

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890166

研究課題名（和文）プロスタグランジン EP1 レセプターをターゲットにした脳梗塞治療の研究

研究課題名（英文）Study for developing new strategy for ischemic cell death targeting at EP1 prostaglandin receptor.

研究代表者

河野 隆幸 (KAWANO TAKAYUKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：50448536

研究成果の概要：

今回の研究で、ヒト大脳皮質及び海馬の錐体細胞層の神経細胞に EP1 受容体が存在することを、初めて明らかにした。さらに、脳梗塞の原因となりうる頸動脈プラークや脳動脈瘤にも、COX-2, EP1 受容体の存在を明らかにした。それらの分子は、正常の中大脳動脈や浅側頭動脈に認められず、頸動脈プラークや脳動脈瘤の病態に関与していると考えられた。このことにより、EP1 受容体をコントロールすることで、脳梗塞やくも膜下出血の予防ができる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,290,000 | 0 | 1,290,000 |
| 2008 年度 | 1,310,000 | 393,000 | 1,703,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,600,000 | 393,000 | 2,993,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：脳虚血・虚血性神経細胞死・プロスタグランジン・EP1 受容体

1. 研究開始当初の背景

虚血性神経細胞死の機序は近年明らかにされつつあり、プロスタノイド生合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現、活性化が、その機序に重要な役割を担っていることが報告されている。COX-2 はプロスタグランジン、トロンボキサン合成の律速酵素であり、またフリーラ

ディカルも産生する。その細胞死のメカニズムは、COX-2 によるフリーラディカルの産生ではなく、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の生成が重要であることを我々は報告した。その PGE₂ のレセプターは EP1～4 まで 4 つのサブタイプに分けられている。そのうち EP2, EP4 レセプターは神経保護的に働くと考えられている。我々は EP1 レセプターの活性化

が神経細胞死の重要な機序であることを報告した。

COX-2 の抑制は神経保護的に作用すると考えられているが、それは PGG₂ の生成を抑えることによりその下流の PGE₂、TXA₂、PGI₂ などの作用をすべて抑制するため、その作用機序は不明瞭であった。しかも近年臨床試験において、COX-2 阻害薬投与群に、心筋梗塞及び脳梗塞の発生率が有意に高いことが証明された。これは、COX-2 阻害薬がプロスタサイクリンの生成を阻害することによると考えられている。つまり、COX-2 阻害薬は神経保護的に作用するプロスタノイドの作用をも抑制し、副作用の出現が懸念されることとなる。

このように、虚血性神経細胞死の抑制のためには、より選択的な薬剤を用いて、副作用の可能性をできるだけ減らした薬剤開発が望まれていた。

2 . 研究の目的

本研究では、選択的 EP1 レセプター阻害剤である SC-51089 の臨床応用の可能性につき検討する。我々が考える、EP1 レセプターの選択的阻害は、プロスタサイクリンなどの神経保護的作用は温存したまま、EP1 レセプターを介した神経細胞障害の経路を抑えることにより、その効果を発揮することが特色である。つまり、従来の COX-2 阻害剤による心・血管系の副作用をみること無く、神経保護効果を得ることができることが特徴である。

これまでの研究成果は、脳梗塞治療において EP1 レセプター阻害剤の臨床応用の可能性を強く示唆するものである。しかしながら、これらの実験成果はすべて動物実験のデータであり、EP1 レセプター阻害薬の使用を治療法として確立す

るには、その有効性、安全性の検討など多くの問題点を含んでいる。今回の研究の目的は、これらの問題点を解明することにより、将来的に新たな脳梗塞治療薬の開発につなげるものである。

3 . 研究の方法

(1) 人脳の EP1 レセプターの局在を確かめる。

当科には脳腫瘍を始め、脳梗塞、てんかんなどの症例の組織ブロックが豊富に保存されており、免疫染色に利用できる環境にある。EP1 レセプターに対する抗体は、Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) より市販されており、その抗体を使用する。

正常脳における EP1 レセプターの発現、局在を明らかにする。

(正常脳組織として、脳腫瘍摘出時の周辺脳組織を用いる。)

病理組織(脳腫瘍、脳梗塞等)における EP1 レセプターの発現、局在を検討する。

(2) 病理組織における EP1 レセプターの発現、局在を検討する。

当科における臨床サンプルのうち、頸動脈プラーク、脳動脈瘤のサンプルを免疫染色を行い受容体の関与を考察する。

4 . 研究成果

(1) ヒト脳に EP1 受容体は存在するのかを検討した。

まず、我々の教室に保存してあった、脳腫瘍患者の腫瘍摘出部周辺の正常脳部分を免疫染色に供した。そのうち、大脳皮質および海馬 CA1 錐体細胞層を観察した。それらの領域において、神経細胞において細胞質に EP1 受容体の免疫染色性を認め、神経細胞に受容体が発現していることを証明した(図1)。

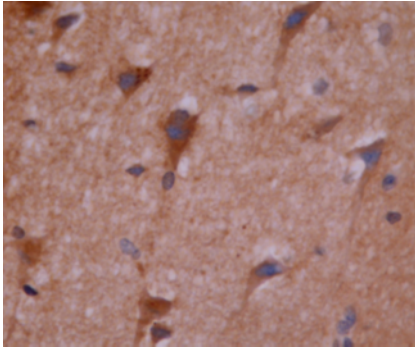


図 1、大脳皮質、EP1 受容体免疫染色

また、ヒトの正常中大脳動脈、浅側頭動脈を用いて COX-2, EP1 受容体の免疫染色を行った。後述する頸動脈プラークや脳動脈瘤の組織と違い、それらの免疫染色性はみとめられなかった。

(2) ヒト頸動脈プラークの免疫染色を行った。

頸動脈プラークは頸部内頸動脈分岐部に好発する病変で、その増大もしくは破綻により脳梗塞を起こす原因となる。その増大破綻の原因を検索することは、脳梗塞の原因究明、予防につながる。

まず、プロスタグランジン産生の律速酵素である cyclooxygenase-1, 2 (COX-1,2) の発現を検討した。頸動脈プラークにおいて、COX-1 発現しておらず、炎症性の誘導酵素である COX-2 の発現を認めた。(図 2)

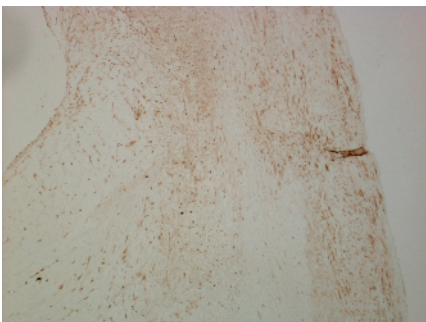


図 2、頸動脈プラーク、COX-2 免疫染色
次に頸動脈プラークの EP1 受容体の免疫染色を行った。EP1 受容体はプラーク内、特に外側と内腔に接した部分に染色される細胞

を認めた(図 3)。

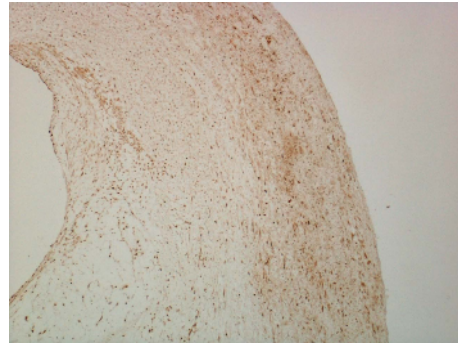


図 3、頸動脈プラーク、EP1 受容体免疫染色

以上により、COX-2 と EP1 受容体の免疫染色性は類似しており、それらの相互作用が示唆された。つまり、頸動脈プラークにはマクロファージ等の炎症細胞の浸潤があるわけであるが、その炎症細胞が COX-2 を発現することにより、プロスタグランジンの産生を促す。さらにそのプロスタグランジンが、EP1 受容体を活性化することにより、プラークの増大、もしくは破綻を来している可能性がある。その、EP1 受容体を modulate することにより、頸動脈プラークのコントロールをすることができる可能性が示唆された。

