

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791489

研究課題名(和文)脳血栓症におけるシステイニルロイコトリエンの機能解析

研究課題名(英文)The role of cysteinyl leukotrienes in thrombosis

研究代表者

伊藤 明博 (Ito, Akihiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10609598

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)：システイニルロイコトリエンは、アラキドン酸から5-lipoxygenase pathwayにより合成される多彩な生理機能を有する脂質メディエーターである。我々は、ロイコトリエンC4(LTC4)による血小板活性化現象を明らかにし、その受容体下流の細胞内シグナルを解析し、インテグリンA2B3の活性化を引き起こす経路を明らかにした。また、生体内血栓形成モデルを作成し、ノックアウトマウスを用いて実験を施行し、生体内におけるシステイニルロイコトリエン受容体の意義を明らかにし、脳血栓症における役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cysteinyl leukotrienes are a family of lipid mediators synthesized from arachidonic acid through the 5-lipoxygenase pathway. We demonstrated that leukotriene C4 (LTC4) were potent to inducer of murine platelet aggregation and clarify their potential roles in the pathogenesis of cardiovascular/cerebrovascular disease using the in vivo thrombosis model with knockout mouse of the receptor of CysLTs.

研究分野：脳血管障害

キーワード：システイニルロイコトリエン 血小板凝集

1. 研究開始当初の背景

本研究は申請者がこれまでに解析をすすめている、多彩な生理機能を有する脂質メディエーターであるシステインロイコトリエンについて、脳梗塞、脳血栓症における役割を分子生物学的手法と実験動物(マウス)を用いて明らかにすることを目的とする。システインロイコトリエンは、細胞膜から遊離されるアラキドン酸が5-リポキシゲナーゼ等の酵素により代謝、合成される脂質メディエーターである。代表的なものにロイコトリエンC4(LTC4)、ロイコトリエンD4(LTD4)、ロイコトリエンE4(LTE4)等が知られている。また、システインロイコトリエンに対する受容体として、当研究室において、システインロイコトリエン第1受容体(CysLT1)と第2受容体(CysLT2)が同定されており、喘息、肺線維症などの炎症性疾患に強い影響をもたらすことが示されている。

なお、本研究の成果は脳梗塞の新しい機序の解明につながるだけでなく、新規治療法の開発の大きな足がかりになることが期待される。

現在、抗血小板薬としては、アスピリン(シクロオキシゲナーゼ阻害薬)が世界で最も良く知られ、最も使用されている。しかしながら、近年の大規模臨床研究/ゲノム解析にて、脳梗塞・心筋梗塞関連因子として、シクロオキシゲナーゼ(COX-1, COX-2)経路ではなく、逆に、5-LOX(5-リポキシゲナーゼ)/ロイコトリエン経路が同定されてきたことは、大きな驚きとともに、大きな課題を世界に与えた。現在、この疑問に対する解明が急がれている中、申請者が2011年に報告したロイコトリエンC4(LTC4)による血小板凝集作用(2011 FASEB summer research conference)は、この疑問に対する一つの答えとなる可能性があり、脳梗塞をはじめとする血栓症の解明に大きな貢献をする可能性をもっていると考えられる。

また、炎症性マクロファージにはシステインロイコトリエンの産生能があることが知られており、一方で、マクロファージの浸潤を認める動脈硬化病変においてはシステインロイコトリエン受容体が発現していることが示唆されている。従って、システインロイコトリエンが動脈硬化病変に何らかの影響を及ぼすことは強く予想される。現在のところ、未だその機序の解明がなされていない。システインロイコトリエンと動脈硬化との関連性の有無、機序の解明がなされ

ば、動脈硬化に対する治療、さらには、血栓症、塞栓症に対する治療に大きな貢献を果たす可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

血栓症に関与すると考えられる5-リポキシゲナーゼ代謝産物に関して、申請者は血小板凝集に対する影響を検討した。その結果、LTC4に強い血小板凝集能がある事を見いだした。以前よりこのLTC4に対する受容体の存在が2種類(現在3種類)確認されており、これらのCysLT受容体につき、これらの欠損マウスを使用し、この血小板凝集作用の詳細なメカニズムを解明し、生体内における血栓症について検討する。また、動脈硬化における動物モデルを使用し、動脈硬化とロイコトリエンとの関係について、また、その臨床的意義について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

血小板凝集について、細胞膜上、細胞内におけるLTC4の下流シグナルを解析し、血小板活性化にいたるメカニズムを解明する。また、動物的血栓形成モデルを用いて、LTC4の生体内における血栓形成への関与、その臨床的意義を明らかにする。さらに、頸部頸動脈における動脈硬化巣形成にLTC4が関与するかどうかの検討し、脳梗塞の原因となる頸部動脈硬化病変から血栓症を発症する過程におけるLTC4の関与の有無、その重要性について検討する。また、人における検体において、その重要性につき、確認をする。

なお、プロスタグランジンやロイコトリエンなどのエイコサノイド(アラキドン酸代謝物)に代表される脂肪酸系の生理活性脂質、血小板活性化因子(PAF)などの脂質メディエーターの一斉定量解析については、共同研究(リポドミクス研究室)において、LC-MS法による脂質メディエーターの高感度一斉定量法が確立されており、この測定方法を用いて、脂質プロファイルにおいては解析する。

方法1)

本研究においては、CysLTの各受容体の確実な選択的拮抗薬がないために、野生型、CysLT受容体欠損マウスの血液にて、血小板凝集実験、血栓形成実験を施行した。マウスの腹部下大静脈からクエ

ン酸入りの Buffer 下に血液を採取し、低速遠心にて PRP(Platelet rich plasma)を作成した。また、洗浄血小板 Buffer を用いて、PRP を遠心して、PPP(platelet poor plasma)を作成、洗浄血小板を作成した。PRP に LTC4、LTD4、LTE4 を各種濃度にて刺激し、Light transmission 法によりその凝集の程度、濃度依存性を検討した。また、ノックアウトマウスの PRP にて、CysLT 受容体の関与について検討した。また、PPP はそのコントロールとして使用した。CysLT 受容体は 7 回膜貫通 G タンパク質結合型受容体であり、Gq, Gi, G12/13 などの G タンパク質と結合する事により、その下流に各種のシグナルを伝達する事が知られている。そこで、CysLT の下流のシグナルを検索するため、洗浄血小板に対して LTC4、LTD4、LTE4 の刺激を与え、CysLT 受容体から G 蛋白質を介し、血小板活性化にいたるまでの下流シグナルを生化学的手法(ウェスタンブロッティング、ELISA、FACS)を用いて、Ca 上昇、cAMP、Rho 活性の解析した。さらに下流における VASP(vasodilator-stimulated phosphoprotein)や A2B3 インテグリンの活性化へのメカニズムについても検討をした。いずれも FACS を用いた flowcytometry にて解析を施行した。また、erk, PI3K, PKA 等の inhibitor を用いる事により、他の活性化経路に関しても解析を施行する。

方法 2)

生体内における LTC4、LTD4、LTE4 の意義を調べる為、血栓形成を促す実験的血栓形成モデルを用いて、CysLT 受容体欠損マウス、野生型マウスにおける血栓形成の程度を比較検討した。まず、今までに報告されている生体内における血栓形成モデルを作成、実験的動物モデルの安定した評価した。その後、独自の実験的血栓形成モデルを作成し、評価の安定性について検討し、また、LTC4 のみの関与による生体内血栓形成能を検証した。その後、血小板抗体などによる in vivo イメージング解析を施行し、実際に血小板血栓形成にいたるメカニズムに LTC4 がいかに関わるかを検証した。また、生体内の血栓形成過程におけるシステイニルロイコトリエンの定量解析を ELISA により施行

した。また、それとともに、脂質メディエーター群の一斉定量的解析(共同研究(脂質解析):クロマトグラフィー手法による脂質分離、質量分析計による同定(MSⁿ解析、精密質量分析)にて、血栓中の脂質メディエーターの濃度、変化を定量的質量分析にて施行し、血栓形成における局所 LTC4 濃度、実際の関与の程度を検証した。

方法 3)

ApoE 欠損マウスにおける実験的動脈硬化モデルを作成し、頸部の動脈硬化形成への LTC4-CysLT 受容体の関与を調べた。まず、ApoE 欠損マウスと CysLT 受容体欠損マウス、野生型マウスにて、ダブルノックアウトマウスを作成し、このダブルノックアウトマウスに通常飼料、High fat diet、あるいは、コール酸付加飼料を使用して飼育し、実験的動脈硬化モデルを作成した。さらに、頸部頸動脈の動脈硬化巣の形成を比較検討するため、飼料、飼育期間等を調整する事により、実験的動物モデルの評価系を確立する。また、頸部の動脈硬化部位におけるシステイニルロイコトリエンを含むエイコサノイドの脂質メディエーターの一斉定量解析を施行し、脂質メディエーターのプロファイルを明らかにした。さらには、動物実験にてシステイニルロイコトリエンと頸部の動脈硬化巣との関連を調べる為、CysLT1,2, LTC4 合成酵素などの遺伝子発現解析、蛋白質(プロテオーム)解析を施行する。また、頸部内頸動脈狭窄症手術検体における脂質成分の解析を行い、動脈硬化病変との関連性を検討する。

4 . 研究成果

結果 1)

マウスから採取した血小板に LTC4 刺激をして、CysLT 受容体から G 蛋白質を介し、血小板活性化にいたるまでのシグナルを解析するため、CAF による細胞内カルシウム上昇の検出、ELISA による細胞内 cAMP の解析、ウェスタンブロッティングによる Rho 活性、FACS による VASP(vasodilator-stimulated phosphoprotein)の関与、A2B3 インテグリン活性化等のメカニズムを検討した。最終的に、LTD4 より LTC4 により強い刺激が入る事が確認され、また、関与する

受容体、細胞、生合成経路を明らかにした。また、細胞膜における CysLT 受容体の刺激により、G タンパク質を介した Pathway を通して、血小板における強い A2B3 インテグリンの活性化へのメカニズム、シグナル経路を明らかにした。なお、VASP には著明な影響は与えなかった（論文投稿準備中）。

結果 2)

現在までに広く知られている FeCl₂ を頸動脈に塗布する血栓形成モデル、アラキドン酸を塗布する血栓形成モデル他を使用した実験においては、著明なシステイニルロイコトリエンの意義は証明できなかった。また、実際の血栓形成を反映しているとは考えられなかった。よって、我々は、明らかに血栓形成因子、脂質メディエーターの関与が反映される、より病態生理的に生体に近い条件で血栓形成を促す実験的血栓形成モデルを新たに作成した（論文投稿準備中）。

さらに、今回、新たに作成したモデルを用いて、CysLT 受容体欠損マウス、野生型マウスにおいて、血栓形成の程度を定量的に比較検討するための安定した評価系を確立し、CysLT 受容体の関与について検討をした。その結果、生体における血栓形成における CysLT 受容体と G タンパク質との関連が証明された（論文投稿準備中）。なお、血球成分（赤血球、白血球、血小板数）、血小板凝集能、生化学検査、凝固系検査などにおいて、CysLT 受容体欠損マウス、野生型マウスの間に著明な差異がないことが確認された事をふまえ、目的の遺伝子欠損による他因子による個体差でなく、システイニルロイコトリエンが確実に血栓形成に影響する事が証明された。

さらには、脳梗塞等の評価も同時に施行する際に、血栓症の影響か、脳梗塞の影響かを鑑別評価するために、脳漕のみに確実に薬物を投与し、体内（血管内）投与による影響ではなく、脳内のみにおける影響が評価できる新たな薬物投与方法を確立した (Acta Neurobiol Exp 73 (2013): 304-311.)。これにより、投与経路が限られている薬剤での脳内のみにおける効果の確認が可能となった。

また、in vivo imaging にて、ロイコトリエンとその受容体の効果が確認され、生体中における血栓形成過程が明らかとなった。また、血栓中における脂質メディエーターの関与を定量的質量分析にて施行したが、血栓形成における局所 LTC₄ 濃度の測定は量的に困難であり、現在のところ、測定感度、測定方法は確立されていないため、in vivo における実質的な関与の詳細については今後の検討を要

することとなった。

結果 3)

ApoE 欠損マウスにおける各種実験的動脈硬化モデルを作成し、コール酸付加飼料にて飼育することで、定量的に安定な動脈硬化形成モデルの作成に成功した。また、頸部頸動脈の動脈硬化形成におけるシステイニルロイコトリエンを含むエイコサノイドの脂質メディエーター—斉定量解析を施行し、脂質プロファイルを検討した。各種動脈硬化巣における脂質メディエーターには、動脈硬化に関わる特徴的な変化が認められた。その後、ApoE 欠損マウスと CysLT 受容体欠損マウス、野生型マウスにて、ダブルノックアウトマウスを作成し、コール酸付加飼料にて飼育する動脈硬化形成モデルを作成し、実験解析した。しかしながら、システイニルロイコトリエン受容体欠損 × ApoE 欠損マウスを用いた実験を複数回施行するも、今回の条件においては、野生型との間に頸部頸動脈の動脈硬化巣の程度、その詳細な部位、大きさ、石灰化の検討において、その著明な変化は認められなかった。また、頸部動脈硬化部位におけるシステイニルロイコトリエン、また、脂質プロファイルにて脂質メディエーターの関与についても解析したところ、動脈硬化との明確な因果関係は認められなかった。最終的に動脈硬化と LTC₄-CysLT 受容体 pathway の関与において、多方向からその可能性を探索したが、現在のところ、有意義な結果は得られなかった。

今回、我々は、ロイコトリエン C₄ (LTC₄) による血小板活性化現象を明らかにし、その受容体下流の細胞内シグナルを解析し、インテグリン A2B3 の活性化を引き起こす経路を明らかにした。また、生体内血栓形成モデルを作成し、ノックアウトマウスを用いて実験を施行し、生体内におけるシステイニルロイコトリエン受容体の意義を明らかにし、脳血栓症における役割を明らかにした。今回は、頸部頸動脈の動脈硬化病変との因果関係については、明らかな知見は得られなかったものの、現在までの各種知見を鑑み、ロイコトリエン等の脂質メディエーターとの関連について、血栓症のみならず、動脈硬化病変、脳梗塞などの血管病変との関

連性についても、今後、さらなる研究、
新たな知見を積み重ねていく予定である。

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1件)

1) Chen, Y., Imai, H., Ito, A., & Saito, N.
Novel modified method for injection into the cerebrospinal fluid via the cerebellomedullary cistern in mice. Acta Neurobiol Exp 73 (2013): 304-311.

〔学会発表〕(計3件)

1) 伊藤明博、柳田圭介、石井聡、齊藤延人

清水孝雄 血小板活性化における5-リポキシゲナーゼ代謝産物の役割
第37回日本脳卒中学会 福岡
2012.4.28.

2) T. Ochi, H. Nakatomi, H. Ono, S. Miyawaki, H. Horikawa, A. Ito, H. Imai, N. Saito NEURONAL REGENERATION WITHIN SUBVENTRICULAR ZONE OF ADULT RAT AFTER CYTOSINE ARABINOSIDE INTRAVENTRICULAR INJECTION
BRAIN 2013 (ポスター), Shanhaigh(中国)
2013.5.22

3) T. Ochi, H. Nakatomi, A. Ito, H. S. Okabe, N. Saito, M. Nakafuku SPATIOTEMPORAL RESPONSE OF NEURAL PROGENITORS IN THE ADULT SUBVENTRICULAR ZONE TO EXOGENOUS GROWTH FACTOR STIMULI.
BRAIN 2015 (ポスター), Bancoover (カナダ)
2015.6.29

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤明博 (AKIHIRO ITO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10609598

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: