

平成21年 5月28日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008（2007年度育児休暇）

課題番号：18790063

研究課題名（和文）

脳虚血障害におけるプロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素の役割

研究課題名（英文）

The Role of prostaglandin E synthase in stroke injury

研究代表者

松尾 由理 (Ikeda-Matsuo Yuri)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：10306657

研究成果の概要：

本研究では、誘導型でプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 合成の末端酵素である、膜結合型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素 (mPGES-1) の脳虚血障害における役割を解析した。ラット脳虚血モデルにて、mPGES-1 の蛋白質、mRNA の発現誘導が認められた。また mPGES-1 欠損型マウスでは、虚血後の PGE<sub>2</sub> 産生が完全に消失しただけでなく、野生型マウスに比べ脳梗塞、浮腫、アポトーシス、行動障害等の脳梗塞障害が減弱した。本研究より、mPGES-1 が脳梗塞障害増悪因子であることが明らかになっただけでなく、脳梗塞治療の新たなターゲットとなるものと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度*	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

※) 2007年度は育児休暇のため、研究中断。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学、脳虚血

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞の後遺症は深刻な臨床的問題となっている。現在、脳梗塞の薬物治療は血栓溶解を基にしており、治療効果が発症初期に限られている。一方、虚血後期には、炎症反応が脳梗塞の病状に深く関与することが知られている。そこで、発症後期の障害増悪機序として、我々は、脳虚血時に産生される炎症性メディエーターの一つであるプロスタグラ

ンジン (PG) E<sub>2</sub> に着目した。PGE<sub>2</sub> は脳保護的、或いは毒性的という、相反する報告もなされており、混沌としているのが現状であった。また、PGE<sub>2</sub> の脳虚血時の産生機序、産生担当細胞については不明な点が多かった。特にその合成の末端酵素である mPGES-1 については、当研究室 (*J Rheumatol*, 29:1836-42, 2002) を含め数ヶ所のグループで末梢炎症モデルでの研究が進められていたが、脳炎症モデルでの報告はこれまで全く無かった。末梢

炎症モデルの報告から、mPGES-1 は炎症部位での PGE<sub>2</sub> 産生だけでなく、病態悪化にも関与すると考えられた。そこで申請者は、脳炎症時の mPGES-1 の役割、即ち、リポ多糖投与による脳炎症部位での PGE<sub>2</sub> 産生にミクログリアでの mPGES-1 発現誘導が関与することを、世界に先駆けて報告した (*J Neurochem*, 94: 1546-1558, 2005)。従って、脳炎症病態においても、mPGES-1 が重要であると予想された。しかし、脳虚血における mPGES-1 の関与は全く報告されていなかった。本研究により、脳内での mPGES-1 の発現誘導とその役割を明らかにすることで、PGE<sub>2</sub> の脳虚血時の役割も明らかとなるものと予想され、脳虚血時の炎症病態発現の一端を明らかにすると共に、その治療法に新たな展開が得られるものと期待された。

## 2. 研究の目的

脳は虚血に極めて脆弱な組織であり、虚血により生じる脳機能障害は深刻な臨床的問題となっている。発症後期にも有効な薬物治療のためには、虚血後期の脳梗塞巣形成・拡大因子を同定する必要がある。そこで、我々は脳虚血時に産生される炎症性メディエーターの一つである PGE<sub>2</sub> に着目し、特にその合成酵素の役割の解明を試みた。

PGE<sub>2</sub> は、アラキドン酸から 2 段階の酵素反応、即ち、COX と PGE<sub>2</sub> 合成酵素 (PGES) により合成される。中でも誘導型である mPGES-1 は、末梢炎症時の PGE<sub>2</sub> 産生と病態悪化に関与することが明らかにされてきたが、中枢病態における PGES の役割は全く分かっていなかった。薬物治療を考える上で mPGES-1 をターゲットとする薬物の利点は次の二点である。

- (1) 通常発現せず病態時に発現誘導するため、PGE<sub>2</sub> の生理作用には影響を及ぼしにくい (病態特異的治療薬)。
- (2) PGE<sub>2</sub> 産生の末端酵素であるため、COX から産生される他のプロスタノイドの生理作用には影響を及ぼしにくい。

従って、mPGES-1 が脳梗塞巣形成・拡大因子であれば、有効な薬物治療のターゲットとなり得る。

そこで本研究では脳虚血による炎症反応において以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) *in vivo* ラット脳虚血モデル (中大脳動脈閉塞モデル) にて、梗塞部位における

mPGES-1 発現誘導とその時間経過、発現部位、発現細胞、及び、発現機序を個体レベルで解明する。

- (2) mPGES-1 欠損マウス脳虚血モデルを用いることで、脳虚血時の PGE<sub>2</sub> 産生及び脳梗塞、神経細胞死、運動障害における mPGES-1 の役割を個体レベルで解明する。
- (3) さらに、*in vitro* 脳 (神経・グリア) 細胞培養、脳組織培養にて虚血性 (酸素除去) 及び興奮性 (グルタミン酸) 刺激による、mPGES-1 発現誘導とその機序、役割を細胞・組織レベルで詳細に解析する。

今後 mPGES-1 の脳内での役割が明らかとなるだけでなく、脳梗塞巣形成・拡大の機序を詳細に解析することで、mPGES-1 をターゲットとした脳梗塞治療が期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では図 1 の作業仮説に基づき以下の実験を行った。

中大脳動脈閉塞モデル  
 麻酔下 SD ラット (SLC, Japan) あるいは、mPGES-1 欠損型及び野生型マウスの中大脳動脈をナイロンフィラメントにて 2 時間閉塞・再灌流し、24 時間後に実験に用いた。

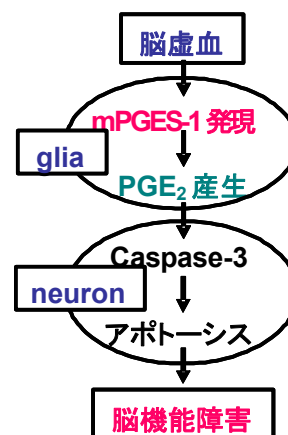


図 1 本研究の作業仮説

### PGES 活性と PGE<sub>2</sub> 産生量測定

脳或いは、培養海馬切片を分離採取・精製し、PGES 活性 (基質である PGH<sub>2</sub> から PGE<sub>2</sub> への変換量) と脳内或いは、培養海馬切片の培地中の PGE<sub>2</sub> 産生量を EIA キット (Cayman) にて測定した。

### mPGES-1 誘導の解析

脳を分離採取し、或いは培養海馬切片をホモジナイズし、mPGES-1 のタンパク質を Western blot 法で、mRNA を Northern blot 法で解析した。

### mPGES-1 発現細胞の同定

脳の凍結切片を作成し、グリア細胞の活性化と mPGES-1 の誘導を、グリア細胞のマーカー蛋白質抗体との二重免疫染色にて共焦点

顕微鏡を用いて検出した。

#### 梗塞巣形成、神経アポトーシスの測定

虚血再灌流後の脳を取り出し、2 mm 切片を作成し脳梗塞巣を TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride) 染色により検出した。得られた染色像より Scion image (無料解析ソフト) にて、梗塞体積、浮腫率を測定した。アポトーシスは虚血再灌流後の凍結脳切片を用いて、TUNEL 染色及び、活性型 caspase-3 免疫染色により可視化し、陽性細胞数を計数した。

#### 行動評価

虚血による行動障害をスコア表により数値化し (0, 正常, 1, 片麻痺, 2, 左右力差, 3, 回転歩行, 4, 無動)、また、1 分間の運動量を測定した。

#### 脳血流量測定

マウスを脳定位固定装置に固定し、レーザードップラー法により、脳血流量変化を測定した。

#### 生理学的パラメーター測定

大腿動脈にカニューレを挿入し血圧を測定した。また、脳虚血前・中・後に採血し、血中 pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH を測定した。

#### 海馬切片培養

生後 7 日齢の Wistar ラットと或いは mPGES-1 欠損型及び野生型マウス脳よりマイクロライサーを用いて 300 μm 厚の海馬切片を作成し、膜状にて 7 日間培養し、1 mM グルタミン酸にてラットは 15 分間、マウスは 30 分間刺激した後、propidium iodide (PI) 含有培地にて 24 時間培養後、CA1 野の神経細胞死を PI の取り込みにより共焦点顕微鏡にて観察し、Photoshop にて解析した。

## 4. 研究成果

### mPGES-1 の発現誘導の解析

まず始めに、ラットを用い、MCAO による mPGES-1 の発現変化を Western blot 法にて解析したところ、梗塞部位である大脳皮質において、再灌流 24 時間後に mPGES-1 と COX-2

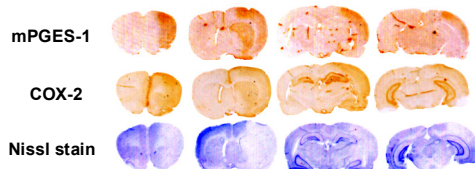


図2 脳虚血後の mPGES-1, COX-2 蛋白質の誘導発現  
中大脳動脈 2 時間閉塞、24 時間再灌流後の脳切片の免疫染色像。Nissl 染色で白く抜けている梗塞部位にて、mPGES-1 と COX-2 が発現している。

タンパク質の共誘導が認められた (図 2)。

24 時間以降の両酵素の発現の時間経過は異なった。また、Northern blot 法による解析の結果、両酵素ともに虚血再灌流 6 時間後に顕著な mRNA の発現誘導が認められ、転写促進を介することが明らかとなった。

mPGES-1 と各種脳細胞マーカータンパク質との免疫共染色より、mPGES-1 は梗塞周辺部位では神経細胞、梗塞部位ではミクログリア及び血管内皮細胞において誘導することが示唆された (図 3)。

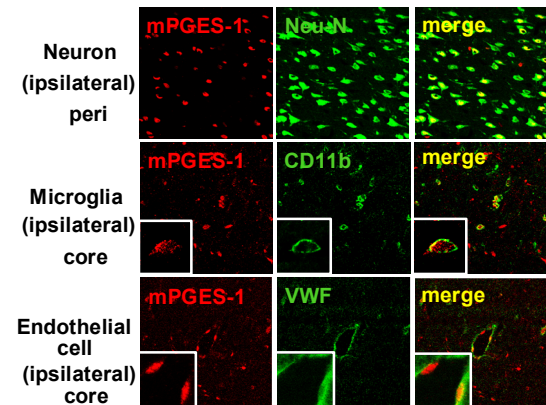


図3 脳虚血後の mPGES-1 発現細胞の同定  
脳虚血 24 時間後の大脳皮質梗塞周辺部 (peri) 及び梗塞部 (core) での、mPGES-1 と神経細胞 (Neu-N)、ミクログリア (CD11b)、血管内皮細胞 (VWF) の免疫染色像。

次に、mPGES-1 欠損マウスを用いて、脳虚障害における誘導 mPGES-1 の役割を解析した。mPGES-1 欠損マウスにおいては、虚血による大脳皮質での PGE<sub>2</sub> 産生が完全に消失した (図 4)。

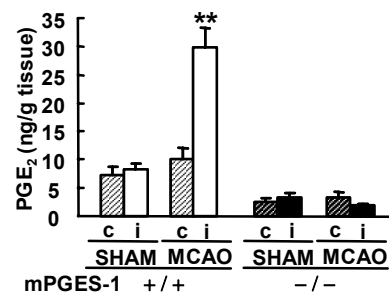


図4 虚血性 PGE<sub>2</sub> 産生の mPGES-1 欠損型と野生型の比較

虚血 24 時間後の同側 (i) と反対側 (c) 大脳皮質での PGE<sub>2</sub> 産生。

さらに、野生型マウスに比べ再灌流 24 時間後の梗塞体積や浮腫が顕著に抑制された (図 5)。また、神経細胞のアポトーシスを検討するため、虚血後の脳切片を TUNEL 染色、

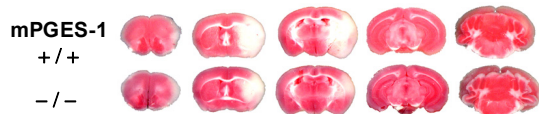


図5 脳梗塞の mPGES-1 欠損型と野生型の比較

虚血 24 時間後の脳切片の TTC 染色像。白く抜けている梗塞部位が、mPGES-1 欠損型で減少している。

あるいは caspase-3 の免疫染色を行ったところ、虚血による梗塞周辺領域の神経アポトーシスも、mPGES-1 欠損マウスにおいては野生型に比べ改善していた。さらに、虚血による片麻痺などの行動異常、運動量の低下も野生型マウスに比べ mPGES-1 欠損型マウスで改善していた。

そこで次に、mPGES-1 の脳梗塞増悪が PGE<sub>2</sub> 産生を介しているかを調べるために、mPGES-1 欠損型マウス脳室内に PGE<sub>2</sub> を投与し補った時の効果を検討した。mPGES-1 欠損型マウスでの脳梗塞体積、浮腫、神経学的行動障害は、いずれも PGE<sub>2</sub> 脳室内投与により野生型マウスの障害と同程度まで増悪した。従って、虚血時に誘導された mPGES-1 は PGE<sub>2</sub> 産生を介して脳梗塞障害を増悪することが示唆された。

さらに mPGES-1 による虚血性細胞死憎悪機序を詳細に検討するため、培養海馬切片のグルタミン酸による興奮毒性にて評価した。グルタミン酸刺激により、mPGES-1 の mRNA 及び蛋白質の顕著な発現上昇が認められ、同様に PGE<sub>2</sub> 産生が認められた。mPGES-1 の活性阻害薬 (MK-886) は、PGE<sub>2</sub> 産生と PGES 活性を有意に抑制しただけでなく、この時の興奮毒性をも有意且つ顕著に抑制した。さらに、mPGES-1 欠損マウスの海馬切片にて同様の検討を行ったところ、野生型マウスの海馬切片で見られるグルタミン酸による神経細胞死は、mPGES-1 欠損マウス切片では有意に減弱した。さらに、mPGES-1 の下流の細胞毒性機序を調べるため、EP 受容体の関与を調べた。EP1-4 受容体アンタゴニストのうち、EP3 アンタゴニストのみ、グルタミン酸毒性を有意且つ濃度依存的に抑制した。また、EP3 アンタゴニストは単独では毒性作用を示さなかったが、グルタミン酸毒性を濃度依存的に憎悪した。EP3 アンタゴニストによるグルタミン酸毒性憎悪作用は、Rho キナーゼ阻害薬及び Gi 阻害薬により、有意に抑制された。従って、脳虚血時に過剰放出されるグルタミン酸刺激により mPGES-1 が発現誘導し PGE<sub>2</sub> を産生し、これが EP3 受容体に作用することで、Gi の活性化 Rho キナーゼの活性化を介し、神経死細胞死を促進することが示唆された。

本研究は mPGES-1 の脳梗塞障害増悪機序の解明だけでなく、脳梗塞の新たな薬物治療のターゲットの開発にも貢献できると期待される。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 松尾由理 プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵

素、日本薬理学雑誌、130 巻 6 号 pp.514-516 (2007) 査読有

- ② Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103(31), 11790-11795, 2006. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 平山友里、松尾由理、植松智、審良静男、佐々木泰治 Functional coupling of microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 in stroke-reperfusion injury 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜) 2009. 3. 16
- ② 松尾由理、神経変性疾患における膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素の役割と創薬ターゲットとしての可能性、第 25 回白金シンポジウム (北里大学薬学部ハイテクリサーチ・シンポジウム、東京) 2009. 2. 13
- ③ Yuri Ikeda-Matsuo, Azusa Ota, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Yasuharu Sasaki Microsomal prostaglandin E synthase-1 deteriorates glutamate excitotoxicity in hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 2008 (Annual meeting of Society for Neuroscience, Washington D.C.) 2008. 11. 19
- ④ 松尾由理、脳梗塞の増悪因子と創薬標的分子としての可能性 —膜結合型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素—、第 9 回 Pharmac-Hematology Symposium (東京) 2008. 6. 21
- ⑤ 丹治勇人、松尾由理、太田梓、植松智、審良静男、佐々木泰治、虚血再灌流障害におけるプロスタグランジン E<sub>2</sub> EP3 受容体の関与、第 50 回日本神経化学学会大会 (横浜) 2007. 9. 10
- ⑥ 松尾由理、太田梓、深田哲也、植松智、審良静男、佐々木泰治 中大脳動脈閉塞—再灌流障害における膜結合型プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素の役割、日本薬学会 第 127 年会 (富山) 2007. 3. 30
- ⑦ 松尾由理、膜結合型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素：脳梗塞拡大因子及び治療標的分子としての可能性、第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋) 2007. 3. 15

- ⑧ 松尾由理, 伊藤愛, 植松智, 審良静男, 佐々木泰治, 脳での膜結合型プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素-1 (mPGES-1) の誘導と一酸化窒素(NO)による調節 第11回プロスタノイド研究会(東京) プロスタノイド研究会 2006.12.16
- ⑨ 松尾由理, 伊藤愛, 佐々木泰治, Downregulation of Microsomal Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase-1 Expression by Nitric Oxide in Rat Microglia, 第49回日本神経化学学会大会(名古屋) 2006.9.14
- ⑩ 松尾由理, 太田梓, 深田哲也, 植松智, 審良静男, 佐々木泰治, 脳虚血障害における膜結合型プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素の役割の解析, 第27回日本炎症・再生医学会(東京) 2006.7.11
- ⑪ 松尾由理, 膜結合型プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素の脳虚血障害における役割, 第7回首都圏 COX-2 研究会(東京) 2006.6.24

[その他]

賞罰

- ① 松尾由理, 2006年9月 第28回日本生物学的精神医学会, 第36回日本神経精神薬理学会, 第49回日本神経化学学会大会三学会合同優秀演題賞 演題「ラットミクログリアにおける一酸化窒素によるリポ多糖誘導膜結合型プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素-1 発現の抑制」
- ② 松尾由理, 2007年11月 第23回二宮善基記念賞「Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury.」

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 松尾 由理  
(Ikeda-Matsuo Yuri)

研究者番号: 10306657

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし