

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390045

研究課題名（和文） プロスタノイドの循環器系疾患病態形成における役割の解明

研究課題名（英文） Roles of the prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases

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

研究成果の概要（和文）：本研究は、8種類のプロスタノイド受容体の各々を欠損するマウスと様々なマウス循環器疾患モデルを用い、循環器系疾患の病態形成におけるプロスタノイドの役割を解明することを目的としている。本研究の結果、心筋梗塞におけるプロスタグランジン（PG） E_2 の EP3 を介した心保護作用、腎間質線維化での PGE_2 -EP4 系および PGI_2 -IP 系の腎間質線維化抑制作用、 PGE_2 -IP 系のシスプラチン誘発腎傷害における役割を見出した。また、新規 IP アゴニストである ONO1301 の血小板凝集抑制作用を解明した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the roles of the prostanoids in the cardiovascular system, we employed several animal models showing similar pathophysiology with those seen in human diseases. Through the analysis of these animal models, we found novel actions of the prostanoids, which include the role of the EP4 and IP in the development of renal interstitial fibrosis, the role of the EP1 in the development of cisplatin-induced nephropathy and the potent inhibitory action of ONO1301 on platelet aggregation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	1,4300,000	4,290,000	

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、トロンボキサン、循環器

1. 研究開始当初の背景

循環器系において、多くのプロスタノイドの作用が指摘されているが、その意義や生理的・病態生理的役割には不明な点が多く残されている。例えば、

心筋の虚血・再灌流障害や動脈硬化の発症・進展にプロスタノイドが関与することが指摘されているが、どのプロスタノイドがどの程度重要な役割を果たすかについては不明であり、当該分

野における国内外の研究は遅れている。このような状況のなか、我々はプロスタノイドの生理的・病態生理的役割を解明するため8系統の各プロスタノイド受容体欠損マウスを作出した。また、当研究室では循環器系疾患の病態に即したに多種類のマウス *in vivo* 解析モデルを確立してきた。加えて、当研究室では摘出灌流心臓を用いた心機能評価、心筋や血管平滑筋培養系を用いた解析、血小板や摘出血管の機能解析など循環器系の *in vitro* 解析にも習熟してきた。そこで、これらの解析モデルと受容体欠損マウスを用い、プロスタノイドの循環器系疾患の病態形成における役割解明を目指した。その結果、以下に示すプロスタノイドの新規役割を明らかにしてきた。

● PGE₂ の EP₃ を介した止血・血栓形成での役割。 (*Circulation* 104: 1176-1180, 2001)

● PGI₂ の心臓虚血・再灌流障害での心保護作用。 (*Circulation* 104: 2210-2215, 2001)

● PGs の血管平滑筋に対する増殖・肥大作用。 (*Br. J. Pharmacol.* 136: 530-539, 2002)

● TXA₂ の炎症下での血管トーン調節機構。 (*Circulation* 108: 2381-2386, 2003)

● PGI₂ の腎血管性高血圧症における役割。 (*J. Clin. Invest.* 114: 805-812, 2004)

● PGE₂ の心臓虚血・再灌流障害での心保護作用。 (*Circulation* 109: 2462-2468, 2004)

● PGI₂ の圧負荷に伴う心肥大での役割。 (*Circulation*, 112: 84-92, 2005)

● TXA₂ と PGF₂α の炎症性頻拍における役割。 (*Nat. Med.* 11: 562-566, 2005)

● PGE₂ の血小板機能調節における役割。 (*Thromb. Haemost.* 104: 796-803, 2010)

● PGI₂ の血管内皮前駆細胞機能制御での役割。 (*ATVB.* 30: 464-470, 2010)

● PGE₂ の EP₄ を介した腎間質線維化での役割。 (*Kidney Int.* 82: 158-171, 2012)

このように、循環器系の解析手技とプロスタノイド受容体欠損マウスを組み合わせ用いて研究することは、プロスタノイドの生理的・病態生理的役割を解明する上で非常に有効な手段となると同時に本研究の独創性・特色を裏付けるものである。また、このような研究手法は、当研究室を含む国内外のごく限られた研究室でのみ可能である。

2. 研究の目的

プロスタノイドは、生体内において非常に多彩な作用を示す生理活性脂質であり、多種類のその受容体が心臓、血管、腎臓などの循環器系臓器や、血小板などの血液細胞に多く発現している。また、循環器系での様々な病態に伴い、プロスタノイドの産生が亢進することが知られている。従来、プロスタノイドの循環器系での作用として血圧や臓器血流量の調節、動脈硬化の促進や抑制、血小板機能の調節、腎機能の調節などが示唆されている。しかし、これらの作用が生理的・病態生理的どの程度重要な役割を果たすのか、あるいは、どのタイプのプロスタノイドがこれらの作用に関与しているのかは不明である。そこで、本研究は8種類のプロスタノイド受容体の各々を欠損するマウスを用い、循環器系疾患の病態形成におけるプロスタノイドの役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

心筋梗塞、シスプラチン誘発腎傷害、腎間質線維化、脳血栓症などのマウスモデルを用い、それらの病態形成におけるプロスタノイドの関与程度やそれに関連する受容体タイプの同定を行う。また、その作用機構を細胞から個体に至る各レベルにおいて、薬理的、生化学的、分子生物学的手法を用いて明らかにする。

心筋梗塞におけるプロスタノイドの役割解明

a. 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・再灌流障害を惹起する。摘出心臓を特殊色素を用いて染色し、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。また、経時的に採血を行い心筋組織よりの逸脱酵素を測定する。また、虚血心筋の生死に関わる情報伝達分子 (PKC、AMPK、PI3-K/Akt、K_{ATP}-channel など) の関与を解析する。

b. 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、心筋組織中の高エネルギーリン酸化合物を定量し、心筋のエネルギー代謝障害を解析する。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。

c. 培養心筋細胞を用いた解析

心筋の虚血・再灌流障害時にはフリーラジカル、リゾリン脂質等の内因性物質が産生され、これらが病態の増悪因子として働く。そこで、マウス胎仔の心筋培養系を用い、これらの物質による障害作用を解析する。これらは、細胞の拍動数、形態変化、逸脱酵素量、ミトコンドリア呼吸活性、ATP 含量、細胞内イオン濃度動態などの解析を含む。

血圧調節・血管リモデリングにおけるプロスタノイドの役割解明

a. 血圧調節におけるプロスタノイドの役割解明

プロスタノイドは、血管への直接作用、腎臓での水・電解質再吸収や糸球体濾過率の調節作用、レニン分泌調節作用などを示すことから、血圧調節での役割が示唆されている。そこで、受容体欠損マウスを用い、まず、定常状態での血圧を Tail Cuff 法で測定する。ついで、食塩・水負荷や腎動脈狭窄を行い、血圧の変動を解析する。また、尿量、尿中の電解質量、血中レニン・アルドステロン濃度を測定し、血圧の変動の要因を解析する。これらの解析により、血圧の調節に重要なプロスタノイドの同定と、その作用機構を解明する。

b. 血管リモデリングにおけるプロスタノイドの役割解明

(1) *In vivo* 解析系を用いた血管リモデリングの検討

頸動脈結紮モデルと大腿動脈 cuff 法により血管内膜肥厚を惹起し、血管リモデリングを解析する。これらのモデルにおいて、血管に現れる変化を組織学的、生化学的に解析する。これにより、プロスタノイドが内皮障害、炎症性細胞の浸潤、平滑筋細胞の遊走・増殖など、どの過程に関与するかを明らかにする。

