

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16510

研究課題名(和文) プロスタグランジンE3による慢性炎症の制御機構の解明

研究課題名(英文) Modulation of vascular inflammation by Prostaglandin E3

研究代表者

石渡 遼 (Ishiwata, Ryo)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生理学・助教)

研究者番号：30805916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 3脂肪酸は魚油などに豊富に含まれ、その一種であるEPAには動脈硬化の抑制効果があるとされ、処方薬としても利用されている。本研究では、EPA由来の代謝物質であるプロスタグランジンE3 (PGE3) に動脈硬化の抑制効果があるのか検討し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。マウスの動脈硬化モデルにおいて、PGE3の投与はアテローム性動脈硬化の進行をむしろ促進した。ヒト大動脈平滑筋細胞を対象とした検討では、PGE3は炎症性サイトカインであるIL-6の遺伝子発現を亢進した。以上の結果より、PGE3には炎症促進を介した動脈硬化増悪作用があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、当初の予想に反してPGE3は炎症促進物質であり、動脈硬化をむしろ増悪させることが示唆された。これまで、EPAを基質として生じる種々の物質に炎症抑制作用があることが報告されてきたが、臨床においてEPAによる動脈硬化抑制効果の有無について統一された見解にはいたっていない。この背景には、EPA由来のPGE3による炎症促進作用が関与している可能性が見いだされた。EPAの投与とともに、PGE3の受容体を阻害すればEPAの効果を高められる可能性が考えられ、今後の検討課題としたい。

研究成果の概要(英文)： EPA is an Omega-3 fatty acid that is rich in fish oil. EPA reportedly inhibits the progression of atherosclerosis and is currently prescribed to the patients. In this research, we aimed to clarify the roles of Prostaglandin E3 (PGE3), an EPA-derived mediator, on the progression of atherosclerosis.

In LDLR knockout mice, administration of PGE3 rather exacerbated atherosclerotic plaque formation induced by high fat diet. In vitro experiments using human aortic smooth muscle cells showed that PGE3 upregulates the mRNA expressions of inflammatory cytokines including IL-6.

These results indicated that PGE3 acts as a pro-inflammatory mediator to promote atherosclerosis.

研究分野：血管生物学

キーワード：プロスタグランジンE2 プロスタグランジンE3 血管平滑筋細胞 IL-6 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

オメガ3脂肪酸は魚油等に豊富に含まれる不飽和脂肪酸である。オメガ3脂肪酸の一種のエICOSAPENTAENOIC ACID (EPA) には動脈硬化の抑制効果があるとされ、栄養成分として注目されているのみならず、処方薬としても利用されている。しかし、EPAが動脈硬化の予防・治療に有効であるか否かについて統一された見解が得られていない。これまでの報告では、EPAが心血管イベントの予防に有効であるとの報告 (JELIS Study 等) と、効果がないとの報告 (ASCEND Study 等) が混在している (Yokoyama *et al.*, *the Lancet* 2007) (Bowman *et al.*, *N Engl J Med*, 2018)。

我々は、オメガ6脂肪酸であるアラキドン酸由来のメディエーターである Prostaglandin E₂ (PGE₂) の、動脈硬化性疾患における関与について報告してきた。これまで、PGE₂が血管平滑筋細胞において受容体である EP4 に作用することで、Interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインの合成・分泌を亢進し、動脈硬化を進行させる可能性について報告してきた (Yokoyama *et al.*, *PLoS One*, 2012) (Ishiwata *et al.*, *Atherosclerosis*, 2014)。EP4 阻害剤は潜在的な動脈硬化の治療薬となりうるが、EP4 のシグナルが心筋炎や慢性腎不全の進行を抑えるという報告もあり、副作用も懸念される (Ngoc *et al.*, *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011) (Vukicevic *et al.*, *Kidney International*, 2006)。

Prostaglandin E₃ (PGE₃) は、EPA を基質に合成される PGE₂ の類縁体である。PGE₃ は PGE₂ 受容体への結合能をもつことが報告されており (Iyu *et al.*, *Thromb Haemost*, 2012)、がん細胞を対象とした *in vitro* の実験系で、PGE₃ が PGE₂ の作用を競合的に阻害する可能性が示されているが (Yang *et al.*, *Cancer Lett.*, 2014)、PGE₃ の慢性炎症や動脈硬化における作用についてはこれまで報告がなく、不明である。

