

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860167

研究課題名(和文)血小板機能調節におけるプロスタグランジンF2 の役割解明

研究課題名(英文)The role of prostaglandin F2 alpha in the regulation of platelet function

研究代表者

柏木 仁(KASHIWAGI, Hitoshi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60510609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス血小板において、プロスタグランジン(PG)F2 が、本来の受容体であるFPではなくPGE2受容体サブタイプの一つであるEP3とトロンボキサンA2受容体のTPを介して血小板凝集を促進することを見出した。また、PGF2 の尾静脈投与は、マウスの尾の先端を切断した際の出血時間を短縮し、アラキドン酸を投与した際の血栓形成を促進させた。

以上の結果より、PGF2 が血小板凝集を促進し、止血機構や血栓の形成にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In murine platelets, PGF2 potentiated adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner, while PGF2 alone did not induce aggregation. In platelets lacking PGF2 receptor FP, however, PGF2 -induced potentiation was not significantly different from that in wild-type (WT) platelets. In contrast, the potentiation was significantly blunted in platelets lacking PGE2 receptor subtype EP3 or TXA2 receptor TP, and completely disappeared in platelets lacking both EP3 and TP. In vivo, intravenously administered PGF2 shortened the bleeding time in WT mice. Moreover, PGF2 increased mortality and thrombus formation in arachidonic acid-induced thromboembolism model.

In conclusion, PGF2 potentiates platelet aggregation via EP3 and TP, but not via FP, and the potentiating action may play important role under physiological and pathological conditions.

研究分野：薬理学

キーワード：血小板 プロスタグランジンF2 EP3受容体 TP受容体 受容体欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 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) よりなる生理活性脂質であり、生体において多彩な作用を示す。プロスタノイド受容体には、PGD₂、PGE₂、PGF₂、PGI₂、TXA₂ の受容体として DP、EP、FP、IP、TP が、さらに EP には EP₁~EP₄ の 4 種類のサブタイプが存在する。これらの受容体は、血小板を含めた心血管系に広く発現しており、近年その役割が注目されている。

(2) 血小板は、多様な作用により直接的および間接的に止血機構を制御している。従来、血小板の機能は、血小板活性化作用を示す TXA₂ と抑制作用を示す PGI₂ により主に調節されていることが知られている。また、PGE₂ がその受容体サブタイプを介して血小板の機能調節に関与していることを当研究室より報告した。一方、血小板の機能調節における PGF₂ の役割に関しては未だ不明な点が多い (図 1)。

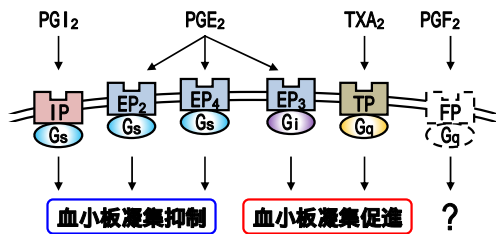


図 1 プロスタノイドによる血小板の機能調節

(3) 予備検討において、研究代表者は、PGF₂ がアデノシン二リン酸 (ADP) により誘導された血小板凝集を促進することを見出した。また、RT-PCR による解析およびプロスタノイド受容体欠損マウスを用いた検討より、PGF₂ の血小板凝集促進作用は FP 以外の受容体を介したものであることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 血小板における PGF₂ の標的受容体を同定するため、プロスタノイドの各受容体を欠損するマウスから血小板を調製し、PGF₂ の血小板凝集促進作用が減弱もしくは消失するかを検討する。

(2) PGF₂ の血小板に対する作用が生体で果たす役割を明らかにするため、*in vivo* 解析系を用いて検討する。止血機構への影響を検討するため、マウスの出血時間が PGF₂ の投与により変化するか否かを観察する。また、アラキドン酸投与による血栓形成モデルを用いた解析により、致死率や血栓形成の程度が変化するかも検討する。

(3) PGF₂ 製剤が血小板機能に影響している可能性を検討するため、PGF₂ 誘導体が PGF₂

と同様に血小板凝集を促進するか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) プロスタノイドの各受容体を欠損するマウスから血液を採取し、多血小板血漿 (PRP) と乏血小板血漿 (PPP) を調製する。PRP に ADP (0.8~1.2 μM) を添加して血小板を 15%程度凝集させ、PGF₂ およびその誘導体がこの血小板凝集を促進するか否かを血小板凝集計を用いて解析する。

(2) マウスの尾を先端から 1 cm の箇所を切断した後 37℃ に加温した PBS に浸し、出血が止まるまでの時間 (出血時間) を計測する。PGF₂ (10 mg/kg) は、尾を切断する直前に尾静脈から投与する。

(3) プロスタノイド合成の前駆物質であるアラキドン酸を静脈に投与すると、生成したプロスタノイドにより血小板が活性化され、微血管を中心に血栓が形成される。この血栓形成モデルを用い、アラキドン酸 (30 mg/kg) 投与 1 時間後の致死率を算出する。PGF₂ (10 mg/kg) は、アラキドン酸と同時に尾静脈から投与する。また、このモデルでの血栓は肺で最も顕著に認められるため、アラキドン酸投与 3 分後の肺を摘出して、血栓形成の程度を組織学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

マウス血小板に対する PGF₂ の作用を検討した。PGF₂ 単独では血小板凝集は誘導されず、血小板の形態変化を示す凝集波形が確認できた。次に、血小板凝集促進作用がある ADP で血小板を 15%程度凝集させ、その凝集に及ぼす PGF₂ の作用を検討した (図 2)。その結果、ADP による凝集は PGF₂ により促進された。

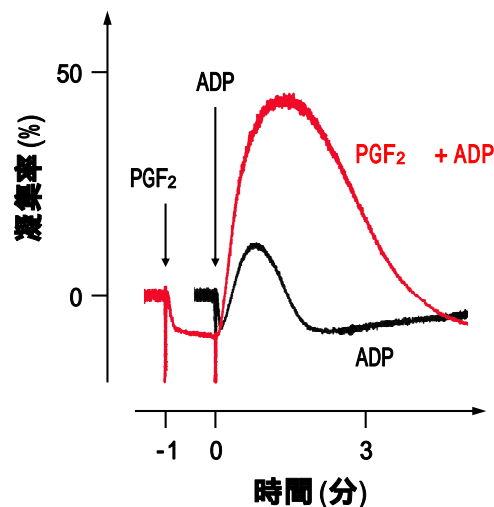


図 2 ADP 凝集に対する PGF₂ の効果

マウス血小板におけるプロスタノイド受容体の mRNA 発現を RT-PCR により解析した。TXA₂ 受容体の TP や PGI₂ 受容体の IP に加え、PGE₂ 受容体サブタイプの EP₂、EP₃、EP₄ の発現が認められた。一方、PGF₂ の受容体である FP の発現は確認できなかった。

PGF₂ による血小板の形態変化について、プロスタノイド受容体の欠損マウスを用いて検討した。血小板の形態変化を示す凝集波形は、PGF₂ を添加することで FP や EP₃ を欠損したマウスにおいても認められたが、TP を欠損したマウスでは消失した。

PGF₂ の血小板凝集促進作用について、プロスタノイド受容体の欠損マウスを用いて検討した(図3)。野生型マウス(WT)の血小板において、ADP 凝集に対する PGF₂ の促進作用は濃度依存的であった。この PGF₂ の血小板凝集促進作用は、FP 欠損マウス(FP-KO)を用いてもほとんど変化しなかった。一方、EP₃(EP₃-KO)と TP 欠損マウス(TP-KO)においては有意に減弱し、EP₃ と TP の両欠損マウス(EP₃/TP-DKO)においては完全に消失した。

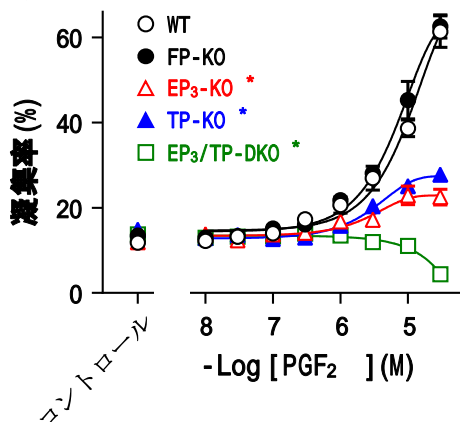


図3 PGF₂ の血小板凝集促進作用
* P<0.05 vs. WT

PGF₂ の血小板凝集促進作用を *in vivo* で確認するため、出血時間を計測した(図4)。ビークルを投与したマウスに比べて PGF₂ を投与したマウスでは、出血時間が有意に短縮した。

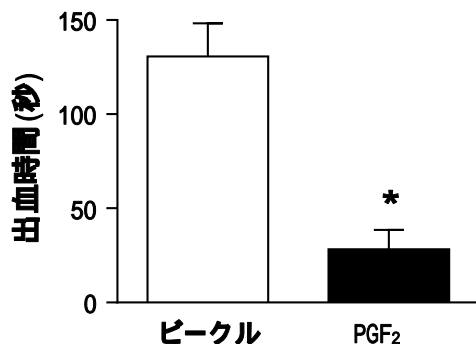


図4 出血時間に対する PGF₂ の効果
* P<0.05 vs. ビークル

血栓の形成における PGF₂ の影響を検討するため、血栓形成モデルを作製して致死率を算出した(図5)。今回は、通常血栓形成モデルよりもアラキドン酸の投与量を減らすことにより、アラキドン酸のみで死亡するマウスはいなかった。一方、アラキドン酸と同時に PGF₂ を投与することにより、致死率の明らかな上昇が認められた。次に、血栓形成モデルから肺を摘出し、HE 染色して血栓形成の程度を組織学的に観察した。致死率の結果を裏付けるように、アラキドン酸のみを投与したマウスの肺では、血栓形成の程度は軽微だったが、アラキドン酸と同時に PGF₂ を投与することにより、血栓の形成が促進している様子が確認できた。

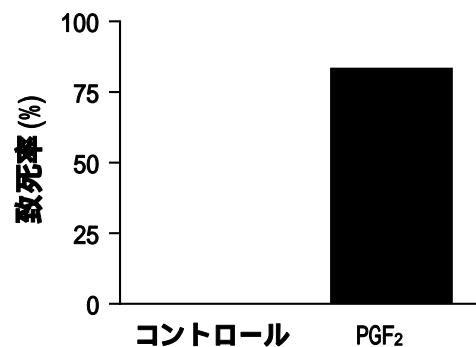


図5 血栓形成モデルの致死率に対する PGF₂ の効果

PGF₂ 誘導体が、PGF₂ 同様血小板凝集を促進するか否かを検討した(図6)。今回は、ラタノプロスト、ウノプロストン、フルプロステノールの3種類の誘導体を用いた。ADP 凝集に対するラタノプロストやウノプロストンの促進作用はほとんど見認められなかった。フルプロステノールに関しては、高濃度においてわずかに凝集促進作用が認められた。いずれにしても、PGF₂ に比較して PGF₂ 誘導体は、血小板凝集にあまり影響しないことが示唆された。

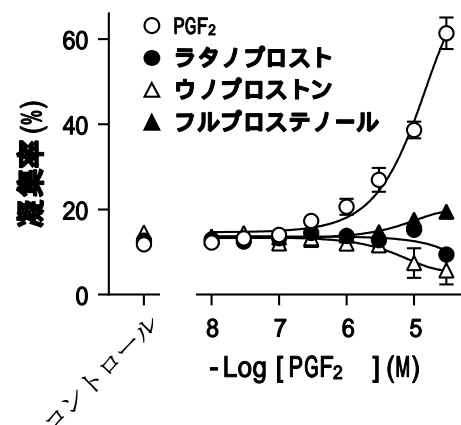


図6 ADP 凝集に対する PGF₂ 誘導体の効果

(2) 総括

PGF₂ は、単独では血小板凝集を誘導しないが、ADP で誘導した血小板凝集を濃度依存的に促進した。しかし、RT-PCR による解析より、PGF₂ の血小板凝集促進作用は、本来の受容体である FP ではなく他の受容体を介したものであることが示唆された。今回、血小板で発現が確認されたプロスタノイド受容体の中では、PGE₂ 受容体サブタイプの EP₃ と TXA₂ 受容体の TP が凝集促進に関与することが報告されている。そこで、これらの受容体欠損マウスを用いて PGF₂ の血小板に対する作用を検討した。その結果、PGF₂ による血小板の形態変化には TP が、PGF₂ の血小板凝集促進作用には EP₃ と TP の両方が関与していることが明らかとなった。さらに、*in vivo* での検討より、PGF₂ は血小板の止血機構および血栓の形成を促進することが確認された。現在、臨床で PGF₂ は、陣痛の誘発および促進を目的に使用されており、また、PGF₂ 誘導体も緑内障の治療薬として用いられている。そこで、PGF₂ 誘導体も PGF₂ 同様血小板凝集を促進するか否かを検討したが、PGF₂ 誘導体の血小板凝集促進作用はほとんど認められなかった。

以上の結果より、マウス血小板において、PGF₂ は FP ではなく EP₃ と TP を介して凝集を促進することが明らかとなった (図 7)。

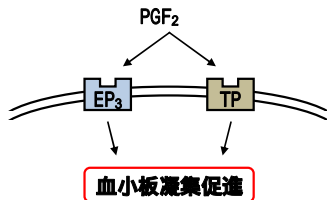


図 7 PGF₂ による血小板の機能調節

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

心疾患、脳血管疾患は、悪性新生物に次いで永らく日本の死亡率の上位を占めており、なかでも心筋梗塞や脳梗塞は高い割合を示している。血小板の活性化は、これら血栓性疾患の発症とも密接に関係しているため、血小板機能調節の新たな因子として PGF₂ を提案した本研究の意義は大きいと考えられる。従来、血栓性疾患の再発予防を目的に抗血小板薬が使用されており、その重要性がますます高まっている。血小板機能調節における PGF₂ の役割を解明することにより、本研究が新規作用機序を持つ抗血小板薬開発の一助となることを期待する。

(4) 今後の展望

産科領域において陣痛の誘発および促進を目的に使用されている PGF₂ には、重篤な副作用として脳血管障害を添付文書に追記する必要性が検討されているが、副作用発現の詳細な機序や因果関係には未だ不明な点

が多い。本研究により、PGF₂ の血小板凝集促進作用および PGF₂ の FP 以外への交差反応が明らかとなった。今後は、同様の作用がヒト血小板でも認められるか、また、PGF₂ の EP₃ や TP への交差反応が血小板以外の血管等でも認められるか否かを検討することにより、本研究が PGF₂ 製剤のより効果的で安全な臨床応用に資することを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hitoshi Kashiwagi, 他 7 名 (1 番目)
The novel prostaglandin I₂ mimetic ONO-1301 escapes desensitization in an anti-platelet effect due to its inhibitory action on thromboxane A₂ synthesis in mice, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 査読有, Vol.353, 2015, 269-278
DOI: 10.1124/jpet.115.222612

〔学会発表〕(計 9 件)

Hitoshi Kashiwagi, Prostaglandin F₂ potentiates platelet aggregation via prostaglandin E₂ and thromboxane A₂ receptors, 第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)
柏木仁、プロスタグランジン F₂ の血小板凝集促進作用、第 26 回日本循環薬理学会、2016 年 12 月 2 日、信州大学医学部付属病院(長野県・松本市)
Hitoshi Kashiwagi, Promoting effect of prostaglandin F₂ on platelet aggregation, 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等
http://www.asahikawa-med.ac.jp/index.php?f=facilities_guide+kiso_yakuri

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏木 仁 (KASHIWAGI, Hitoshi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：60510609