

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670124

研究課題名(和文)糖質コルチコイドの心プロスタノイド産生系制御とその病態生理的意義の解明

研究課題名(英文)Regulation of cardiac prostanoid synthesis by glucocorticoid and its pathophysiological meaning

研究代表者

牛首 文隆 (USHIKUBI, Fumitaka)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：50243035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、糖質コルチコイドが心臓におけるプロスタノイド産生系を活性化するという報告があるが、その詳細は不明である。一方、プロスタノイドは心筋梗塞や圧負荷心肥大の病態形成において重要な役割を果たす。そこで本研究は、糖質コルチコイドの心プロスタノイド産生系制御の詳細と、その心疾患病態形成における意義の解明を目指した。糖質コルチコイドは、COX-1やL-PGDSなどのプロスタノイド産生酵素およびFPやEP2などのプロスタノイド受容体の心臓における発現を誘導した。また、副腎摘出マウスの系を確立した。今後、副腎摘出マウスに心筋梗塞や圧負荷心肥大モデルを適用した解析を実施する。

研究成果の概要(英文)：Recently, glucocorticoid has been reported to up-regulate cardiac prostanoid synthesis. However, the precise mechanism of this regulation remains to be clarified. On the other hand, the prostanoids play an important role in the pathogenesis of acute myocardial infarction and pressure overload-induced cardiac hypertrophy. The aims of this study are to clarify the regulatory action of glucocorticoid on cardiac prostanoid synthesis and its role in the pathogenesis of cardiac diseases. Glucocorticoid induced up-regulation of COX-1 and L-PGDS, the enzymes for prostanoid biosynthesis, and prostanoid receptors FP and EP2 in the heart. Because we established the murine model of adrenal ablation, we would like to examine the pathophysiology of these mice subjected to cardiac infarction or cardiac pressure overload.

研究分野：薬理学

キーワード：糖質コルチコイド プロスタノイド 心臓

1. 研究開始当初の背景

糖質コルチコイドは、強力な抗炎症作用を示すが、その主要な機構の一つは炎症のメディエーターであるプロスタノイドの産生抑制と考えられている。一方、糖質コルチコイドが心臓においてプロスタノイド産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 の発現を増強すること、ある種のプロスタノイドの産生を増加させることが報告されている。しかし、これらの作用の病態生理的意義については不明な点が多く、当該分野の研究は遅れていた。

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成る生理活性脂質であり、各々特異的な受容体を介して作用を発揮する。PGD₂、PGE₂、PGF₂、PGI₂、TXA₂ の受容体として DP、EP、FP、IP、TP があり、EP には EP1~EP4 の 4 種類のサブタイプが存在する。我々は、これら受容体の欠損マウスを用いた従来の研究過程で、プロスタノイドの心臓疾患病態形成における役割を示唆する結果を得ている。

2. 研究の目的

本研究は、糖質コルチコイドの心プロスタノイド産生系制御機構の詳細を明らかにすること、また 8 系統の各プロスタノイド受容体欠損マウスと *in vivo* 疾患解析モデルを用いて糖質コルチコイドの心疾患病態形成における役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 糖質コルチコイドの心プロスタノイド産生系制御の解析

プロスタノイドの生合成は、まず刺激を受けた細胞のホスホリパーゼ A₂ (主に細胞質型 cPLA₂) が活性化されて開始する。ついで、cPLA により切り出されたアラキドン酸にシクロオキシゲナーゼ (COX) が作用し、プロスタノイドの共通の前駆体であるプロスタグランジン (PG)H₂ が生成する。COX には常在型の COX-1 と誘導型の COX-2 が存在する。最後に、PGH₂ に各プロスタノイド特異的な合成酵素 (PG 合成酵素群) が作用し、5 種類のプロスタノイドが生成する。本解析では、糖質コルチコイドのこれらプロスタノイド生合成に係わる酵素の発現制御やプロスタノイド産生調節の詳細を明らかにする。

糖質コルチコイドの心プロスタノイド生合成酵素群の発現制御の解析

外因性糖質コルチコイドの、マウス心臓での cPLA₂、COX、PG 合成酵素群 (特に PGE₂、PGI₂、TXA₂ 合成酵素) の発現に対する作用を、RT-PCR あるいは Western ブロットを用いて解析する。また、副腎皮質摘除後のこれら酵素の発現動態を解析する。また、心筋あるいは非心筋細胞培養系を用い、同様の発現解析を実施し、併せて標的細胞の同定を試みる。

糖質コルチコイドの心プロスタノイド産生制御の解析

糖質コルチコイドの、マウス心臓でのプロスタノイド産生に対する作用を解析する。実際には、外因性糖質コルチコイド投与後の心臓組織中プロスタノイド含有量の動態を RIA あるいは LC/MS/MS を用いて定量し解析する。また、副腎皮質摘除後のプロスタノイド産生の動態を解析する。また、心筋あるいは非心筋細胞培養系を用い、同様の解析を実施する。

糖質コルチコイドの心プロスタノイド生合成酵素群の発現・活性制御機構の解析

心筋あるいは非心筋細胞培養系を用い、糖質コルチコイドのプロスタノイド生合成酵素の発現や活性制御の機構を解析する。実際には、糖質コルチコイドの既知の細胞内情報伝達機構の関与を考慮して、様々なキナーゼ群や転写因子の活性あるいは酵素メッセージの安定性に対する効果を解析する。

(2) 心虚血・再灌流モデルを用いた糖質コルチコイドの役割解析

心筋梗塞は、現在先進国における主要な死因の一つとなっており、その病態解明や治療法の確立が急務となっている。また、心筋梗塞の基本病態は、心臓の虚血・再灌流傷害と考えられている。本解析では、糖質コルチコイドの心プロスタノイド産生系への作用を介した、心虚血・再灌流傷害病態形成における役割を明らかにする。

冠動脈結紮・再灌流モデルを用いた解析

マウスの冠動脈前下行枝を一定時間結紮し、その後血流を再開通することにより虚血・再灌流傷害を惹起する。特殊染色した摘出心臓の虚血領域と梗塞領域のサイズ

を、コンピュータ画像解析により測定する。この時、外因性糖質コルチコイドの前処置により、野生型マウスの梗塞サイズの変化を解析する。また、EP₄やIPなど心虚血・再灌流傷害病態形成に関与する受容体を含め、各プロスタノイド受容体欠損マウスでの外因性糖質コルチコイドの前処置の有無あるいは副腎皮質摘除による梗塞サイズの変化を解析する。

摘出灌流心臓を用いた解析

心臓摘出灌流モデルでは、心臓への神経因子や体液因子の影響を除外できる。まず、ペーシング下に、虚血および虚血-再灌流負荷を加え、心機能障害の程度を評価する。また、心筋組織からの逸脱酵素を測定し、心筋細胞障害の程度を解析する。この時、外因性糖質コルチコイド前処置した野生型マウスの心機能・心筋細胞傷害の変化を解析する。また、各プロスタノイド受容体欠損マウスでの外因性糖質コルチコイドの前処置の有無あるいは副腎皮質摘除による、摘出心臓の心機能・心筋細胞傷害の変化を解析する。

糖質コルチコイドの心虚血・再灌流傷害でのプロスタノイド産生への効果の解析

心臓の虚血・再灌流傷害時には、COX-2 が発現誘導され、プロスタノイド産生が亢進すると考えられる。そこで、心筋の虚血・再灌流傷害時のプロスタノイド産生を、心臓組織中プロスタノイド含有量の定量で解析する。また、プロスタノイド産生に対する外因性糖質コルチコイドあるいは副腎皮質摘除の効果解析する。

(3) 圧負荷心肥大モデルを用いた糖質コルチコイドの役割解析

慢性心不全は、現在先進国における主要な死因の一つとなっており、その病態解明や治療法の確立が急務となっている。また、慢性心不全は高血圧症に伴う圧負荷心肥大の破綻に起因することが多い。本解析では、糖質コルチコイドの心プロスタノイド産生系への作用を介した、圧負荷心肥大病態形成における役割を明らかにする。

圧負荷心肥大モデルを用いた解析

マウスの心臓に圧負荷を加えて心肥大を

誘発する。まず、摘出心臓の心筋細胞肥大と間質線維化の程度を解析する。また、心肥大の遺伝子マーカーであるANPの発現動態を解析する。さらに、各プロスタノイド受容体欠損マウスでの、外因性糖質コルチコイドの前処置の有無あるいは副腎皮質摘除による圧負荷心肥大の変化を解析する。

糖質コルチコイドの圧負荷心肥大でのプロスタノイド産生への効果の解析

圧負荷に伴う心プロスタノイド産生に対する糖質コルチコイドの効果を、心臓組織中プロスタノイド含有量の定量で解析する。また、プロスタノイド産生に対する外因性糖質コルチコイドあるいは副腎皮質摘除の効果解析する。

4. 研究成果

(1) 糖質コルチコイドによる心プロスタノイド産生系の調節

糖質コルチコイドは、プロスタノイド産生に係わる酵素群のうち、COX-1とL-PGDSの心臓における発現を有意に亢進させた。一方、COX-2、mPGES-1、mPGES-2、cPGES、PGISの発現には影響を与えなかった。この結果、糖質コルチコイドは、心臓におけるプロスタノイド、特にPGD₂の産生を増加させると考えられた。

(2) 糖質コルチコイドによる心プロスタノイド受容体の発現調節

糖質コルチコイドは、プロスタノイド受容体のうち、FPとEP₂の心臓における発現を有意に亢進させた。一方、IP、TP、EP₃、EP₄の発現には影響を与えなかった。また、DPとEP₁の心臓における発現は、確認できなかった。

(3) 副腎摘出マウスの確立と心筋梗塞モデル

マウスの副腎を摘出すると、1~2週で死亡するが、飲料水にてNaClを補給することで生存可能であった。副腎摘出により、術後7日での血中コルチコステロン濃度は、術前値の10%程度に低下することを確認した。また、副腎摘出マウスの冠動脈を結紮した時、通常認められる血中コルチコステロン濃度の上昇が消失していた。現在、このマウスを用い、心筋梗塞の病態形成における糖質コルチコイドの役割を解析している。

5. 主な発表論文等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

牛首 文隆 (USHIKUBI, Fumitaka)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：50243035

(2)研究分担者

結城 幸一 (YUHKI, Koh-ichi)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80302420

柏木 仁 (KASHIWAGI, Hitoshi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60510609