

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590229
 研究課題名（和文）心血管リモデリングにおけるプロスタノイドの役割解明とその予防・治療への応用
 研究課題名（英文）A study of the roles of prostanoids and its therapeutic application in cardiovascular remodeling
 研究代表者
 原 明義（HARA AKIYOSHI）
 国際医療福祉大学・薬学部・教授
 研究者番号：90164988

研究成果の概要：本研究の目的は、心不全の原因となる心臓の肥大化（心肥大）を抑制する薬物を、心肥大をおこした動物（マウス）を用いて明らかにすることである。まず、心肥大はプロスタグランジン（PG）という生理活性物質の産生を抑制するアスピリンを投与することによって増強した。しかし、アスピリンと PG の一種である PGI_2 の類似薬を併用して投与すると、心肥大の増強はみられなかった。また、 PGI_2 類似薬は細胞レベルでも肥大を抑制することが認められた。これらの結果、 PGI_2 製剤が心肥大の予防・治療に有用である可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	690,000	4,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：プロスタノイド、心筋リモデリング、心肥大、非ステロイド性抗炎症薬、マウス

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国において心臓疾患による死亡率は、悪性新生物（癌）による死亡率に次いで 2 番目に多い状況にある。なかでも、心肥大、心不全や虚血性心疾患の発症人口は多く、その予防法・治療法の開発が、高齢化社会の到来に伴い一層重要な課題となっている。したがって、基礎研究を通じて、心臓疾患の未知の成因や防御機構を解明し、有効性・安全性の高い治療薬の開発につなげていくことが必要不可欠である。

プロスタノイドは、アラキドン酸にシクロオキシゲナーゼが作用することによって産

生されるプロスタグランジン(PG)とトロンボキサン(TX)の総称である。これらのプロスタノイドは、標的細胞表面にある各プロスタノイドに特異的な受容体を介して、多彩な生理作用を発揮する。現在、 PGD_2 、 PGE_2 、 PGF_2 、 PGI_2 、 TXA_2 の受容体として、それぞれ DP、EP、FP、IP、TP が知られており、EP は EP_1 、 EP_2 、 EP_3 、 EP_4 の 4 種類のサブタイプに分類されている。近年、多数種のプロスタノイド受容体が心筋や血管組織に発現していることや、肥大心や虚血心において、ある種のプロスタノイドの産生が亢進していることから、心臓の肥大化や線維化などの心筋

リモデリングの成因に、プロスタノイドが関与している可能性が想定されてきたが、その詳細は未だ明らかでない。心筋リモデリングは、圧負荷などに対する一種の適応現象であるが、長期的には心臓の拡張障害を招き心不全の原因となる。したがって、心筋リモデリングにおけるプロスタノイドの役割を追求し、心筋リモデリングを抑制するプロスタノイド関連薬物を解明することが、新しい心不全治療薬の開発やその臨床応用につながると期待される。

2. 研究の目的

先に我々は、内因性 PGI₂ は圧負荷による心筋細胞肥大と心線維化を抑制することにより、心肥大形成を防御する役割を演じていることを明らかにした (*Circulation* 112: 84-92, 2005)。この知見を基盤として、今回、プロスタノイド関連薬物を外因性に投与した場合、心肥大形成にいかなる影響を及ぼすかを、*in vivo* と *in vitro* において解析した。

(1) 心肥大形成に対する非ステロイド性抗炎症薬の作用とその機序に関する検討 (*in vivo* 解析)

PGI₂ の心肥大抑制作用とは逆に、PGF₂ は心肥大形成を促進することが報告されている。したがって、一連のプロスタノイド産生を抑制する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の心肥大に対する作用については、複雑であり必ずしも明らかでない。とくに、アスピリンなどの NSAIDs は、OTC 医薬品としても幅広く使用されていることから、この点を解明することは極めて重要である。そこで、この解析では寒冷ストレスによって惹起される心肥大に対し、アスピリンがいかなる影響を及ぼすかをその作用機序を含めて検討した。

(2) 心筋細胞肥大および非心筋細胞増殖に対する PGI₂ 誘導体の作用に関する検討 (*in vitro* 解析)

この解析では、PGI₂ の心肥大抑制作用の機序を明らかにする目的で、カルジオトロフィンによる心筋細胞肥大および血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor; PDGF) による非心筋細胞増殖を PGI₂ 誘導体であるチカプロストが抑制するか否かを検討した。さらに、心筋細胞肥大は非心筋細胞から分泌されるエンドセリンやカルジオトロフィンなどの生理活性物質によっても惹起される。そこで、このような心筋細胞-非心筋細胞間のクロストークに対するチカプロストの作用についても検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) 心肥大形成に対する非ステロイド性抗

炎症薬の作用とその機序に関する検討 (*in vivo* 解析)

マウス (28~33 g) を 2 群に分け、Cold 群は 5 で、Warm 群は 25 で、それぞれ 1~4 週間飼育した。アスピリンは飲料水に溶解し、400 mg/kg/day の用量で毎日経口投与した。アスピリン投与開始 1 日後より寒冷負荷を開始した。寒冷負荷 1、2 および 4 週間後に、血圧と心拍数を tail-cuff 法により無麻酔下で測定した後、心肥大の指標として、心筋の湿重量を測定し心重量/体重を算出した。

さらに、マウスにベラプロスト (PGI₂ 誘導体) またはアスピリンとベラプロストを併用して投与し、寒冷負荷による心肥大形成の程度について検討した。ベラプロスト (300 μg/kg/day) は、寒冷負荷 1 日前より 6 日後まで、1 日 1 回背部に皮下投与した。寒冷負荷 1 週間後に、血圧、心拍数および心重量/体重を測定した。

(2) 心筋細胞肥大および非心筋細胞増殖に対する PGI₂ 誘導体の作用に関する検討 (*in vitro* 解析)

実験は、野生型および IP 欠損マウスの胎仔心臓を、分別接着法により分離培養した心筋細胞と非心筋細胞を用いて行った。カルジオトロフィン-1 (CT-1) による心筋細胞肥大および PDGF による非心筋細胞増殖に対するチカプロストの作用を検討した。さらに、非心筋細胞の無血清培養液を心筋細胞に添加することによって生じる心筋細胞肥大に対するチカプロストの作用についても検討した。心筋細胞肥大の指標として [¹⁴C]leucine の取り込みを測定し、また非心筋細胞増殖の指標として [³H]thymidine の取り込みと細胞数を測定した。さらに、両細胞における IP mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 心肥大形成に対する非ステロイド性抗炎症薬の作用とその機序に関する検討 (*in vivo* 解析)

図 1 に寒冷負荷による心肥大形成に対するアスピリンの影響を示した。対照マウスにおいて、寒冷負荷 1、2、4 週間後の心重量/体重は、Warm 群のそれぞれ 115、120、126% に増加した。それに対し、アスピリン投与マウスでは、寒冷負荷 1 週間後に Warm 群の 126% に至る著しい増加を認めた。しかし、アスピリン投与マウスの心重量/体重は、寒冷負荷 2 週間後に対照マウスと同程度 (Warm 群の 118%) となり、4 週間後には逆に対照マウスよりも低い値 (Warm 群の 120%) を示した。

図 2 に寒冷負荷後の心拍数の変化に対するアスピリンの影響を、図 3 には寒冷負荷後の血圧の変化に対するアスピリンの影響をそれぞれ示した。拡張期血圧は寒冷負荷により

上昇したが、その程度は対照マウスとアスピリン投与マウスとの間に差を認めなかった(図3)。また、両マウスの収縮期血圧と心拍数に、寒冷負荷による変化はみられなかった(図2、3)。

一方、Warm 群の心重量/体重、心拍数および収縮期・拡張期血圧は、対照マウスとアスピリン投与マウスとの間で同程度であった(図1-3)。

これらの結果、アスピリンは寒冷ストレスによる早期の心肥大形成を促進するが、長期ではむしろ抑制することが示唆された。アスピリンのこの作用は、血行動態の変化を介するものでないと考えられる。