(3) ヒト脳動脈瘤サンプルの免疫染色を行った。

脳動脈瘤の破裂は、くも膜下出血の原因である。脳動脈瘤の病態を明らかにすることは、その発生、増大、破裂を予防することにつながる重要な研究である。まず脳動脈瘤のサンプルで、マクロファージのマーカーとなる CD68 の抗体を用いて免疫染色を行った。脳動脈瘤の内皮及び中膜にマクロファージの浸潤が認められた(図 4)。さらに、COX-1, 2 の免疫染色を行った。両酵素とも免疫染色性を認めたが、COX-2 のほうがより発現している所見が得られた。また、COX-2 は、浸潤したマクロファージに一致して存在していることが示された(図 5)。

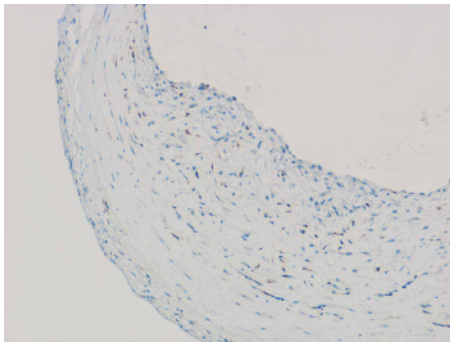


図 4、脳動脈瘤、CD68 免疫染色

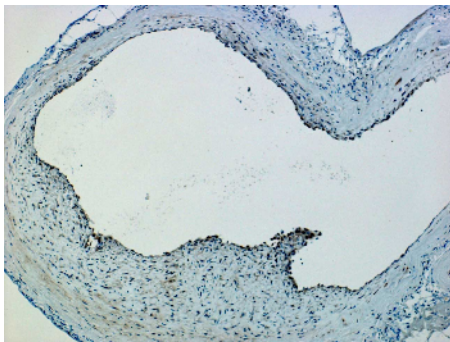


図 5、脳動脈瘤、COX-2 免疫染色

引き続き、脳動脈瘤サンプルにおいて、EP1 受容体の免疫染色を行った。EP1 受容体の免疫染色において、脳動脈瘤壁の内皮細胞に EP1 受容体は存在し、また中膜にも陽性細胞が認められた（図 6）。これらの細胞は、正常組織である、中大脳動脈や浅側頭動脈においては染色性が見られず、脳動脈瘤の病態にかかわっているものと考えられた (data not shown)。

以上の結果により、脳動脈瘤の壁にはマクロファージが浸潤しており、そのマクロファージは COX-2 を発現している。COX-2 はプロスタグランジンの産生を促し、さらに炎症細胞の浸潤を惹起するものと示唆される。さらに、脳動脈瘤には EP1 受容体が発現しており、プロスタグランジンにより活性化され、脳動脈瘤の病態に何らかの関与をしているものと考えられた。今後はその病態について明らかにするとともに、EP1 受容体を modulate することにより、脳動脈瘤の破裂を防ぐことが

できないか検討を行う予定である。

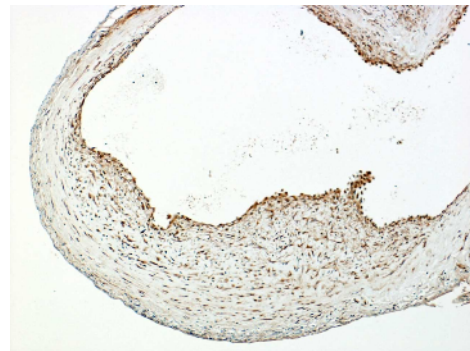


図 6、脳動脈瘤、EP1 受容体

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 隆幸 (KAWANO TAKAYUKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：50448536

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者