in host defence. *Eur J Clin Invest* 30, 167-179, doi:eci610 [pii] (2000).
- 101 Loppnow, H. et al. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun* 63, 1020-1026 (1995).
- 102 Viriyakosol, S., Tobias, P. S., Kitchens, R. L. & Kirkland, T. N. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276, 38044-38051, doi:M105228200 [pii] 10.1074/jbc.M105228200 (2001).
- 103 Re, F. & Strominger, J. L. Monomeric recombinant MD-2 binds toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. *J Biol Chem* 277, 23427-23432, doi:M202554200 [pii] 10.1074/jbc.M202554200 (2002).
- 104 Shimazu, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-1782 (1999).
- 105 Schneider, K., Benedict, C. A. & Ware, C. F. A TRAFfic cop for host defense. *Nat Immunol* 7, 15-16, doi:ni0106-15 [pii] 10.1038/ni0106-15 (2006).
- 106 Rossol, M. et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 31, 379-446, doi:47d4cd1f0e2c889b,5453e7eb10564e78 [pii] (2011).
- 107 Bode, J. G., Ehrling, C. & Häussinger, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* 24, 1185-1194, doi:S0898-6568(12)00041-1 [pii] 10.1016/j.cellsig.2012.01.018 (2012).

- 108 Chi, L. et al. Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 21, 231-240, doi:10.1089/107999001750169871 (2001).
- 109 Rallabhandi, P. et al. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. *J Biol Chem* 283, 24314-24325, doi:M804800200 [pii] 10.1074/jbc.M804800200 (2008).
- 110 Zhou, B. et al. Activation of PAR2 or/and TLR4 promotes SW620 cell proliferation and migration via phosphorylation of ERK1/2. *Oncol Rep* 25, 503-511, doi:10.3892/or.2010.1077 (2011).
- 111 Camerer, E. et al. Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood* 107, 3912-3921, doi:2005-08-3130 [pii] 10.1182/blood-2005-08-3130 (2006).
- 112 Rallabhandi, P. et al. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. *J Biol Chem* 283, 24314-24325, doi:M804800200 [pii] 10.1074/jbc.M804800200 (2008).
- 113 Russo, A., Soh, U. J. & Trejo, J. Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters! *Mol Interv* 9, 87-96, doi:9/2/87 [pii] 10.1124/mi.9.2.8 (2009).
- 114 Jesmin, S. et al. Temporal changes in pulmonary expression of key procoagulant molecules in rabbits with endotoxin-induced acute lung injury: elevated expression levels of protease-activated receptors. *Thromb Haemost* 92, 966-979, doi:04110966 [pii] 10.1267/THRO04050966 (2004).
- 115 Hirano, K. et al. Distinct Ca²⁺ requirement for NO production between proteinase-activated receptor 1 and 4 (PAR1 and PAR4) in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 668-677, doi:jpet.107.121038 [pii]

- 10.1124/jpet.107.121038 (2007).
- 116 Asokanathan, N. et al. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 168, 3577-3585 (2002).
- 117 Moormann, C. et al. Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol* 126, 746-755, doi:5700169 [pii]
10.1038/sj.jid.5700169 (2006).
- 118 Suo, Z., Wu, M., Citron, B. A., Gao, C. & Festoff, B. W. Persistent protease-activated receptor 4 signaling mediates thrombin-induced microglial activation. *J Biol Chem* 278, 31177-31183, doi:M302137200 [pii]
10.1074/jbc.M302137200 (2003).
- 119 de Zoete, M. R., Bouwman, L. I., Keestra, A. M. & van Putten, J. P. Cleavage and activation of a Toll-like receptor by microbial proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4968-4973, doi:1018135108 [pii]
10.1073/pnas.1018135108 (2011).
- 120 Ewald, S. E. et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456, 658-662, doi:nature07405 [pii]
10.1038/nature07405 (2008).
- 121 da Silva Correia, J. & Ulevitch, R. J. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem* 277, 1845-1854, doi:M109910200 [pii]
10.1074/jbc.M109910200 (2002).
- 122 Bruscia, E. M. et al. Abnormal trafficking and degradation of TLR4 underlie the elevated inflammatory response in cystic fibrosis. *J Immunol* 186, 6990-6998, doi:jimmunol.1100396 [pii]
10.4049/jimmunol.1100396 (2011).
- 123 Chen, W., Hu, X., Zhao, L., Li, S. & Lu, H. Expression of toll-like receptor 4 in uvea-resident tissue macrophages during endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis* 15, 619-628, doi:63 [pii] (2009).

- 124 Eswarappa, S. M., Basu, N., Joy, O. & Chakravortty, D. Folimycin (concanamycin A) inhibits LPS-induced nitric oxide production and reduces surface localization of TLR4 in murine macrophages. *Innate Immun* 14, 13-24, doi:14/1/13 [pii]
10.1177/1753425907087349 (2008).
- 125 Pugin, J. et al. Soluble MD-2 activity in plasma from patients with severe sepsis and septic shock. *Blood* 104, 4071-4079, doi:2003-04-1290 [pii]
10.1182/blood-2003-04-1290 (2004).
- 126 Bryniarski, K., Maresz, K., Szczepanik, M., Ptak, M. & Ptak, W. Modulation of macrophage activity by proteolytic enzymes. Differential regulation of IL-6 and reactive oxygen intermediates (ROIs) synthesis as a possible homeostatic mechanism in the control of inflammation. *Inflammation* 27, 333-340 (2003).
- 127 Zanoni, I. et al. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460, 264-268, doi:nature08118 [pii]
10.1038/nature08118 (2009).
- 128 Zanoni, I. et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 147, 868-880, doi:S0092-8674(11)01221-9 [pii]
10.1016/j.cell.2011.09.051 (2011).
- 129 Husebye, H. et al. The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* 33, 583-596, doi:S1074-7613(10)00352-3 [pii]
10.1016/j.immuni.2010.09.010 (2010).
- 130 Kagan, J. C. et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9, 361-368, doi:ni1569 [pii]
10.1038/ni1569 (2008).
- 131 Closa, D. et al. Prostanoid generation in early stages of acute pancreatitis: a role for nitric oxide. *Inflammation* 18, 469-480 (1994).
- 132 Seymour, M. L., Binion, D. G., Compton, S. J., Hollenberg, M. D. & MacNaughton, W. K. Expression of proteinase-activated receptor 2 on

- human primary gastrointestinal myofibroblasts and stimulation of prostaglandin synthesis. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 605-616, doi:y05-046 [pii]
10.1139/y05-046 (2005).
- 133 Foitzik, T., Hotz, H. G., Hotz, B., Wittig, F. & Buhr, H. J. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 50, 1159-1162 (2003).
- 134 Song, A. M. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G1166-1174, doi:10.1152/ajpgi.00370.2001 (2002).
- 135 Sharma, A. et al. Protection against acute pancreatitis by activation of protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G388-395, doi:00341.2004 [pii]
10.1152/ajpgi.00341.2004 (2005).
- 136 Singh, V. P. et al. Protease-activated receptor-2 protects against pancreatitis by stimulating exocrine secretion. *Gut* 56, 958-964, doi:gut.2006.094268 [pii]
10.1136/gut.2006.094268 (2007).
- 137 Chang, J., Wigley, F. & Newcombe, D. Neutral protease activation of peritoneal macrophage prostaglandin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4736-4740 (1980).
- 138 Zong, Y. et al. Resveratrol Inhibits LPS-Induced MAPKs Activation via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Murine RAW 264.7 Macrophage Cells. *PLoS One* 7, e44107, doi:PONE-D-12-05551 [pii]
10.1371/journal.pone.0044107 (2012).
- 139 Abe, N. et al. C-reactive protein-induced upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer in macrophages: inhibitory effect of fluvastatin. *Life Sci* 78, 1021-1028, doi:S0024-3205(05)00813-1 [pii]
10.1016/j.lfs.2005.06.015 (2006).

- 140 Kobayashi, J. et al. High level expression of a frog alpha-amidating enzyme, AE-II, in cultured cells and silkworm larvae using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus expression vector. *Cytotechnology* 8, 103-108 (1992).
- 141 Maeda, S. et al. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315, 592-594 (1985).
- 142 McCaffrey, L. M. & Macara, I. G. The Par3/aPKC interaction is essential for end bud remodeling and progenitor differentiation during mammary gland morphogenesis. *Genes Dev* 23, 1450-1460, doi:23/12/1450 [pii] 10.1101/gad.1795909 (2009).

謝辞

稿を終えるに際し、ご指導並びにご助言を賜った山口大学共同獣医学部獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授，大浜剛准教授，鹿児島大学共同獣医学部獣医薬理学研究室 宮本篤教授，ご協力を賜った山口大学共同獣医学部獣医公衆衛生学研究室 清水隆准教授，山口大学農学部生物生産科学講座 小林淳教授，向井優女史，東京大学薬学系研究科細胞情報学教室 一條秀憲教授，大阪府立大学生命科学研究科応用薬理学教室 東泰孝准教授，長崎大学医歯薬学総合研究科 武田弘資教授，University of California Nigel W Bunnett 教授，Shaun R. Coughlin 教授に厚く御礼申し上げます。

また，公私ともに協力を賜った山口大学獣医薬理学研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。