2. 研究の目的

本研究では、PGE₃ が EPA による動脈硬化の抑制作用に寄与しているという仮説の元、PGE₃ の投与が動脈硬化の進行に与える影響を明らかにすることを目的として実験を行った。また、PGE₃ が血管平滑筋細胞において、IL-6 等の炎症性サイトカインの合成・分泌を抑制しうるか検討し、動脈硬化における慢性炎症の調節における PGE₃ の機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス動脈硬化モデルにおける PGE₃ の効果の検討

高脂血症を発症する LDLR^{-/-}マウス (8 週齢のオス) に高脂肪食 (オリエンタル酵母, NMF+牛脂+コレステロール) を 12 週間自由に摂食させ、アテローム性動脈硬化症を誘発した。高脂肪食の開始と共に、PGE₃ (Cayman Chemicals) の投与を開始した。一回の投与量を 20 µg/kg of body weight とし、2 日毎に 100 µL の生理食塩水に希釈し腹腔内投与を行った。対象群として、溶媒を同量投与する群を設けた。

(2) 動脈硬化プラークの定量

ペントバルビタールにより安楽死を施し、マウス大動脈を採取した。大動脈組織に眼科バサミで割をいれ、血管内腔を露出させるように開き、ホルマンボード上にピン止めた後、10%ホルマリンにより組織固定を行った。固定後の組織を Oil Red O 染色液に浸漬し、プラークを染色した。染色後の組織を撮影し、ImageJ ソフトウェアにより、プラークの面積と大動脈の内腔面の面積を定量した。

(3) ヒト大動脈平滑筋細胞の培養と刺激

ヒト大動脈平滑筋細胞を Clontech 社から購入し、専用の増殖培地である SmGM-2 (タカラバイオ社) により培養した。薬剤による刺激は、ヒト大動脈平滑筋細胞を 12 well plate に 1.0×10^4 cells/well で播種し、48 時間培養した後、平滑筋基本培地 SmBM-2 に培養液を交換した。培地交換を行った 24 時間後、PGE₂ (1 µmol/L)、PGE₃ (1 µmol/L)、あるいは LPS (100 ng/mL) で刺激を行った。RNA 抽出用のサンプルは刺激後 12 時間で回収し、タンパク質抽出用のサンプルは刺激後 24 時間で回収し、それぞれ解析に供した。

(4) 遺伝子発現の定量

SYBR Green を用いた定量的 qRT-PCR 法により測定した。相対的な発現量は、18S の発現量を基準とした $\Delta\Delta Ct$ 法により算出した。

(5) タンパク質量の定量

プロテアーゼ阻害剤カクテル (タカラバイオ) を添加した RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, and

10 mM NaF)で細胞を懸濁し、超音波ホモジナイザー(Q55, QSONICA)により破碎することでタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質溶液中の任意のタンパク質の量をウェスタンブロッティングにより定量した。HRP による発色法により定量し、画像の取得と解析は、ChemiDoc (BioRad 社)により行った。内在性コントロールとしてGAPDHを用いた。下記に用いた抗体を示す。Anti-NLRP3 (D4D8T), Anti-Caspase-1 (D7F10), Anti-Cleaved Caspase-1 (D57A2), Anti-IL-1 β (D3U3E), Anti-Cleaved-IL-1 β (Asp116) (D3A3Z) (以上 CST 社より購入), Anti-GAPDH (ab9485, abcam 社)。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化プラークの形成に対する PGE₃ 投与の効果

LDLR 欠損マウスは肝臓による LDL 取り込み能が低下しており、高脂血症モデルマウスとして汎用されている。我々は LDLR 欠損マウスに高脂肪食負荷を行い、アテローム動脈硬化症を誘導した。12 週間の高脂肪食負荷により、顕著な体重増加を認めたが、PGE₃ 投与群と Vehicle 投与群で体重変化に差は認めなかった。プラーク形成は、高脂肪食負荷群で普通食群と比較して顕著に促進されていた。PGE₃ 投与群ではプラーク形成がさらに促進されている傾向があった。

(2) ヒト大動脈平滑筋細胞における炎症経路と PGE₃ の影響

上の結果から、PGE₃ にはむしろ動脈硬化を促進する作用があることが推察された。アテローム性動脈硬化症の進行の背景には、炎症反応が持続的に亢進してしまう慢性炎症があることがよく知られている。我々も、血管平滑筋細胞を中心とした PGE₂-EP4 シグナルが IL-6 の合成を促進し、動脈硬化の進行を促すことを報告してきた。

また、慢性炎症を仲介する主要な経路としてインフラマソーム経路が近年注目されている。インフラマソームは細胞内のタンパク質複合体であり、慢性的な活性化により、動脈硬化を含む炎症性疾患を進行させる。特に NLRP3 を構成要素に持つ NLRP3 インフラマソームは、IL-1 β など炎症性サイトカインの活性化を担っており、またコレステロール負荷による平滑筋細胞の泡沫細胞化を促進させるとされる。血管平滑筋細胞においては LPS 刺激により pro IL-1 β 発現は増加したが、NLRP3 発現は増加せず、pro caspase-1 および pro IL-1 β の切断は認められなかった。また、PGE₂ および PGE₃ にも NLRP3 インフラマソーム経路を活性化する作用は認められず、LPS による pro IL-1 β 発現の亢進を増強する作用も認められなかった。一方、IL-6 の発現については、PGE₂ および PGE₃ の単体刺激によって LPS と同程度の発現促進作用が見られた。さらに、PGE₂ および PGE₃ は LPS による IL-6 の発現促進を相乗的に増加させた。

(3) 考察

本研究では PGE₃ がむしろアテローム性動脈硬化症の促進に働く可能性が見いだされた。また、ヒト血管平滑筋細胞において PGE₃ は PGE₂ と同程度に炎症性サイトカインである IL-6 の発現を促進することが明らかとなった。PGE₃ は EPA 由来のメディエーターであり、PGE₃ が動脈硬化を促進する傾向を見出した本研究の結果は、予想されたものと逆であった。また今後、PGE₃ の投与によりプラーク安定性が変化する可能性についても解析する。また、*vitro* の実験では、血管平滑筋細胞において、PGE₃ が PGE₂ と同程度に IL-6 発現を増加させることが明らかになった。本研究は、PGE₃ の血管平滑筋細胞への作用を初めて検討したものである。IL-6 は動脈硬化性疾患の促進作用が知られているサイトカインであり、PGE₃ による IL-6 の増加が PGE₂ と同様にプラーク形成に寄与した可能性がある。今後、PGE₃ 投与群のマウス大動脈組織において、IL-6 の発現亢進が認められるか、検討を行っていく。EPA を基質として PGE₃ を含む種々のメディエーターが合成される。それらの内 RevE1 等に動脈硬化の抑制効果があることが報告されてきた。その他の EPA 由来メディエーターにも抗炎症作用があることが多数報告されており、これらの EPA 由来メディエーターの作用が動脈硬化の抑制に寄与すると考えられてきた。一方、本研究の結果は EPA 由来メディエーターであっても炎症促進に寄与するものがあることを示唆している。EPA の効能について統一された見解が得られていない背景に、PGE₃ による炎症促進作用が関与している可能性がある。一方、インフラマソーム経路については PGE₂、PGE₃ は共に活性化しないことが示唆された。マクロファージ等の免疫細胞におけるインフラマソーム経路の活性化が動脈硬化の進行に関与することが知られているが、血管平滑筋細胞におけるインフラマソーム経路の関与はあまり知られていない。今回の実験結果からは、LPS 依存的な血管平滑筋細胞の炎症促進にインフラマソーム経路は関与していないこと、また PGE₂、PGE₃ のいずれもインフラマソーム経路の活性化に関与しないことが示唆された。インフラマソーム経路の阻害が、動脈硬化を含む炎症性疾患の治療戦略として注目されているが、血管平滑筋細胞を中心とした炎症増幅機構はその様な阻害剤の標的にはならない可能性があることに留意する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ishiwata Ryo, Morimoto Yuji
2. 発表標題 Modulation of Vascular Inflammation by Prostaglandin E3
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------