

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390060

研究課題名 (和文) 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解明

研究課題名 (英文) Roles of 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、各プロスタノイド受容体欠損マウスと循環器系疾患病態モデルを用い、循環器系疾患病態形成におけるプロスタノイドの役割解明を目指した。その結果、プロスタグランジン (PG) E₂ の EP3 受容体を介した心筋梗塞での心保護作用、PGI₂ の血管内皮前駆細胞 (EPCs) の機能調節を介した血管リモデリング抑制作用を明らかにした。また、PGE₂ の EP4 受容体を介した腎間質線維化抑制作用、脳血栓症での脳障害増強作用および血小板凝集抑制作用を明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : We intended to clarify the roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases using mice lacking each prostanoid receptor and murine model of cardiovascular diseases. We clarified the cardioprotective effect of PGE₂ and the suppressive effect of PGI₂ on vascular remodeling. We also found an anti-platelet effect of PGE₂ via EP4 receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
20 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
21 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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成した。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。

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・病態生理的に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

心肥大、心筋梗塞、高血圧症、血管リモデリング、動脈硬化、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。

(1) 心肥大におけるプロスタノイドの役割解明

心肥大は、種々の心疾患に伴って発生するが、低下した心機能を維持するための代償機構と考えられている。しかし、心肥大の進行は最終的に心機能の低下を促進し、心不全の原因となる。

① *in vivo* モデルを用いた解析。

大動脈縮窄による圧負荷モデルと、冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを用い解析を行う。処置後数週間で心臓を摘出し、組織学的・生化学的に心筋肥大、間質の線維化の程度を野生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。また、心エコー検査により、心肥大にともなう機能変化を解析する。

② 摘出灌流心臓を用いた解析。

心肥大、心線維化を起こしたマウスの心臓を摘出し、酸素化した栄養液を用いて灌流する (Langendorff 法)。そこで、各種の心機能を解析し、それらを野生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。

c. 培養心筋細胞を用いた解析。

野生型および各プロスタノイド受容体欠損マウス胎仔の心筋・非心筋細胞培養系を用い、プロスタノイドのこれらの細胞に対する増殖・肥大作用やその抑制作用を解析する。また、この系を用い、プロスタノイドの示すこれらの作用における情報伝達機構を生化学的・分子生物学的に解析する。

(2) 心筋梗塞におけるプロスタノイドの役割解明

心筋梗塞は、現在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。

① 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、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。

② 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。

③ 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、これらが病態の憎悪因子として働く。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。

(3) 血管リモデリングにおけるプロスタノイドの役割解明

高齢化社会の到来に伴い、動脈硬化症患者や血管移植術を受ける患者が増加し、血圧管理や血管移植術後の血管再狭窄 (血管リモデリング) の予防が重要な課題となっている。

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。

(4) 血小板機能調節におけるプロスタノイドの役割解析

血小板は、その活性化に伴い強力な細胞増殖因子を放出することから、動脈硬化進展における役割が示唆されている。

各受容体欠損マウス血小板を用いて血小板凝集の解析を行い、血小板機能調節に関与するプロスタノイドを同定する。ついで、血栓形成モデルなど *in vivo* 解析系を用い、各プロスタノイドの役割の重要性を明らかにする。

(5) 腎間質線維化におけるプロスタノイドの役割解明

腎間質線維化は、糸球体腎炎や糖尿病性腎症などに付随して進行するが、これらの疾患ではその糸球体病変の進行自体と比較し、より密接に疾患予後と相関している。したがって、腎間質線維化の病態解明はこれら疾患の治療にとって重要な課題となっている。

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。

(6) 脳血栓症におけるプロスタノイドの役割解明

脳血管障害は、日本人の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問題となっている。

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、心筋梗塞において、プロスタグランジン (PG) E_2 が EP3 を介した心保護作用の機構を明らかにした。また、血管リモデリングでは、 PGI_2 が骨髄の血管内皮前駆細胞 (EPCs) の機能調節を介して、血管内膜肥厚を主体とする血管リモデリングを制御する機構を明らかにした。腎間質線維化では、 PGE_2 が EP4 を介して尿細管上皮細胞での MCP 等のケモカインの発現や上皮-間葉移行を抑制し、その結果腎間質線維化を押さえることを解明した。脳血栓症では、 PGE_2 が EP4 を介して VEGF の発現を促進して脳障害の程度を増強することを明らかにした。また、 PGE_2 が EP4 を介して血小板凝集抑制作用を示すことを明らかにした。

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5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. In press.

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 prostaglandin E_2 receptor subtype EP₂ or EP₄ leads to inhibition of platelet aggregation. *Thromb Haemost.* In press.

3. Kawabe, J., Yuhki, K., Okada, M., Kanno, T., Yamauchi, A., Tashiro, N., Sasaki, T., Okumura, S., Nakagawa, N., Aburakawa, Y., Takehara, N., Fujino, T., Hasebe, N., Narumiya, S. and Ushikubi, F. Prostaglandin I_2 promotes recruitment of endothelial progenitor cells and

limits vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30: 464-470, 2010.
4. Yuhki, K., Kashiwagi, H., Kojima, F., Kawabe, J., and Ushikubi, F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int Angiol.* 29 (Suppl 2): 19-27, 2010.
5. Yuhki, K., Ushikubi, F., Naraba, H., Ueno, A., Kato, H., Kojima, F., Narumiya, S., Sugimoto, Y., Matsushita, M. and Oh-ishi, S. Prostaglandin I₂ plays a key role in zymosan-induced mouse pleurisy. *J Pharmacol Exp Ther.* 325: 601-609, 2008.

〔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

結城 幸一 (YUHKI KOH-ICHI)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：80302420

鈴木 康博 (SUZUKI YASUHIRO)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：80451459

(3) 連携研究者
なし