

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700388

研究課題名（和文）脳血栓症におけるプロスタノイド受容体の役割解明

研究課題名（英文）The roles of prostanoid receptor in cerebral infarction

研究代表者

小島 史章 (KOJIMA FUMIAKI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30550545

研究成果の概要（和文）：

脳梗塞の病態形成における PGE₂-EP₄ 系の役割を解明することを目的として、EP₄ 欠損マウスを用いて脳虚血の病態を反映する永久中大脳動脈閉塞モデルを対象とした解析を行った。その結果、EP₄ 欠損マウスにおける虚血後の脳浮腫の程度は、野生型マウスに比べて有意に軽減されることを見出した。ミクログリアの初代純培養系を用いた解析によって、脳内 PGE₂ が EP₄ を介してミクログリアにおける VEGF の発現を増強するように制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study was to investigate the roles of the prostaglandin E₂ receptor EP₄ in the ischemic brain injury. Cerebral ischemia was induced by permanent occlusion of the middle cerebral artery using mice lacking the EP₄ (EP₄^{-/-}). The brain edema in EP₄^{-/-} mice was significantly reduced when compared to that in wild-type (WT) mice. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF), which is shown to promote disruption of blood-brain barrier causing edema in ischemic brain, was up-regulated by an EP₄ agonist in WT microglia. The up-regulation was diminished in the presence of an EP₄ antagonist or absent in EP₄^{-/-} microglia. These results suggest that the EP₄ enhances edema progression in stroke, partly by regulating VEGF expression in microglia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：中枢・末梢神経薬理学、プロスタノイド

1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、標的細胞に存在する 4 種類の特異的受容体 (EP₁、

EP₂、EP₃、EP₄) を介し、多彩な作用を発揮する生理活性脂質である。脳虚血状態において、虚血周辺部位での PGE₂ の過剰産生が認

められており、脳梗塞を含む脳血栓症の病態形成における PGE2 の役割が注目されている。実際、PGE2 の産生に関わる酵素である COX-2 やその下流で PGE2 の産生に特異的に働く末端酵素である膜型 PGES-1 を欠損するマウスでは、中大脳動脈閉塞モデルでの脳梗塞サイズが、対照群に比べ減少することが報告されている。一方、各 EP 欠損マウスを用いた検討では、PGE2 は EP1 および EP3 を介して脳傷害的な作用を發揮するのに対して、EP2 を介して脳保護的な作用を示すという相反する作用が報告されている。これは、脳虚血時に産生された PGE2 が、その受容体亜型のいずれと結合するかにより、傷害の増強および軽減の両方の作用を發揮する可能性を示唆する。しかし、脳に高発現する EP4 の脳血栓症病態形成における役割については、これまで詳細な検討がされていなかった。

2. 研究の目的

EP4 を欠損させたマウスを用いて、脳梗塞の病態形成における PGE2-EP4 系の役割を解明することを目的として本研究をおこなった。

3. 研究の方法

本研究では、6~12 週齢の雄性野生型マウスおよび EP4 欠損マウスを用いて、脳虚血の病態を反映する脳血栓症モデルを対象とした解析を行った。先端部 4 mm に太さ 0.2 mm となるようにシリコンコーティングを施した、長さ 1.5 cm の 8-0 縫合糸モノフィラメントを作製した。次いで、麻酔下でマウスの左外径動脈を結紮したのち、左内頸動脈を経由して中大脳動脈に楔入して血流を遮断し、脳血栓症モデルを作成した。虚血は、レーザードップラー血流計を用いて確認した。脳虚血障害の程度は、神経症状の観察（運動機能障害の程度：Neurological deficit score を 5 段階に評価）、中大脳動脈支配領域とその辺縁領域の血流量の測定、梗塞サイズの測定（1 mm 厚に脳をスライスし Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) によって染色）によって評価した。なお、解析は、虚血 24 時間後の開頭時にフィラメントが中大脳動脈を閉塞していることが実体顕微鏡下で確認できた個体について行った。また、現在もっとも可能性の高い抗炎症の脳細胞標的と考えられるミクログリアの初代純培養系を用いて、炎症性虚血関連因子の発現に及ぼす特異的 EP4 アゴニストおよびアンタゴニストの効果をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

