

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860614

研究課題名(和文) EP4シグナルによる血管弾性線維形成・分解のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The Role of Prostaglandin E2 Receptor EP4 Signaling in the Vascular Smooth Muscles

研究代表者

市川 泰広 (Ichikawa, Yasuhiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：10555121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤や動脈硬化ではプロスタグランジンEの産生が亢進していることが知られている。本研究ではEP4過大発現マウスを使用して血管平滑筋EP4シグナルが弾性線維に及ぼす影響を検討した。アンジオテンシンを負荷した状態の大動脈ではコントロール群に比べて過大発現群で、弾性線維の分解を促進する、MMP-2、MMP-9の酵素活性が上昇していた。血管弾性を測定するとEP4過大発現マウスで血管弾性が低下していた。これらの結果より血管平滑筋のEP4シグナルはアンジオテンシンII存在下で弾性線維の分解が亢進することで血管弾性を低下させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elasticity contributes to mechanical properties of the arteries and loss of elastic properties exacerbates aortic aneurysms (AA). It is well known that prostaglandin E2 (PGE2) synthesis is enhanced in AA. We have demonstrated that the PGE2 receptor EP4 was abundantly expressed in smooth muscle cells (SMCs) from human AA tissues. We examined whether PGE2-EP4 signaling in SMCs decreases elasticity in the aorta. We generated mice with vascular smooth muscle-specific overexpression of human EP4 using the Cre-loxP system. After angiotensin II (ATII) infusion, however, the aorta of EP4TG were deformed and enlarged to a greater degree than that of EP4NTG. Further, elasticity was decreased in EP4TG than in EP4NTG. MMP-2 activity of EP4TG is higher than that of EP4NTG in the basal condition by gelatin zymography. MMP-9 activity was also abundant in EP4TG under ATII treatment. EP4 signaling in SMCs is suggested to be decreased aortic elasticity by promoting the degradation of elastic fibers.

研究分野：血管生物学

キーワード：EP4 大動脈瘤 血管平滑筋 MMP

### 1. 研究開始当初の背景

血管弾性線維は動脈の構造、機能を保つ上で極めて重要な働きをしている。血管弾性を生じるのは大動脈に層状に存在する弾性線維の働きによるものであり、伸び縮みする性質(弾性)により血管は高い血圧にも耐えられるようになっている。

動脈硬化や動脈瘤などの動脈硬化性疾患では血管壁局所の炎症性反応をおこし、プロスタグランジンなどの炎症物質が病変血管部に作用することで進行する。この過程で弾性線維が劣化・断裂し、血管壁の弾力が失われると血管機能低下が生じる。弾性線維の分解に関与しているのがマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)である。MMPは細胞外基質タンパク分解酵素群の総称であり、動脈硬化部位において弾性線維の構成要素であるエラスチンなどを分解して動脈壁を脆弱化させている。動脈管平滑筋細胞でプロスタグランジンや EP4 刺激によりリシルオキシダーゼが減少し、弾性線維の形成が抑制されること、大動脈瘤マウスモデルにおいて EP4 の抑制が大動脈瘤形成を抑制し、EP4 抑制剤の治療応用の可能性がこれまでの研究から明らかになっている。プロスタグランジンが動脈硬化部位でマクロファージなどの炎症細胞から分泌されること、動脈管や動脈硬化のなれの果てである大動脈瘤では弾性線維形成が疎で EP4 が多く発現していることはよく知られている。しかし、大動脈において血管平滑筋 EP4 シグナルが弾性線維を減少させ、動脈硬化を進行させるかは不明である。弾性線維の形成に関しては以前より弾性を生じるもととなるエラスチン、エラスチンを架橋するリシルオキシゲナーゼが知られていたが、近年と足場タンパクであるフィブリリン 1,2、弾性線維形成を誘導する DANCE などの新しい構成タンパクが同定されてきた(Nakamura T, Nature 2002)。弾性線維の分解に関与しているマトリックスプロテアーゼ(MMP)に関しては、動脈硬化部位において弾性線維の構成要素であるエラスチンなどを分解して動脈壁を脆弱化させている。(Curci JA, J Clin Invest 1998; Aikawa M, Circulation 1998)。

EP4 が弾性線維にどのように作用するかに関してはほとんど研究が行われていない。当教室では動脈管平滑筋細胞で EP4 刺激によりリシルオキシダーゼが減少し、弾性線維の形成が抑制されること(投稿中) EP4 抑制剤が大動脈瘤形成を抑制すること(Yokoyama U, 2012 Plos One)つまり EP4 シグナルにより弾性線維を制御できることをはじめて示した。

### 2. 研究の目的

動脈硬化疾患ではプロスタグランジンや、そのレセプターである EP4 が病変部の平滑筋層で上昇している。しかしプロスタグランジ

ンや EP4 シグナルがどのように血管硬化性疾患に関わっているか不明である。本研究では血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスを用いて、血管平滑筋 EP4 シグナルが弾性線維を減少させるメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

平滑筋 EP4 過大発現が弾性線維形成を抑制することを検討する。

先行研究で明らかにしたこと：

(1)血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスでは、大動脈に EP4 が過大発現していた。

(2)EP4 過大発現マウスの大動脈では血管弾性が低下していた。

これらの結果を受けて、初年度は血管弾性低下のメカニズムを血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスを用いて分子レベルで詳細に検討する。

25 年度は EP4 が弾性線維形成を抑制することを細胞レベルで検討した。生体内は複数の要素が混在しており、EP4 受容体は血管平滑筋だけでなくさまざまな臓器に存在するため、直接の因果関係として結論できない可能性があるため、はじめに細胞レベルの検討を行った。