(2) *In vitro* 解析系を用いた血管リモデリングの検討

胸部大動脈を摘出し、**explant** 法により培養血管平滑筋細胞を得る。まず、各プロスタノイドの培養平滑筋細胞の増殖、肥大、遊走に対する効果を解析する。また、血管平滑筋細胞の増殖に関し、種々の増殖因子とプロスタノイドの相互作用について解析を行う。

腎間質線維化におけるプロスタノイドの役割解明

マウスの片側尿管を結紮することにより、腎間質へのマクロファージの浸潤が惹起され、ついで間質でのミオフィブロブラストの増殖と線維化が進行する。この一連の現象では、尿細管上皮が産生する MCP-1 や RANTES、マクロファージが産生する CTGF など様々なケモカインや成長因子などがその病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。そこで、このモデルを用い、組織学的に線維化やマクロファージ浸潤の程度を野性型マウスと各プロスタノイド受容体欠損マウス間で比較検討する。ついで、関連するケモカインや成長因子などの動態に与える各プロスタノイドの効果を解析し、その作用機構を明らかにする。

脳血栓症におけるプロスタノイドの役割解明

マウス頸動脈より微小カテーテルを挿入し、中大脳動脈をその起始部で閉塞することにより、その灌流領域に梗塞を惹起する。その後、脳を **triphenyltetrazolium chloride (TTC)** を用いて染色し、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。また、脳虚血による神経傷害を標準スコア法を用いて解析する。ついで、脳から神経細胞あるいは各種神経膠細胞を分離培養し、どの細胞に対しプロスタノイドが作用するのか、また、その作用機構を明らかにする。

4. 研究成果

心筋梗塞、血管リモデリング、腎間質線維化、脳血栓症などの病態形成や血小板機能調節におけるプロスタノイドの関与の程度やそれに関連するプロスタノイド受容体タイプの同定と情報伝達機構の解析を実施した。その結果、心筋梗塞におけるプロスタグランジン (PG) E_2 の EP3 を介した心保護作用、腎間質線維化での PGE_2 -EP4 系および PGI_2 -IP 系の腎間質線維化抑制作用、 PGE_2 -IP 系のシスプラチン誘発腎傷害における役割を見出した。また、新規 IP アゴニストである ONO1301 の血小板凝集抑制作用を解明した。

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8件)

1. Khan MR, Ushikubi F, Taniguchi T, et al. M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. J Gastroenterol. In press.
2. Aburakawa Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N, et al. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. Circ J. 77: 1053–1062, 2013.
3. Toda K, Yuhki K, Ushikubi F, Saibara T, et al. 17β-Estradiol is critical for the preovulatory induction of prostaglandin E₂ synthesis in mice. J Gastroenterol. In press. Mol Cell Endocrinol. 362: 176–182, 2012.
4. Nakagawa N, Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Ushikubi F, et al. The intrinsic prostaglandin E₂-EP₄ system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice. Kidney Int. 82: 158–171, 2012.
5. Kojima F, Ushikubi F, Crofford LJ, et al. Potential roles of microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatoid arthritis. Inflamm Regen. 31: 157–166, 2011.
6. Mitsumori T, Ushikubi F, Narumiya S, et al. Thromboxane receptor activation enhances striatal dopamine release, leading to suppression of GABAergic transmission and enhanced sugar intake. Eur J Neurosci. 34: 594–604, 2011.
7. Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Ushikubi F, et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular system: Novel insights from knockout mouse studies. Pharmacol Ther. 129: 195–205, 2011.

8. Kuriyama S, Kashiwagi H, Yuhki K, Kojima F, Ushikubi F, et al. Selective activation of the prostaglandin E₂ receptor subtype EP₂ or EP₄ leads to inhibition of platelet aggregation. Thromb Haemost. 104: 796–803, 2010.

[学会発表] (計 6 件)

日本薬理学会総会・北部会

[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

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

小島 史章 (KOJIMA FUMIAKI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30550545

柏木 仁 (KASHIWAGI HITOSHI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 60510609

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

(3)連携研究者

なし