

## 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24年5月11日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790241

研究課題名（和文） プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体を介した新規血小板凝集抑制作用の解明研究課題名（英文） Clarification of the mechanism of a novel inhibitory effect on platelet aggregation via prostaglandin E<sub>2</sub> receptor

研究代表者

柏木 仁 (KASHIWAGI HITOSHI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60510609

研究成果の概要（和文）：マウス血小板を用いた検討により、プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体サブタイプの EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> を選択的に刺激することで凝集抑制作用を示すことが示唆された。ヒト血小板においても、マウス同様 EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> を刺激することで血小板凝集抑制作用が示されるが、特に EP<sub>4</sub> アゴニストのヒト血小板に対する凝集抑制の効力が高いことが明らかとなり、EP<sub>4</sub> アゴニストの新規抗血小板薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was suggested that selective activation of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype EP<sub>2</sub> or EP<sub>4</sub> showed the inhibitory effect on platelet aggregation. Notably, an EP<sub>4</sub> agonist can inhibit human platelet aggregation with high potency, suggesting a potential of EP<sub>4</sub> agonists as novel anti-platelet agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：心血管・血液

## 1. 研究開始当初の背景

(1) プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) よりなる生理活性脂質であり、生体において多彩な作用を示す。プロスタノイド受容体には、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub> の受容体として DP、EP、FP、IP、TP が、さらに EP には EP<sub>1</sub>～EP<sub>4</sub> の4種類のサブタイプが存在する。

(2) 血小板は、生理的な止血機構や病理的な血栓形成過程において中心的な役割を果た

す。従来、血小板の機能調節には、活性化作用を示す TXA<sub>2</sub> と抑制作用を示す PGI<sub>2</sub> のバランスが重要と考えられてきた。一方、当研究室では、PGE<sub>2</sub> が濃度に応じて血小板凝集を促進あるいは抑制することを確認しているが、各 PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプの役割についての詳細は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

(1) PGE<sub>2</sub> の血小板凝集抑制作用が EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub>

を介したものであることを明らかにするため、EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>の欠損マウスおよびEP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>の特異的アゴニストを用いて検討する。

(2) PGE<sub>2</sub>の血小板機能調節における作用機序を明らかにするため、cAMP量を測定してEP<sub>2</sub>およびEP<sub>4</sub>の情報伝達経路を解析する。

(3) 臨床に応用できる新規薬剤の開発を考慮し、PGE<sub>2</sub>がEP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>を介してヒト血小板に作用するか否かについて検討する。

### 3. 研究の方法

(1) マウスおよびヒトから採取した血液から多血小板血漿 (PRP) と乏血小板血漿 (PPP) を調製し、TPアゴニストであるU-46619もしくはアデノシン二リン酸 (ADP) を添加して血小板を50%程度凝集させ、PGE<sub>2</sub>や各受容体アゴニストがこの血小板凝集反応を抑制するか否かを血小板凝集計を用いて解析する。

(2) マウスおよびヒトから採取した血液から洗浄血小板を調製し、EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>のアゴニストを添加した際のcAMP量をラジオイムノアッセイ法により測定する。

### 4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① マウスおよびヒト血小板におけるPGE<sub>2</sub>受容体の発現をRT-PCR法により解析した結果、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>、EP<sub>4</sub>のmRNAの発現を確認した。

② U-46619で凝集を惹起したマウス血小板に及ぼすPGE<sub>2</sub>の作用を検討した結果、PGE<sub>2</sub>は低濃度では血小板凝集を促進する一方、高濃度では血小板凝集を抑制した。また、PGE<sub>2</sub>の血小板凝集促進作用は、EP<sub>3</sub>欠損マウスにおいてほぼ消失した。PGE<sub>2</sub>の血小板凝集抑制作用は、IP欠損マウスにおいて有意に減弱したもののEP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>の欠損マウスにおいて差は認められず、PGE<sub>2</sub>の血小板凝集抑制作用におけるEP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>の寄与は小さいことが示唆された。一方、EP<sub>3</sub>とIPの両欠損マウスを用いた検討では、PGE<sub>2</sub>の血小板凝集抑制作用のみが認められた。