血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスとコントロールマウスの大動脈を採取し、血管平滑筋の初代培養を行った。酵素処理後、血管外膜を除去し中膜を explant 法で行う培養方法は確立している。EP4 が過大発現していることを RT-PCR で確認したのちに実験を行った。

具体的には 2 種類のマウス由来の平滑筋細胞に EP4 刺激剤を加えた群と加えない群にわけて、弾性線維を構成している分子(エラスチン、リシルオキシダーゼ、フィブリリン)の遺伝子レベル、タンパクレベルの発現量を RT-PCR、ウエスタンブロット法を用いて測定した。

26 年度の研究方法は下記のとおりである。

平滑筋 EP4 過大発現が弾性線維を分解を促進することについて検討した。(in vitro)

初年度では弾性線維の形成に着目して弾性線維低下の機序を研究する予定であるが、引き続き次年度では EP4 が弾性線維の分解を促進するかどうか研究を進めた。初年度と同様に細胞レベルで検討した。具体的には 2 種類のマウス由来の平滑筋細胞に EP4 刺激剤を加えた群と加えない群にわけて、弾性線維を分解するマトリックスプロテアーゼ(MMP)の酵素活性をゼラチンザイモグラフィを用いて測定することを予定している。動脈硬化、大動脈瘤などの動脈硬化疾患に関係しているといわれている MMP-2、MMP-9、MMP-12 の酵素活性を中心に検討することを予定した。EP4 刺激剤投与で血管弾性の低下が進行す

るか検討した。(in vivo)  
細胞レベルでの EP4 刺激により弾性線維形成の抑制、分解の亢進を明らかにしたうえで、血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスの血管を用いて、EP4 シグナルが血管弾性に与える影響を検討した。血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスに EP4 刺激剤を投与することで、EP4 の効果をより鮮明に出来ることと、炎症が生じプロスタグランジンが分泌され、血管に EP4 が高発現している動脈硬化疾患を模倣することが可能になった。  
血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスおよびコントロールマウスの 2 種類のマウスに EP4 刺激剤を経口投与する群と水を経口投与する群を設定した。マウスに 4 週間 EP4 刺激剤を投与し、4 週間後にマウスを解剖し、大動脈を取り出し、組織学的検討、血管弾性測定、発現解析を行なった。

#### 4. 研究成果

大動脈平滑筋細胞に EP4 アゴニスト刺激を加え、弾性線維関連の発現の程度を PCR で測定したが、Elastin、Lysil Oxidase 等の弾性線維構成要素の発現に変化はみられなかった。血管平滑筋 EP4 過大発現マウスの解析結果を下記に示す。組織学的には Basal の状態では、弾性線維の性状、大動脈の径に関しては大きな違いはみられなかった。Basal の大動脈のマイクロアレイの結果から、弾性線維の構成要素である Elastin、Lysyl oxidase、Fibrillin-1、Fibrillin-2 は EP4TG でコントロールマウスに比べて差はなかった。弾性線維の分解に関することに関しては、Basal の状態では過大発現群で MMP-2 活性が有意に上昇していた。アンギオテンシンを負荷した状態の大動脈ではコントロール群に比べて過大発現群で、MMP-2、MMP-9 の酵素活性が上昇していた。また IL-6 をエライザを用いて測定するとコントロール群に比べて、過大発現群で上昇していた。

#### 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 3 件)

Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Ishikawa Y. Epac1-dependent phospholamban mediates the cardiac

response to stresses. *J Clin Invest.* 2014 2;124(6):2785-801、査読有

Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Kumagaya S, Ishiwata R, Fujita S, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki Kazuo, Yokota S and Ishikawa Y Decreased serum osmolality augments the closure of ductus arteriosus in neonates., *Cardiovasc Res*, 2014;104(2):326-36、査読有。

Ishiwata R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y. Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells Is a New Experimental Model for Studies of Vascular Elastic Fiber Formation, *Arteriosclerosis*, 2014 ;233(2):590-600、査読有

[学会発表](計 5 件)

Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y, Prostaglandin E2 receptor EP4 signaling in vascular smooth muscle cells decreases aortic elasticity, FASEB Experimental Biology, San Diego Convention Center, San Diego, CA, 米国 (2014 年 4 月 24 日)

Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Yokota S, Minamisawa S, Ishikawa Y, Prostaglandin E2 Receptor EP4 Signaling in Vascular Smooth Muscle Decreased Elasticity of the Aorta, AHA, Dallas Convention Center, Dallas, TX, 米国 (2013 年 11 月 7 日)

Yokoyama U, Aoki R, Ichikawa Y, Iwasaki S, Seki K, Nishimaki S, Yokota S, Minamisawa S, Ishikawa Y, Decreased Serum Osmolality Augments the Closure of the Ductus Arteriosus in Neonates, AHA, Dallas Convention Center, Dallas, TX, 米国(2013 年 11 月 7 日)

Ishiwata R, Yokoyama U, Inoue S, Ichikawa Y, Ishikawa Y, Anti-fibrotic Effect of Prostaglandin E2-EP4 in the Heart, AHA, Dallas Convention Center, Dallas, TX, 米国 (2013 年 11 月 7 日)

Yokoyama U, Jin M, Ishiwata R, Ichikawa Y, Minamisawa S, Ishikawa Y. The multiple roles of prostaglandin E and oxygen in the regulation of the ductus arteriosus. The 7th TAKAO International Symposium, オリンピック記念青少年総合センター、東京 (2013 年 7 月 20 日)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/>

6．研究組織

(1)研究代表者

市川 泰広 (Ichikawa Yasuhiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：10555121