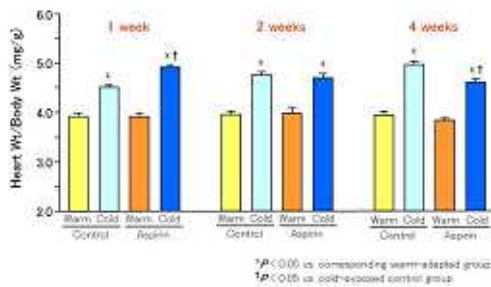


図1 寒冷負荷1, 2, 4週間後の心重量/体重に対するアスピリンの影響。Warm群とCold群のマウスに、それぞれアスピリン(400 mg/kg/day)を経口投与した。各値は平均値 ± 標準誤差。

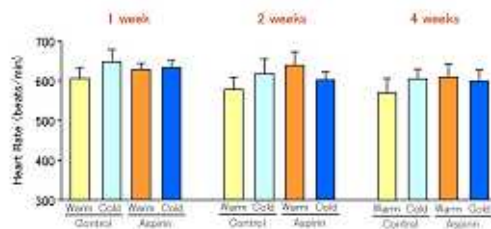


図2 寒冷負荷1, 2, 4週間後の心拍数に対するアスピリンの影響。Warm群とCold群のマウスに、それぞれアスピリン(400 mg/kg/day)を経口投与した。各値は平均値 ± 標準誤差。



図3 寒冷負荷1, 2, 4週間後の収縮期血圧(●)および拡張期血圧(■)に対するアスピリンの影響。Warm群とCold群のマウスに、それぞれアスピリン(400 mg/kg/day)を経口投与した。各値は平均値 ± 標準誤差。

寒冷負荷1週間後に認められたアスピリンの心肥大促進作用は、PGI₂産生を抑制したことによる可能性がある。この可能性を確か

めるため、アスピリンの心肥大促進作用に対し、PGI₂誘導体であるベラプロストがいかなる影響を及ぼすかを検討した(図4)。寒冷負荷による心重量/体重の増加は、対照マウスとベラプロスト単独投与マウスとの間に差は認めなかった。しかし、アスピリンとベラプロストを併用投与したマウスの心重量/体重は、アスピリン単独投与したマウスと比較し低値を示した。すなわち、ベラプロストはアスピリンにより促進される心肥大形成を抑制することが認められた。

一方、Warm 群およびCold 群における心拍数と収縮期・拡張期血圧は、アスピリン、ベラプロストまたは両薬物の併用によって影響されなかった(表1)。

これらの結果から、寒冷負荷早期におけるアスピリンの心肥大促進作用は、PGI₂産生を抑制したことによると考えられる。

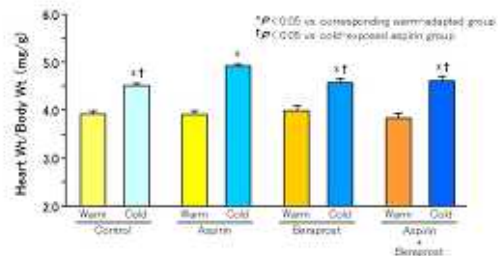


図4 寒冷負荷1週間後のアスピリンによる心肥大促進作用に対するベラプロストの影響。Warm群とCold群のマウスに、それぞれアスピリン(400 mg/kg/day)、ベラプロスト(300 μg/kg/day)または両薬物を併用して投与した。各値は平均値 ± 標準誤差。

表1 寒冷負荷1週間後の心拍数、収縮期血圧(SBP)および拡張期血圧(DBP)

	Heart Rate (beats/min)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)
Control			
Warm	605.4 ± 27.5	94.7 ± 2.1	59.3 ± 1.1
Cold	647.8 ± 30.2	98.0 ± 1.6	62.4 ± 2.2
Aspirin			
Warm	628.3 ± 15.4	93.4 ± 1.4	59.5 ± 0.8
Cold	638.1 ± 17.5	93.6 ± 1.9	62.1 ± 1.7
Beraprost			
Warm	581.5 ± 6.2	98.0 ± 3.9	60.9 ± 1.6
Cold	641.8 ± 21.4	92.9 ± 2.5	59.9 ± 3.2
Aspirin + Beraprost			
Warm	621.2 ± 29.6	83.7 ± 0.7	58.7 ± 1.6
Cold	653.3 ± 29.4	91.1 ± 2.9	59.1 ± 2.0

各値は平均値 ± 標準誤差

(2) 心筋細胞肥大および非心筋細胞増殖に対するPGI₂誘導体の作用に関する検討(*in vitro*解析)

最初に、PGI₂誘導体であるチカプロストが、心筋細胞肥大および非心筋細胞増殖にいかなる作用を及ぼすかを検討した。野生型マウスから得た非心筋細胞にPDGF(5 ng/ml)を作用させると、非心筋細胞は著しく増殖した。チカプロスト(10⁻⁵ M)は、この増殖を著明に抑制したが、CT-1(10⁻¹⁰ M)による野生型マウスの心筋細胞肥大を抑制しなかった。

次に、心筋細胞と非心筋細胞とのクロスト

ークに対するチカプロストの作用を検討した。野生型マウスにおいて、非心筋細胞の無血清培養液を心筋細胞に添加すると、心筋細胞の $[^{14}\text{C}]$ leucine 取り込みは20%増加した。非心筋細胞にPDGFを作用させた後、その培養液を添加した場合は、心筋細胞の $[^{14}\text{C}]$ leucine 取り込みがさらに増加(40%)した。しかし、チカプロストとPDGFを併用して非心筋細胞に処理した場合、心筋細胞の $[^{14}\text{C}]$ leucine 取り込みは22%の増加にとどまった(図5)。以上のチカプロストの作用は、いずれもIP欠損マウスから得た細胞で消失した。また、IP mRNAの発現は、野生型マウスの心筋細胞より非心筋細胞において顕著であった。

これらの結果、PGI₂は主として非心筋細胞に作用し、その増殖抑制を介して、心筋細胞の肥大化を抑制することが明らかとなった。

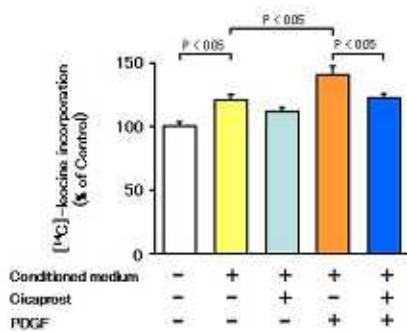


図5 野生型マウスの心筋細胞-非心筋細胞間のクロストークに対するチカプロストの作用。各値は平均値 ± 標準誤差。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

原 明義、花開 孝宏、近藤 祐樹、柳沢 照史、寒冷ストレスによる心肥大形成に対するアスピリンの作用、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、国立京都国際会館(京都市)

結城幸一、肖 春陽、原 明義、川辺 純一、成宮 周、牛首文隆、プロスタグランジンE₂はその受容体EP₃を介して虚血-再灌流障害から心臓を保護する、2007年3月16日、名古屋国際会議場(名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 明義(HARA AKIYOSHI)
国際医療福祉大学・薬学部・教授
研究者番号：90164988

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

牛首 文隆(USHIKUBI FUMITAKA)
旭川医科大学・薬理学講座・教授

結城 幸一(YUHKI KOH-ICHI)
旭川医科大学・薬理学講座・講師

花開 孝宏(HANAKAI TAKAHIRO)
国際医療福祉大学・薬学部・学生

近藤 祐樹(KONDO YUHKI)
国際医療福祉大学・薬学部・学生

柳沢 照史(YANAGISAWA TERUFUMI)
国際医療福祉大学・薬学部・学生