

平成23年5月27日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590244

研究課題名（和文） プロスタノイドの虚血心筋保護作用の機構解明

研究課題名（英文） The mechanism elucidation of the protective effect of prostanoids in ischemic myocardial protection

研究代表者

結城 幸一 (YUHKI KOH-ICHI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80302420

研究成果の概要（和文）：

本研究では、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るプロスタノイドの、虚血性心疾患における役割の解析をおこなった。短時間の虚血と再灌流を繰り返すプレコンディショニング処理をおこなうと心臓の梗塞サイズが減少することが知られているが、この効果におけるプロスタノイドの役割についてプロスタノイド受容体欠損マウスを用いて解析した。その結果、PGE₂ がその受容体である EP₄ を介して抗アポトーシス作用を発揮することにより、後期プレコンディショニングにおける心保護作用を発揮している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Prostanoids are bioactive lipid mediators consisting of prostaglandins (PGs) and thromboxanes. On the other hand, Ischemic preconditioning (IPC) is a phenomenon that a brief ischemia of the heart induces a potent cardioprotective mechanism upon a succeeding ischemic insult. This research was analyzed about the roles of prostanoids in the ischemic heart disease using mice lacking PGE₂ receptor. We demonstrated that the PGE₂-EP₄ system exerts the cardio-protective effect in the late phase of IPC partly by augmenting the anti-apoptosis related signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：プロスタノイド、プロスタグランジン E₂、心筋梗塞、プレコンディショニング、

受容体欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞は、動脈硬化巣の破綻に続いて形成された血栓が冠動脈を閉塞することにより突然発症し、心筋壊死を生じる疾患である。近年、緊急カテーテル治療法の進歩により、閉塞してしまった冠動脈の速やかな再灌流が可能となり、生存率は飛躍的に向上したが、急性心筋梗塞は今なお死因の上位を占めている。冠動脈の閉塞は、心筋の壊死を生じるため速やかな血流の再灌流を必要とする。しかし、再灌流することによって生じるラジカルなどが病態を悪化させることが知られている。これは、再灌流障害と呼ばれ問題となっているが、その原因については不明な点が多い。一方、以前より心筋梗塞発症後の再発防止のために、抗血小板療法として低用量アスピリンが用いられている。これは、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) を阻害することによってプロスタノイド (特に血小板凝集能の高いトロンボキサン A_2) 産生を阻害することを目的に投与される。COX には、構成的に発現している COX-1 と炎症部位などで発現が誘導される COX-2 がある。よって、炎症性疾患の軽減のために選択的 COX-2 阻害薬が開発されたが、その一つであるロフェコキシブを用いた数種の大規模臨床試験において、この薬物が急性心筋梗塞の発生リスクを増大させることが報告された。これは、心筋梗塞における COX-2 由来プロスタノイドの重要性を示すものである。これまでに我々は、心筋梗塞の発症に伴い、COX が発現誘導されること、COX 阻害薬の投与は、心筋梗塞後の梗塞サイズを増加させることを報告した。これらの結果は、プロスタノイドが心筋梗塞の病態形成に関与することを示唆していた。ついで我々は、プロスタノイド受容体欠損マウスを用い、心筋梗塞病態形成における PGI_2 と PGE_2 の役割を、明らかにした (*Circulation* 104: 2210-2215, 2001; *Circulation* 109: 2462-2468, 2004)。しかし、心筋梗塞病態形成におけるプロスタノイドの役割の全体像には、不明な点が多く残されている。また、心臓への一過性虚血負荷は、プレコンディショニングと呼ばれ、続

発する心筋梗塞時に心保護効果を示す。虚血プレコンディショニングは二相性の現象といわれており、短時間の虚血再灌流の数分後から認められ、2-3 時間で心保護効果を消失する早期虚血プレコンディショニングと、短期虚血再灌流の 12-24 時間後から認められ、72-96 時間後まで持続する心保護効果を示す後期虚血プレコンディショニングからなる。後期虚血プレコンディショニングは、早期に比べて持続して安定した心保護効果があり、臨床的意義が高いと考えられている。この後期虚血プレコンディショニング現象は、COX 阻害薬で消失するが、関与するプロスタノイドの詳細は不明であった。