4. 研究成果

虚血直後の中大脳動脈支配領域とその辺縁領域の血流量はともに野生型マウスと

EP4 欠損マウスで同等に低下していた。また、虚血 24 時間後の中大脳動脈支配領域とその辺縁領域の血流量についても、野生型と EP4 欠損マウスで同等に低下しており、両群間に差異を認めなかった。虚血 24 時間後に摘出した脳をスライスして TTC 染色を施行したところ、EP4 欠損マウスの大脳全球のサイズに対する脳梗塞領域の割合 ($20.5 \pm 1.3\%$, $n=24$) は、野生型マウス ($20.2 \pm 0.9\%$, $n=28$) と同程度であった (図 1)。

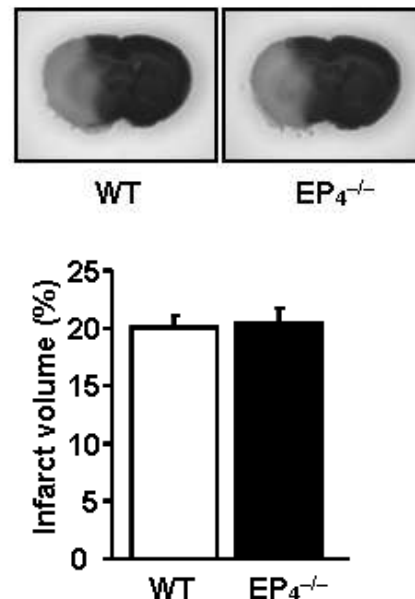


図 1 野生型および EP4 欠損マウスにおける脳梗塞サイズの比較

さらに、虚血 24 時間後における Neurological deficit score についても、EP4 欠損マウス (1.6 ± 0.2 , $n=25$) と野生型マウス (2.0 ± 0.2 , $n=29$) の両群間に有意な差を認めなかった (図 2)。

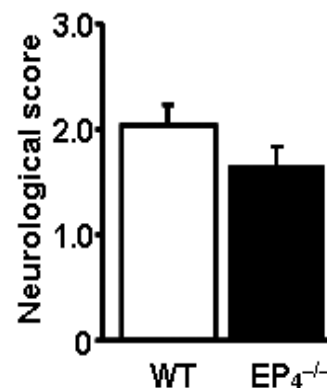


図 2 野生型および EP4 欠損マウスにおける運動機能障害の比較

一方、EP4 欠損マウスにおける虚血後の脳浮腫の程度は、野生型マウスに比べて有意に軽減された (図 3)。

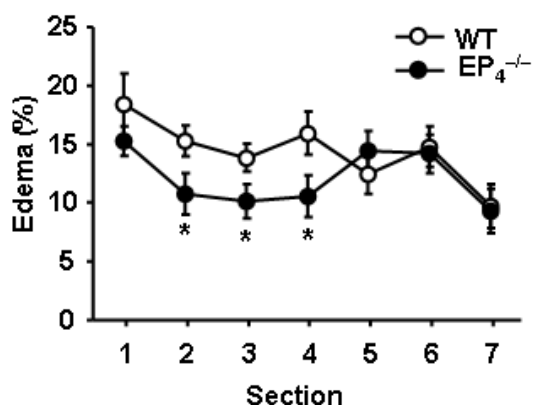


図 3 野生型およびEP4欠損マウスにおける脳浮腫の比較

そこで、脳梗塞進展過程を先導するような様式で順次活性化されて障害部位に集積するミクログリアの初代純培養系を用いて、脳浮腫関連分子のひとつである血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現に及ぼす EP4 アゴニストおよびアンタゴニストの効果について検討をおこなったところ (図 2)、野生型マウス由来のミクログリアにおける VEGF の mRNA 発現が、EP4 アゴニスト (ONO-AE1-329: 10^{-10} - 10^{-6} M) による 3 時間の刺激で、その用量に依存して増強されることを見出した。この作用は、EP4 欠損細胞ならびに EP4 アンタゴニスト (ONO-AE3-208: 10^{-6} M) の共存下で培養した野生型細胞では認められなかったことから、EP4 を介した反応であると考えられる。本研究によって、脳内 PGE2 が、EP4 を介してミクログリアにおける VEGF の発現を増強するように制御する可能性が示唆された。

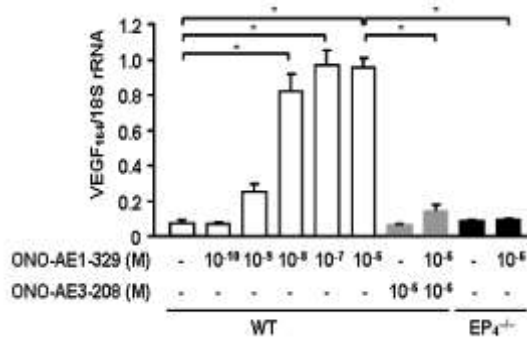


図 4 ミクログリアの VEGF 発現に対する EP4 標的薬物の効果

上記の結果より、PGE2-EP4 系が脳梗塞病態における浮腫の増悪に寄与する可能性が示された。また、この機構には VEGF 発現の制御が関与する可能性が示唆された。

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 15 件)

- ① Naoki Nakagawa, Koh-ichi Yuhki, Jun-ichi Kawabe, Takayuki Fujino, Osamu Takahata, Maki Kabara, Kazutoshi Abe, Fumiaki Kojima, Hitoshi Kashiwagi, Naoyuki Hasebe, Kenjiro Kikuchi, Yukihiro Sugimoto, Shuh Narumiya, Fumitaka Ushikubi. The intrinsic prostaglandin E2-EP4 system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice. *Kidney Int.* In press. (査読有)
- ② 結城幸一、柏木仁、小島史章、牛首文隆：エイコサノイド. *臨床検査* 56: 145-150, 2012 (査読無)
- ③ Fumiaki Kojima, Rahul G. Matnani, Shinichi Kawai, Fumitaka Ushikubi, Leslie J. Crofford. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatoid arthritis. *Inflamm Regen.* 31:157-166, 2011. (査読有)
- ④ Matthew R McCann, Roxana Monemdjou, Parisa Ghassemi-Kakroodi, Hassan Fahmi, Gemma Perez, Shangxi Liu, Xu Shi-wen, Sunil K Parapuram, Fumiaki Kojima, Christopher P Denton, David J Abraham, Johanne Martel-Pelletier, Leslie J Crofford, Andrew Leask, Mohit Kapoor. mPGES-1 null mice are resistant to bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 13:R6-15, 2011. (査読有)
- ⑤ Seetha U. Monrad, Fumiaki Kojima, Mohit Kapoor, Emma L. Kuan, Sujata Sarkar, Gwendalyn Randolph, Leslie J. Crofford. Genetic deletion of mPGES-1 abolishes PGE2 production in murine dendritic cells and alters the cytokine profile, but does not affect maturation or migration. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 84:113-121, 2011. (査読有)

- ⑥ Koh-ichi Yuhki, Fumiaki Kojima, Hitoshi Kashiwagi, Jun-ichi Kawabe, Takayuki Fujino, Shuh Narumiya, Fumitaka Ushikubi. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther.* 129:195-205, 2011. (査読有)
- ⑦ Chad Csepegi, Min Jiang, Fumiaki Kojima, Leslie J. Crofford, Andrey Frolov. Somatic cell plasticity and Niemann-Pick Type C2 protein: Fibroblast activation. *J Biol Chem.* 286:2078-87, 2011. (査読有)
- ⑧ 結城幸一、柏木仁、小島史章、牛首文隆：III. 病因と病態生理 メタボリックシンドローム発症にかかわるその他の液性および神経性因子 内因性カンナビノイド系. *日本臨牀 増刊号* 69: 331-335, 2011 (査読無)
- ⑨ 結城幸一、柏木仁、小島史章、牛首文隆：プロスタノイド受容体ノックアウトマウス. *The Lipid* 22: 4-11, 2011 (査読無)
- ⑩ Shuhko Kuriyama, Hitoshi Kashiwagi, Koh-ichi Yuhki, Fumiaki Kojima, Takehiro Yamada, Takayuki Fujino, Akiyoshi Hara, Koji Takayama, Takayuki Maruyama, Akitoshi Yoshida, Shuh Narumiya, Fumitaka Ushikubi. Selective activation of the prostaglandin E2 receptor subtype EP2 or EP4 leads to inhibition of platelet aggregation. *Thromb Haemost.* 104:796-803, 2010. (査読有)
- ⑪ Natsuko Kusunoki, Kanako Kitahara, Fumiaki Kojima, Nahoko Tanaka, Kaichi Kaneko, Hirahito Endo, Toru Suguro, Shinichi Kawai. Adiponectin Stimulates Prostaglandin E2 Production in Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 62:1641-1649, 2010. (査読有)
- ⑫ Koh-ichi Yuhki, Hitoshi Kashiwagi, Fumiaki Kojima, Jun-ichi Kawabe, Fumitaka Ushikubi. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int. Angiol.* 29:19-27, 2010. (査読有)
- ⑬ 小島史章、結城幸一、柏木仁、牛首文隆：プロスタグランジン E1 および E2 とその代謝産物. *日本臨牀* 68: 20-24, 2010 (査読無)
- ⑭ 結城幸一、小島史章、柏木仁、牛首文隆：プロスタグランジン I2 とその代謝産物. *日本臨牀* 68: 29-32, 2010 (査読無)
- ⑮ 結城幸一、小島史章、柏木仁、牛首文隆：炎症・免疫分野とノーベル賞 1992 年生理・医学賞：生体制御機構としての可逆的蛋白リン酸化の発見 (受賞者：Edmond H. Fischer, Edwin G. Krebs)・1994 年生理・医学賞：G 蛋白質およびそれらの細胞内情報伝達における役割 (受賞者：Alfred G. Gilman, Martin Rodbell). *炎症と免疫* 18: 73-78, 2010 (査読無)
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 柏木 仁、結城幸一、小島史章、酒井芳紀、成宮周、牛首文隆 トロンボキサン A2 合成酵素の阻害は連用に伴うプロスタグランジン I2 受容体アゴニストの作用減弱を抑制する 第 85 回日本薬理学会年会，2012 年 3 月 14 日，国立京都国際会館（京都）
- ② 桑井志麻、結城幸一、小島史章、柏木 仁、奥村利勝、成宮周、牛首文隆 プロスタグランジン I2 の非アルコール性脂肪性肝炎の発症・進展における役割解明 第 85 回日本薬理学会年会，2012 年 3 月 14 日，国立京都国際会館（京都）
- ③ 柏木 仁、結城幸一、小島史章、酒井芳紀、牛首文隆 トロンボキサン A2 合成酵素の阻害はプロスタグランジン I2 受容体の脱感作を抑制する 第 63 回日本薬理学会北部会，2011 年 9 月 30 日，江陽グランドホテル（仙台）
- ④ 中川直樹、結城幸一、小島史章、柏木 仁、藤野貴行、川辺淳一、長谷部直幸、牛首文隆 腎間質線維化におけるプロスタグランジン E2-EP4 系の役割 第 63 回日本薬理学会北部会，2011 年 9 月 30 日，江陽グランドホテル（仙台）
- ⑤ Shima Kumei, Koh-ichi Yuhki, Fumiaki Kojima, Hitoshi Kashiwagi, Toshikatsu Okumura, Shuh Narumiya, Fumitaka Ushikubi. Facilitated progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice lacking the prostaglandin I2 receptor. *Keystone Symposia, Lipid Biology and Lipotoxicity*, 2011 年 5 月 17 日，INEC

Killarney (Ireland)

- ⑥ 桑井志麻、結城幸一、小島史章、柏木 仁、奥村利勝、成宮周、牛首文隆 プロスタグランジン I2 の非アルコール性脂肪性肝炎の発症・進展における役割解明 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22 日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑦ 桑井志麻、結城幸一、小島史章、柏木 仁、奥村利勝、牛首文隆 プロスタグランジン I2 の非アルコール性脂肪性肝炎の発症・進展における役割解明 第 38 回薬物活性シンポジウム・第 20 回日本循環薬理学会, 2010 年 11 月 12 日, 札幌市教育文化会館 (北海道)
- ⑧ 柏木 仁、栗山周子、結城幸一、小島史章、成宮 周、牛首文隆 プロスタグランジン E2 受容体サブタイプ EP4 の抗血小板療法ターゲットとしての可能性 第 38 回薬物活性シンポジウム・第 20 回日本循環薬理学会, 2010 年 11 月 11 日, 札幌市教育文化会館(北海道)
- ⑨ Rahul G. Matnani, Fumiaki Kojima, Jerold G. Woodward, Leslie J. Crofford. Reduced T-cell-dependent humoral immune response in microsomal prostaglandin E synthase-1 null mice. 74th American College of Rheumatology (ACR) National Scientific Meeting, 2010 年 11 月 9 日, Georgia World Congress Center (Georgia)
- ⑩ 桑井志麻、結城幸一、柏木 仁、小島史章、奥村利勝、牛首文隆 非アルコール性脂肪性肝炎の発症 進展におけるプロスタグランジン I2 の役割解明 第 61 回日本薬理学会北部会, 2010 年 9 月 10 日, 札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑪ 小島史章 関節リウマチにおける膜型 PGE 合成酵素-1 の役割 第 31 回日本炎症・再生医学会, 2010 年 8 月 5 日, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑫ Fumiaki Kojima, Akimasa Ri, Koh-ichi Yuhki, Yasuhiro Suzuki, Hitoshi Kashiwagi, Shuh Narumiya, Fumitaka Ushikubi. Prostaglandin E2 exacerbates ischemic brain injury via the EP4 receptor subtype in mice subjected to a middle cerebral artery occlusion. Keystone Symposia, Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases, 2010 年 6 月 9 日, ウェスティン都ホテル京都 (京都

府)

- ⑬ Koh-ichi Yuhki, Chun-Yang Xiao, Akiyoshi Hara, Hitoshi Kashiwagi, Fumiaki Kojima, Shuh Narumiya, Fumitaka Ushikubi. Prostaglandin E2 protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP3. Keystone Symposia, Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases, 2010 年 6 月 9 日, ウェスティン都ホテル京都 (京都府)
- ⑭ Hitoshi Kashiwagi, Shuhko Kuriyama, Koh-ichi Yuhki, Fumiaki Kojima, Takayuki Maruyama, Shuh Narumiya, Fumitaka Ushikubi. Prostaglandin E2 receptor subtype EP2 and EP4 emerge as novel targets for anti-platelet therapy. Keystone Symposia, Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases, 2010 年 6 月 8 日, ウェスティン都ホテル京都 (京都府)

[図書] (計 1 件)

- ① Fumiaki Kojima, Mohit Kapoor: Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 in the pathophysiology of osteoarthritis. 'Understanding Osteoarthritis from Bench to Bedside' Edited by Johanne Martel-Pelletier & Jean-Pierre Pelletier. P27-37. Research Signpost, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 史章 (KOJIMA FUMIAKI)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：30550545

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし