

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06549

研究課題名(和文) 化学物質曝露に伴う膀胱疾患の発症進展におけるプロスタグランジン合成酵素の機能解析

研究課題名(英文) Role of Prostacyclin Synthase in Chemical-induced bladder disease

研究代表者

佐々木 由香 (Sasaki, Yuka)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：40635108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質による影響を受けやすい膀胱における化学物質誘導膀胱炎や膀胱がんの発症について、生理活性脂質であるプロスタグランジン(PG)合成系に注目して解析を行った。本研究ではそれぞれPGE2、PGI2産生を担う酵素であるmPGES-1、PGISの遺伝子欠損マウスを用いてシクロホスファミドによる出血性膀胱炎、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamineによる膀胱発がんにおける役割について検討し、これらの酵素が病態に深く関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質曝露に伴う膀胱疾患の発症・進展に、PG類の産生が関わることが予想されるが、膀胱疾患の発症や進展とPG合成酵素との関連についてはほとんど解析が進んでいなかった。本研究によって化学物質による膀胱炎や膀胱がんの発症にmPGES-1およびPGISが関わることを示唆され、これらの疾患の治療標的となりうることを期待される。新たな作用機序の治療法となれば、治療の選択肢が増えることになり、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1 and prostacyclin synthase (PGIS) are terminal enzymes that produce PGE2 and PGI2, respectively, downstream of cyclooxygenase (COX). We analyzed role of mPGES-1 and PGIS in chemical-induced bladder diseases. In PGIS KO mice, cyclophosphamide-induced cystitis was significantly suppressed but not in mPGES-1 KO mice. On the other hand, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)-induced bladder carcinogenesis was suppressed in mPGES-1 KO mice. However, in PGIS KO mice, BBN-induced bladder carcinogenesis was promoted.

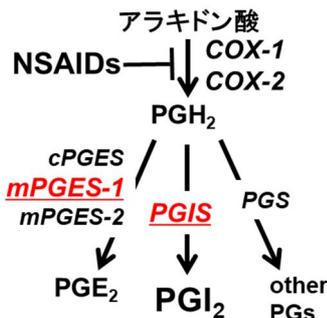
研究分野：衛生薬学

キーワード：膀胱がん 膀胱炎 プロスタグランジン 化学物質

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱は PGE<sub>2</sub> や PGI<sub>2</sub> といったプロスタグランジン (PG) 類産生の盛んな組織であり、膀胱の収縮・弛緩や排尿反射といった生理的機能が、これらの PG 類により調節されていることが以前より知られている。しかし一方で、これら PG 類は生理作用に加え、様々な病理作用を併せもち、PG 類の異常産生は多くの疾患の発症や進展にも深く関与する。膀胱は体内に吸収された化学物質の曝露の影響が大きい組織であり、化学物質曝露は膀胱癌や膀胱炎といった膀胱疾患へとつながるが、この化学物質曝露に伴う膀胱疾患の発症・進展にも、PG 類の異常産生が関与することが予想される。しかし、膀胱疾患の発症や進展と PG 合成酵素との関連については、ほとんど解析が進んでいなかった。

様々な生理活性を持つ PG 類は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) によって産生された PGH<sub>2</sub> に各々の PG 類に特異的な最終合成酵素が作用して生合成される (右図)。臨床現場で汎用される非ステロイド性炎症薬 (NSAIDs) の抗炎症作用は、主に、COX の 2 つのアイソザイムのうち、誘導型の COX-2 を阻害し、PG 類の中の PGE<sub>2</sub> 産生を抑えることによるものと考えられている。COX-2 は炎症性疾患のみならず、癌の発症や進展にも深く関与する。実際、NSAIDs が大腸癌などの発癌を抑制することが疫学的に示唆されており、マウスの膀胱発癌を抑制することも報告されている。PG 類の中でも、炎症性疾患や癌の発症・進展との関連が最も大きいのは、COX-2 を介し産生される PGE<sub>2</sub> である。



PGH<sub>2</sub> から PGE<sub>2</sub> を産生する酵素には、膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES)-1、mPGES-2、細胞質型 PGE 合成酵素 (cPGES) の 3 種類が知られているが、申請者らは、これまでに遺伝子欠損 (KO) マウスを用い、この 3 種類の PGE 合成酵素のうち、mPGES-1 が COX-2 と機能関連し、炎症性疾患や癌の発症・進展に深く関与することを明らかにしてきた。化学発癌については、mPGES-1 を介し産生された PGE<sub>2</sub> が大腸化学発癌の発症、進展を促進することを明らかにしている。しかし、膀胱発癌における mPGES-1 の役割はほとんど明らかになっていない。膀胱は PG 類産生の盛んな組織であるが、中でも PGI<sub>2</sub> 産生が多いのが特徴的である。PGI<sub>2</sub> は血小板凝集抑制や血管平滑筋弛緩作用を有し、循環器系との関連を中心に解析が進められてきた。また、血管透過性亢進作用をもつことから炎症との関連も解析されてきたものの、発癌への関与についてはこれまでほとんど注目されてこなかった。しかし、近年、ヒトにおいて、PGH<sub>2</sub> から PGI<sub>2</sub> を産生する PGI 合成酵素 (PGIS) の遺伝子多型と乳癌に関連があることが報告された。さらに、PGIS 過剰発現マウスではタバコの煙による肺癌の発生率が低下することも報告され、PGIS は発癌にも関与することが示唆されている。申請者らは、PGIS KO マウスを用いて大腸や皮膚における化学発癌への PGIS の関与について解析を行った。その結果、PGI<sub>2</sub> 産生量が比較的多い大腸では PGIS KO マウスにおいて化学発癌が促進されたものの、PGI<sub>2</sub> 産生量が少ない皮膚では野生型マウスと同程度の発癌率を示した。組織によって PGIS の発癌への役割は大きく差があることが考えられる。さらに、PGIS KO マウスを用いた解析により、PGIS を介し産生される PGI<sub>2</sub> が、発癌においては mPGES-1 を介し産生される PGE<sub>2</sub> と拮抗して働くのに対し、腹膜炎等の炎症反応においては相乗的に炎症を亢進する方向に働くことを見出している。本研究では、化学物質曝露に伴う膀胱炎における PGIS と mPGES-1 のクロストークについても注目して解析を進めた。

## 2. 研究の目的

本研究では、化学物質曝露に伴う膀胱癌・膀胱炎の発症・進展の機構を、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 両方の合成系に着目して解析を行う。特に、発癌においては、PGE<sub>2</sub> の関与について多数の報告があるものの、PGIS および PGI<sub>2</sub> との関連についてはあまり注目されてこなかった。本研究で PGIS が発癌に関わる機構が明らかとなれば、癌治療の新たな戦略となりうる。既存の NSAIDs はすべての PG 産生を減少させるが、PGI<sub>2</sub> が膀胱においても発癌を抑制するのならば、既存の NSAIDs で COX を阻害するよりも mPGES-1 を阻害した方が PGE<sub>2</sub> 産生の抑制と PGI<sub>2</sub> 産生の促進によって相乗的に発癌を抑制できる可能性があり、より有効な癌治療の標的になることが期待される。また、炎症反応においては、NSAIDs を用い、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 両者の産生を抑えることが本当に有効なのかについても、未だ不明な点が多い。膀胱炎への関与において、mPGES-1 と PGIS に違いがみられれば、膀胱炎治療の標的についても新たな知見が得られることが期待できる。本研究では、mPGES-1 および PGIS の KO マウスを用い、シクロホスファミド誘導出血性膀胱炎や BBN 誘導膀胱化学発癌モデルにおける病態の発症・進展に、両酵素および両酵素を介し産生される PG 類が関与するかを検討する。さらに、各々の病態において、病態の進行に伴う遺伝子発現・各生理活性脂質産生の変化、両酵素の局在部位の解析等を進め、いかなる機構で両酵素が膀胱疾患に関与するか、明らかにすることを試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) シクロホスファミド誘導出血性膀胱炎の解析

化学物質曝露に伴う膀胱炎のモデルとしては、シクロホスファミド(CP)誘導出血性膀胱炎モデルを用いた。野生型マウスおよびPGIS KOマウス、mPGES-1 KOマウスにCPを150 mg/kg腹腔投与し、4時間後に、膀胱を摘出し、炎症の進行を病理学的に評価するとともに、膀胱組織中PG量をLC/MSを用い、炎症関連遺伝子の発現を定量的PCRを用いて測定した。

#### (2) BBN誘導膀胱化学発癌の解析

化学物質曝露に伴う膀胱癌のモデルとしては、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)誘導膀胱化学発癌モデルを用いた。野生型マウスおよびPGIS KOマウス、mPGES-1 KOマウスにBBN 0.05%含有水を8週間自由飲水させ、その後は通常水にて飼育した。膀胱を摘出して組織標本作製し、発癌率、腫瘍の悪性度を病理学的に評価した。(1)と同様に、膀胱組織中PG量、炎症関連遺伝子の発現、両酵素の発現局在の解析も行った。

白血球に発現するPGISの役割について解析するため、野生型マウスにX線を照射して骨髄細胞を枯渇させたのち、野生型マウスまたはPGIS KOマウスの骨髄細胞を移植して作成した骨髄キメラマウスを用いてBBNによる膀胱癌を誘導し、解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) シクロホスファミド(CP)誘導出血性膀胱炎の解析

野生型マウス、mPGES-1欠損マウス、PGIS欠損マウスにCPを投与し、4時間後の膀胱炎を評価したところ、野生型マウス、mPGES-1欠損マウスでは顕著な炎症反応が認められたが、PGES-1欠損マウスでは炎症の抑制が認められた。このとき、野生型マウスではPGI<sub>2</sub>代謝物である6-ketoPGF<sub>1α</sub>の産生が増加していたが、PGIS欠損マウスでは検出されなかった。次にPGI<sub>2</sub>受容体(IP)のアンタゴニストによって、出血性膀胱炎は抑制されることも明らかとなった。さらに、白血球に発現するPGISが出血性膀胱炎に関与するのか解析するために、野生型マウスにPGIS欠損マウスの骨髄細胞を、あるいはPGIS欠損マウスに野生型マウスの骨髄細胞を移植して骨髄キメラマウスを作成し、CPを投与した。その結果、白血球に発現するPGISは出血性膀胱炎に影響しないことが示唆された。

これらの結果より、多くの炎症性疾患の促進に関与することが報告されてきたmPGES-1はシクロホスファミド誘導出血性膀胱炎には影響せず、PGISによって産生されるPGI<sub>2</sub>が出血性膀胱炎の発症に重要であることが明らかとなった。

#### (2) BBN誘導膀胱化学発癌の解析

野生型マウスおよびPGIS欠損マウスにBBNを投与し、膀胱がんの発癌を評価した。野生型マウスではBBN投与によって69.3%に発癌が認められ、15.4%では筋層まで浸潤していた。一方、PGIS欠損マウスでは全てのマウスに発癌および筋層への浸潤が認められ、PGISの欠損は膀胱発癌を促進することが示唆された。PGIS欠損マウスにおいて発癌が促進したメカニズムを解明するために、発癌初期に注目し、検討を行った。野生型マウスにBBNを投与し、1,2,8,10週間後に膀胱を摘出し、組織標本作製、観察したところ2週目をピークとして組織の炎症に伴う肥厚が認められた。このときの膀胱重量を測定したところ、PGIS欠損マウスではBBN投与から1,2週後の膀胱重量の増加が野生型マウスと比較して顕著に抑制された。このときのmRNA発現を解析すると、PGIS欠損マウスではBBN投与によって発現が増加した炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が野生型マウスと比較して抑制されていた。膀胱がんは免疫応答の活性化が発がん抑制に関わることが報告されている。PGIS欠損マウスではBBNによる初期の炎症が抑制されることで発がんが促進された可能性が考えられた。このとき、PGIS欠損マウスでは白血球の浸潤が抑制されていることがHE染色像より観察された。そこで、白血球に発現するPGISが発がんに影響していることを考え、X線を照射して骨髄細胞を枯渇させた野生型マウスにPGIS欠損マウスあるいは野生型マウスの骨髄細胞を移植し、骨髄キメラマウスを作製し、BBNを投与して膀胱発がんを評価した。その結果、野生型マウスの骨髄細胞を移植した群とPGIS欠損マウスの骨髄細胞を移植した群では同程度の発がん率であった。PGISは血管内皮細胞や白血球に発現が認められるが、白血球が発現するPGISはBBNによる膀胱発がんに影響しないことが示唆された。

次に、mPGES-1欠損マウスにおいても同様にBBNによる発癌を評価した。その結果、mPGES-1欠損マウスでは野生型マウスと比較して膀胱発癌が抑制されていた。組織中のPGE<sub>2</sub>量を測定したところ、BBNを投与していないコントロール群、BBN投与群ともにmPGES-1欠損マウスでは野生型マウスと比較してPGE<sub>2</sub>産生が抑制されていた。また、野生型マウスではBBN投与群の膀胱においてF4/80、MPO、CD4などの白血球マーカーのmRNA発現が増加していたが、mPGES-1欠損マウスではこれらの発現増加は認められなかった。mPGES-1の欠損はPGE<sub>2</sub>産生を抑制し、発癌を抑制することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ochiai, T., Honsawa, T., Sasaki, Y., Hara, S.	4. 巻 45
2. 論文標題 Prostacyclin Synthase as an ambivalent regulator of inflammatory reactions.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 979-984.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00370.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai Tsubasa, Sasaki Yuka, Yokoyama Chieko, Kuwata Hiroshi, Hara Shuntaro	4. 巻 35
2. 論文標題 Absence of prostacyclin greatly relieves cyclophosphamide induced cystitis and bladder pain in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101025r	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuka Sasaki, Yuki Endo, Yasutomo Suzuki, Yukihiro Kondo, Shuntaro Hara.
2. 発表標題 Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in chemical carcinogen-induced bladder carcinogenesis
3. 学会等名 63rd International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木 由香, 落合翔, 遠藤 勇気, 鈴木 康友, 近藤 幸尋, 横山 知永子, 原 俊太郎
2. 発表標題 膀胱化学発がんにおける膜結合型プロスタグランジンE合成酵素(mPGES)-1の役割
3. 学会等名 フォーラム2023: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木由香、遠藤勇気、鈴木康友、近藤幸尋、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 プロスタサイクリン合成酵素の欠損は化学発がん剤誘導膀胱発がんを促進する
3. 学会等名 フォーラム2022：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木由香、遠藤勇気、鈴木康友、近藤幸尋、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 プロスタサイクリン合成酵素の欠損が 化学物質による膀胱発がんを促進するメカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsubasa Ochiai, Yuka Sasaki, Chieko Yokoyama, Hiroshi Kuwata, Shuntaro Hara
2. 発表標題 Prostacyclin exacerbates cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis
3. 学会等名 フォーラム2021：衛生薬学・環境トキシコロジー（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------