③ EP<sub>2</sub>を選択的に刺激した際の血小板凝集に及ぼす作用を解析するために、EP<sub>2</sub>のアゴニストであるAE1-259を用いて検討した(図1)。AE1-259は、野生型マウス(WT)の血小板凝集を濃度依存的に抑制し、この抑制作用はEP<sub>2</sub>欠損マウス(EP<sub>2</sub><sup>-/-</sup>)において有意に減弱したことから、EP<sub>2</sub>を選択的に刺激することで血小板凝集が抑制されることが示唆された。

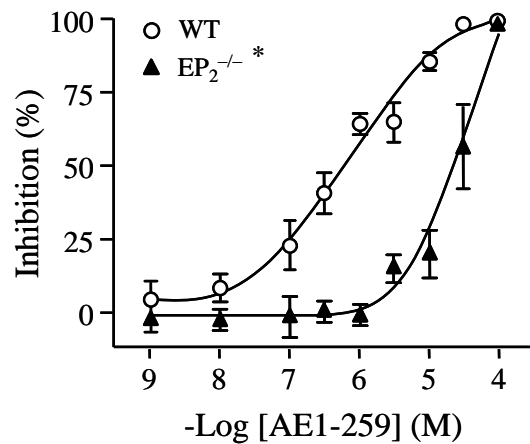


図1 マウス血小板に対するEP<sub>2</sub>アゴニストの凝集抑制作用

④ 同様に、EP<sub>4</sub>を選択的に刺激した際の血小板凝集に及ぼす作用を解析するために、EP<sub>4</sub>のアゴニストであるAE1-329を用いて検討した(図2)。AE1-329は、野生型マウス(F2-WT)の血小板凝集を濃度依存的に抑制し、この抑制作用はEP<sub>4</sub>欠損マウス(EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup>)において有意に減弱したことから、EP<sub>4</sub>を選択的に刺激することで血小板凝集が抑制されることが示唆された。

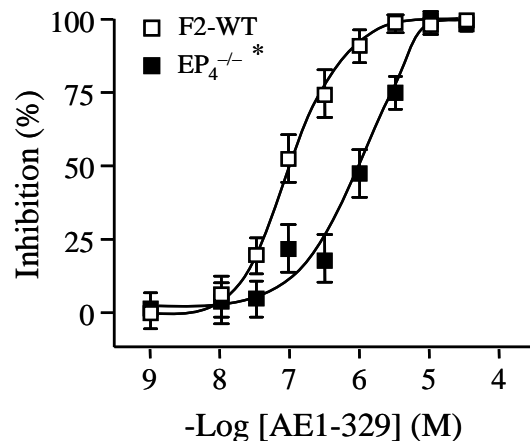


図2 マウス血小板に対するEP<sub>4</sub>アゴニストの凝集抑制作用

⑤ マウス同様、ヒト血小板においてもEP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>を選択的に刺激することで凝集が抑制されるか否かを明らかにするため、AE1-259とAE1-329を用いて検討した(図3)。AE1-259は、ヒト血小板の凝集を濃度依存的に抑制し、その抑制の効力はマウス血小板の場合と同程度であった。一方、AE1-329は、ヒト血小板の凝集を濃度依存的に抑制したが、その抑制の効力はマウス血小板の場合よりも高く、代表的なIPアゴニストであるペラプロストと同程度であった。

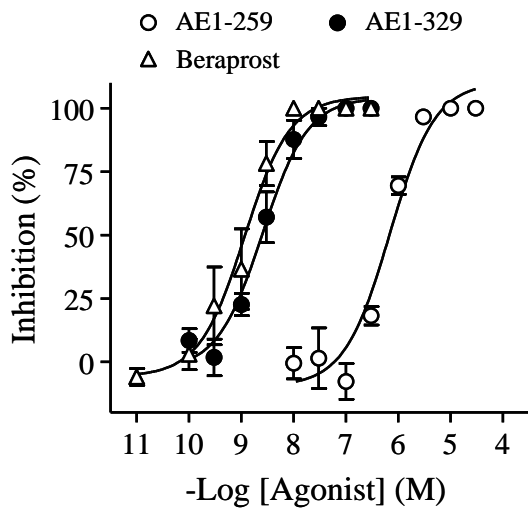


図3 ヒト血小板に対するEP<sub>2</sub>アゴニストとEP<sub>4</sub>アゴニストの凝集抑制作用

⑥ ADPで凝集を惹起したヒト血小板に及ぼすAE1-329の作用を検討した結果、U-46619で凝集を惹起した場合と同様、濃度依存的に凝集を抑制した。また、AE1-329の血小板凝集抑制作用は、EP<sub>4</sub>アンタゴニストであるAE3-208の添加によりほぼ完全に消失したことから、AE1-329はたしかにEP<sub>4</sub>を介して血小板凝集を抑制していることが示唆された。