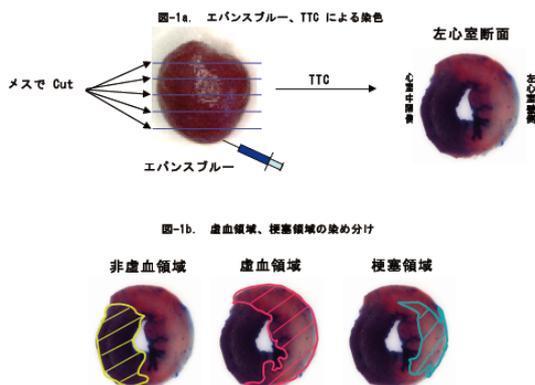
2. 研究の目的

我々は、プロスタノイドが心筋梗塞の病態形成においてどのような役割を果たしているのか研究している。そこで本研究では、心臓の虚血プレコンディショニングにおける PGE_2 - EP_4 システムの役割解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 心筋梗塞サイズの評価

マウスをペントバルビタール (60 mg/kg 体重) で麻酔後、人工呼吸下で開胸し、その左冠動脈前下行枝 (left anterior descending coronary artery: LAD) を 30 分間結紮した。ついで、血流を再開通することにより虚血-再灌流障害を惹起した。その後、心尖よりエバンスブルー色素を投与し、非虚血血管領域に循環させることにより青紫色に染色した。さらに心臓を輪切りとし、トリフェニルテトラゾリウムクロライドを用いて染色した、これにより生存領域を赤く染色され (図-1a, b)。梗塞サイズは白くなった。これらをコン



ピューター画像解析し、梗塞サイズの変化を解析した。

(2) 虚血プレコンディショニング (Ischemic preconditioning: IPC)

心虚血-再灌流前に5分間のLAD閉塞と5分間の再灌流を4サイクル繰り返した(IPC処置)後に閉胸し、24時間後に虚血-再灌流を施行した。

(3) 選択的EP₄受容体アゴニスト(AE1-329)の虚血-再灌流障害に対する効果

野生型マウスに対して0.03 mg/kgのAE1-329あるいはvehicle (PBS)を皮下注射し、30分後に心臓の虚血-再灌流を行い、梗塞サイズを計測した。また、虚血の前後で心エコーを行い、Mモード法にて左室駆出率(LVEF)を計測し、心機能低下を Δ LVEF(虚血後LVEF-虚血前LVEF)として計算した。また、薬物投与による末梢血圧変動は、Tail-cuff法により測定した。

(4) 心臓組織内COX-2 mRNA発現量の測定

IPC処置直後及び2, 6, 24時間後に心臓を摘出し、虚血領域と非虚血領域をサンプリングした。そこからtotal RNA抽出、逆転写反応を行い、Real-time PCRにより心臓組織内のCOX-2 mRNA発現量を評価した。

(5) 心臓組織内PGE₂量の測定

心臓組織内PGE₂量は、C-18 SPEカラムによる精製後、PGE₂ EIA Kit(Cayman Chemical社)を用いてELISA法により測定した。

(6) 心筋組織内Akt活性化の解析

AE1-329あるいはvehicle投与30分後、LADを30分間閉塞し、15分間再灌流を行った後心臓を摘出、ホモジナイズし、ウェスタンブロット解析を行った。抗リン酸化Akt抗体および抗Akt抗体(Cell signaling社)を用いて、心筋組織内のリン酸化Aktおよび総Akt量を定量し、総Akt量に対するリン酸化Akt量比をAkt活性化の指標として算出した。

4. 研究成果

(1) IPC処置の心保護効果

野生型マウスにおいて、心筋梗塞サイズ

(梗塞サイズ/虚血領域サイズ)は、sham群と比較しIPC群で有意に低下した(各々 $48.7 \pm 3.6\%$ 、 $27.2 \pm 4.1\%$ 、 $n = 4-5$ 、 $p < 0.01$)。これにより本モデルがマウスIPC実験モデルであることを確認した。この系において、EP₄欠損マウスではsham群とIPC群で有意差を認めなかった。よって、IPCの成立においてPGE₂-EP₄系が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(2) IPC処置にともなう心臓内COX-2 mRNAの発現変化

IPC処置を行った野生型マウスの心臓におけるCOX-2 mRNAの発現量をReal-time PCRにより解析したところ、IPC処置直後より虚血領域におけるCOX-2 mRNAの有意な発現上昇を認め、その上昇はIPC処置24時間後まで持続した(図2)。これは、PGE₂のような心保護作用を持つプロスタノイドの産生を示唆していた。一方、非虚血領域においてもIPC処置直後においてCOX-2 mRNAの有意な発現上昇を認めたが、IPC処置2時間後には元のレベルに戻った。

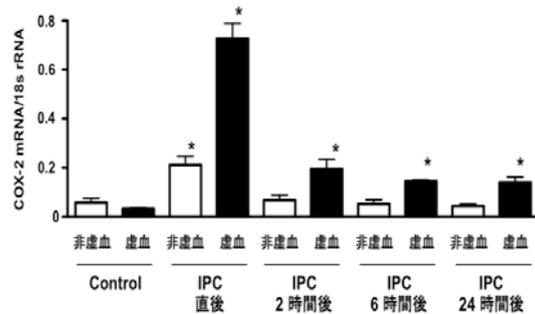


図2 虚血プレコンディショニング処理によるCOX-2 mRNA発現量の変動

(3) IPC処置による心臓内PGE₂産生量の増加

IPC処置直後の心臓組織内PGE₂量は、虚血領域と非虚血領域とで差がなく、この時点でのPGE₂産生量の増大は認められなかった。しかし、IPC処置から24時間後の虚血領域におけるPGE₂量は、非虚血領域と比較して野生型マウス、EP₄欠損マウスともに有意な増加を認め、また両マウス群間での差は見られなかった。この結果から、この時点でPGE₂が何ら

かの役割を果たしていることが予想された。

(4) EP₄受容体アゴニストの心保護効果

治療薬としての可能性を探索するために、まず、投与する薬物により血圧変動を起こさないか Tail-cuff 法により血圧を測定した。その結果、AE1-329 の 0.03 mg/kg 投与では、末梢血圧に影響を及ぼさなかった。次にこの用量の薬物を心臓虚血-再灌流前に投与したところ、野生型マウスにおいて、コントロール群と比較して AE1-329 投与群で梗塞サイズが有意に低下した。また、AE1-329 は心機能低下 (Δ LVEF) も有意に抑制した。つまり選択的 EP₄受容体アゴニスト AE1-329 は、虚血-再灌流による心筋梗塞サイズを縮小し心機能障害を軽減することが示された。

(5) EP₄受容体アゴニストの Akt 活性化作用

PI3K/Akt 系の活性化は、GSK-3 の活性化などを介して抗アポトーシス効果をもたらすことから、虚血プレコンディショニング発現において重要な役割を果たすシグナル系として知られている。この系の活性化を Akt のリン酸化を指標にウェスタンブロットにより解析した。野生型マウスの心臓において、虚血-再灌流 24 時間後にリン酸化 Akt 量が増加するが、AE1-329 投与群ではさらに有意に増大した。これは Akt の活性化が亢進していることを示している。なお、虚血-再灌流処置をしない野生型マウスの心臓では、選択的 EP₄アゴニストを投与してもリン酸化 Akt 量の増加は認められなかった。一方、EP₄欠損マウスの心臓では、AE1-329 の Akt 活性化増強作用は認めなかった。

後期 IPC では、可逆的虚血負荷から 24-72 時間後に心保護に働くメディエーターが誘導されることにより強力な心保護効果が発現されると考えられている。本研究は、可逆的虚血負荷後 24 時間で内因性 PGE₂ 産生が亢進していることが、後期 IPC の発現にとって重要であることを示した。実際、後期 IPC における PG 環境を模した、虚血-再灌流前の EP₄受容体アゴニスト投与は、心筋梗塞巣の縮小効果や心機能改善効果を示した。

今回、EP₄受容体刺激が心筋虚血-再灌流にともなう Akt の活性化を亢進することを明らかにすることができ、これが後期 IPC における PGE₂-EP₄系の作用発現のメカニズムの一つと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe J, Fujino T, Narumiya S, and Ushikubi F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol. Ther.* 129: 195-205, 2011. (査読有)
- ② Kuriyama S, Kashiwagi H, Yuhki K, Kojima F, Yamada T, Fujino T, Hara A, Takayama K, Maruyama T, Yoshida A, Narumiya S, and Ushikubi F. 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)
- ③ Yuhki K, Kashiwagi H, Kojima F, Kawabe J, and Ushikubi F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int. Angiol.* 29(2 Suppl): 19-27, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Kanno T, Kawabe J, Yuhki K, Takehara N, Ushikubi F, Hasebe N. The Cardioprotective Effect of Prostaglandin E₂/EP₄ System is Important for the Late Phase Preconditioning American Heart Association Scientific Sessions 2009、2009年11月16日 アメリカ/オランダ
- ② 菅野貴康、川辺淳一、結城幸一、竹原有史、長谷部直幸、牛首文隆 プロスタグランジンE₂ は EP₄ 受容体を介して心臓における後期虚血プレコンディショニングを仲介している 第 60 回日本薬理学会北部会、2009年9月26日 富山
- ③ 結城幸一、成宮周、牛首文隆 循環器疾

患におけるプロスタノイドの役割 第46回
日本生化学会北海道支部会、2009年7月17
日 旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

結城 幸一 (YUHKI KOH-ICHI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80302420