

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17730

研究課題名(和文) 遺伝子改変ゼブラフィッシュによるPGE受容体EP4に着目した大動脈瘤治療薬の探索

研究課題名(英文) Transgenic fluorescent zebrafish as tools to characterize prostaglandin EP4 receptor gene expression and to discover drug candidates for abdominal aorta aneurysm

研究代表者

谷藤 章太 (TANIFUJI, Shota)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50529245

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)：PGE受容体EP4は様々な細胞に分布して生体の恒常性を維持している。腹部大動脈瘤(AAA)では過剰なEP4発現亢進の病態進行への関与が示唆されているが、EP4の発現が過剰に亢進する機序は不明である。本研究では、EP4発現亢進の分子機序を明らかにし、AAAに対する新たな治療法としてEP4の発現を抑制する化合物を探索することを目的とした。EP4遺伝子発現をin vivoで可視化できる遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製した結果、EGFP発現を確認できた。また、血管を可視化した遺伝子改変ゼブラフィッシュにアンジオテンシンIIを投与することで、稚魚での血管径が増大し、成体での血管弾性線維に異常が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製したEP4-EGFPレポーターゼブラフィッシュは、現時点で唯一EP4発現をin vivoで可視化でき、時間依存的な定量が可能となった遺伝子改変ゼブラフィッシュである。In vivo解析により、生体内環境でEP4発現の亢進をもたらす機序が明らかになれば、AAA等の過剰なEP4シグナルが関与する疾患の病態の理解に貢献できると期待される。加えてAngII投与ゼブラフィッシュは、稚魚での大動脈径の増大を指標とすることで、治療薬候補となる化合物を短期間にin vivoで絞り込むことが可能であるため、現在までに根本的治療法のないAAAに対する新規の治療法開発への貢献度は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The PGE receptor EP4 is distributed in various cells to maintain homeostasis. In abdominal aortic aneurysms (AAA), excessive EP4 expression has been implicated in the progression of the disease, but the mechanism of excessive EP4 expression is unknown. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of EP4 expression and to search for compounds that inhibit EP4 expression as a new treatment for AAA. We generated transgenic zebrafish in which EP4 gene expression could be visualized in vivo, and EGFP expression was confirmed. In addition, administration of angiotensin II (AngII) to transgenic zebrafish with visualized blood vessels resulted in a 1.2-fold increase in the dorsal aortic diameter compared to buffer-injected controls at 5 days post-fertilization. AngII-injected 2-month-old zebrafish did not show evidence of aortic expansion, but elastic fiber formation was partly attenuated with enhanced matrix metalloproteinase-2 expression.

研究分野：循環生理学

キーワード：ゼブラフィッシュ EP4 腹部大動脈瘤 アンジオテンシンII

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤 (AAA) は、血管を支持する細胞外基質が持続する炎症により破壊されて血管壁が脆くなり、血圧の負荷が加わることで血管径が拡大して進行する致死性疾患である。AAA に対する薬物療法は、降圧薬や脂質異常症治療薬を用いて危険因子となる高血圧や高コレステロール値を下げるもので、AAA の進行そのものを抑制する薬剤は開発されていない。プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は AAA で多く産生され病態の進行に関与することが知られており、PGE₂ 産生酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) を阻害する薬剤の服用患者では AAA の進行が抑制されていた (Walton et al., *Circulation*, 1999)。COX-2 阻害薬は AAA 治療薬として期待されたが、臨床試験では心血管系に有害事象が見られ、AAA 治療薬として利用できないことが判明した (McGettigan et al., *JAMA*, 2006)。

研究代表者の所属研究室では、PGE₂ 受容体サブタイプのひとつである EP4 がヒト AAA 組織で過剰発現し、PGE₂-EP4 シグナルが AAA の進行に強く関与する可能性を報告している (Yokoyama et al., *PLoS ONE*, 2012; Mamun et al., *Physiol Rep*, 2018)。アンジオテンシン II (AngII) 負荷や CaCl₂ 塗布法により作製した 2 種類のマウス AAA モデルで、EP4 がマトリクスメタロプロテアーゼ活性亢進を介して血管弾性線維分解と AAA 進行を促進する。さらに、マウス AAA モデルで EP4 拮抗薬が AAA を抑制することを明らかにした。この EP4 拮抗薬は AAA の治療薬候補であるが、至適血中濃度の範囲が狭く、治療薬としての使用は難しいことが、先行研究で示唆されている。一方、EP4 は生体の恒常性の維持に寄与しているため、EP4 拮抗薬の使用は AAA を抑制するだけではなく、生体の恒常性を破綻させるリスクが伴う。AAA では恒常性を維持している EP4 に加え、何か引き金となる要因により EP4 発現がさらに誘導され疾患が進行すると考えられる。この EP4 発現を亢進する分子機序について、EP4 発現を制御するプロモーター領域を何が活性化するかは未だ不明である。

2. 研究の目的

PGE₂ 受容体 EP4 について、AAA などの PGE₂-EP4 シグナルが関与する疾患での過剰な EP4 発現の分子機序を明らかにし、新たな治療法として EP4 の発現を抑制して AAA の疾患進行を抑制する全身への副作用が少ない化合物を探索することが目的である。

3. 研究の方法

(1) EP4 遺伝子発現を可視化したゼブラフィッシュの作製

EP4 プロモーターと推定される領域を含むインサート DNA を 2 種類クローニングした。各 DNA を組み込んだ Tol2 トランスポゾンベクターを用いて EP4-EGFP ゼブラフィッシュを作製した。この EP4-EGFP レポーターゼブラフィッシュは、EP4 の発現をレポーター遺伝子である EGFP の発現に置き換えて評価することが可能であるため、共焦点顕微鏡により EGFP を確認した。

(2) 血管を可視化したゼブラフィッシュに AngII を負荷した AAA モデルゼブラフィッシュの作製

血管内皮細胞選択的に EGFP を発現している *Tg(kdr1:EGFP)* ゼブラフィッシュの 1 細胞期の受精卵卵黄に実体顕微鏡下で 40、80、160 mg/ml AngII を 1 nl 注射し、受精後 5 日に共焦点顕微鏡により大動脈を観察し、大動脈径を測定した。また、ゼブラフィッシュの血管弾性線維形成を確認するため、受精後 4 週、6 週、8 週のゼブラフィッシュを用いてパラフィン切片を作製し、エラスチカ染色により弾性線維を染色した。AngII 負荷ゼブラフィッシュを 8 週間飼育後にエラスチカ染色を行い、大動脈径の測定および elastin degradation grading により血管弾性線維形成を評価した。弾性線維を分解する酵素である MMP-2 の発現を確認するため、免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) EP4 遺伝子発現を可視化したゼブラフィッシュの作製

ヒト EP4 に相当するゼブラフィッシュ EP4b の上流 2084 bp について検索プログラム Berkeley Drosophila Genome Project : Neural Network Promoter Prediction を用いてプロモーター領域を検索し、既報のヒト EP4 プロモーター領域 (Seira et al., *Pharmacol Res Perspect*, 2018) と相同性のある領域 (-261 から -212) を含むようプライマーを作製した。2 種類のインサート DNA をクローニングした後、Tol2 ベクターに導入してコンストラクトを作製し、1 細胞期の野生型ゼブラフィッシュ受精卵に導入した結果、どちらのインサート DNA を導入した個体でも EGFP の発現を確認することができた。現時点では、唯一 EP4 発現を *in vivo* で定量できる EP4-EGFP レポーターゼブラフィッシュであり、これを用いることにより生体内環境で EP4 発現の亢進をもたらす機序の解明に貢献できると期待される。

(2) 血管を可視化したゼブラフィッシュに AngII を負荷した AAA モデルゼブラフィッシュの作製

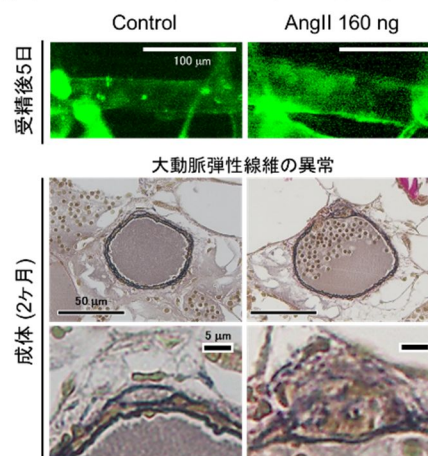
AngII を *Tg(kdr1:EGFP)* ゼブラフィッシュの 1 細胞期の受精卵卵黄に投与することで、受精後

5 日に大動脈径が有意に増大した (対照群、 $19.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$; AngII 160 ng 投与群、 $23.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$; $n=13-18$, $p<0.001$ 、図 1 上段に代表例)。ゼブラフィッシュの血管弾性線維の発達を確認するため、受精後 4 週、6 週、8 週での大動脈の弾性線維をエラスチカ染色により確認した結果、6 週より血管弾性線維が認められ、8 週では 1-2 層の血管弾性線維が形成された。受精後 8 週 of AngII 160 ng 投与群では、大動脈の弾性線維に断裂または異常な形成が認められた (elastin degradation grading, 2.1 ± 0.1 倍 vs. 対照群、 $n=5-8$, $p<0.001$ 、図 1 中段および下段に代表例)。さらに免疫染色の結果、AngII 160 ng 投与群の大動脈では弾性線維を分解する酵素である MMP-2 の発現が増加していた。これらの結果より、稚魚での AngII 投与による血管径の増大が、将来的に血管弾性線維の異常につながる可能性が示唆された。

この独自の AngII 投与ゼブラフィッシュは、稚魚での大動脈径の増大を指標とすることで AAA の治療薬候補となる化合物を短期間に *in vivo* で絞り込むことが可能であり、創薬の初期段階であるスクリーニングから動物モデルを使用する *in vivo* スクリーニングが可能なモデルとなることが期待される。

以上の(1)、(2)の研究成果より、EP4-EGFP レポーターゼブラフィッシュを用いて EP4 発現を亢進させる化合物を網羅的に探索して発現亢進の分子機序を明らかにし、AngII 投与ゼブラフィッシュを用いた AAA の治療薬候補となる EP4 過剰発現を抑制する化合物の選定が可能となることが期待される。

図1 AngII負荷による大動脈径の増大と弾性線維の異常



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shota Tanifuji, Genri Kawahara, Takashi Nakamura, Saki Iida, Yukiko K. Hayashi, Utako Yokoyama
2. 発表標題 Angiotensin II-treated zebrafish as a new experimental model to study vascular elastic fiber formation
3. 学会等名 The 100th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷藤章太, 川原玄理, 中村隆, 飯田早紀, 林由起子, 横山詩子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおけるアンジオテンシンIIの血管への作用の検討
3. 学会等名 第190回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Tanifuji, Genri Kawahara, Takashi Nakamura, Saki Iida, Yukiko K. Hayashi, Utako Yokoyama
2. 発表標題 A novel zebrafish model of aortic aneurysm
3. 学会等名 The 99th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Tanifuji, Genri Kawahara, Saki Iida, Yukiko K. Hayashi, Utako Yokoyama
2. 発表標題 Development of a novel zebrafish model for aortic aneurysm
3. 学会等名 The Joint Meeting of the 126th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021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
---------	---------