⑦ ヒト血小板にAE1-329を添加してcAMP量を測定した(図4)。AE1-329は、濃度依存的に血小板のcAMP量を増加させた。また、この増加はAE3-208の添加により抑制されたことから、AE1-329はEP<sub>4</sub>を介して血小板のcAMP量を増加させていることが示唆された。

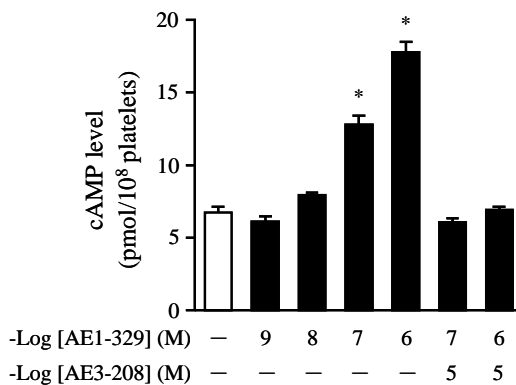


図4 EP<sub>4</sub>アゴニストによるヒト血小板cAMP量の増加

## (2) 総括

血小板にはIP、TPに加えてEP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>、EP<sub>4</sub>のmRNAの発現が認められ、血小板におけるPGE<sub>2</sub>の作用は複数の受容体を介した複雑なも

のであることが予想される。実際、PGE<sub>2</sub>は低濃度では血小板凝集を促進する一方、高濃度では血小板凝集を抑制することが報告されており、本研究でも同様の結果が得られた。PGE<sub>2</sub>の血小板凝集促進作用に関しては、EP<sub>3</sub>が関与していることを以前に当研究室より報告している。PGE<sub>2</sub>の血小板凝集抑制作用についても、一部IPが関与していると報告されているが、EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>の役割については未だ不明な点が多い。本研究のEP<sub>3</sub>とIPの両欠損マウスを用いた検討では、EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>を介していると思われるPGE<sub>2</sub>の血小板凝集抑制作用が確認された。一方、EP<sub>2</sub>およびEP<sub>4</sub>欠損マウスと野生型マウスとの間に有意な差は認められず、EP<sub>3</sub>存在下ではPGE<sub>2</sub>の血小板凝集に対する作用へのEP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>の寄与は小さいことが示唆された。そこで、EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>を選択的に刺激した時の血小板凝集への作用について検討するため、EP<sub>2</sub>アゴニストであるAE1-259とEP<sub>4</sub>アゴニストであるAE1-329を用いて検討した。AE1-259とAE1-329共に濃度依存的な血小板凝集抑制作用を示し、それぞれの作用はEP<sub>2</sub>およびEP<sub>4</sub>欠損マウスにおいて有意に減弱したことから、EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>を選択的に刺激することで血小板凝集抑制作用を示すことが示唆された。また、AE1-259とAE1-329は、ヒト血小板においても濃度依存的に凝集を抑制した。AE1-259の凝集抑制の効力は、マウスとヒトの血小板と同程度であったが、AE1-329の凝集抑制の効力は、マウス血小板に比べてヒト血小板では高いことが示唆された。さらに、EP<sub>4</sub>アンタゴニストであるAE3-208を用いた検討により、AE1-329はたしかにEP<sub>4</sub>を介してcAMP量を増加させ、血小板凝集を抑制していることが明らかとなった。

## (3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

近年、PGE<sub>2</sub>が血小板の機能調節に関与していることが報告され、当研究室ではこれまでに、PGE<sub>2</sub>がEP<sub>3</sub>を介して血小板の凝集を促進することを明らかにした。加えて、本研究により、EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>を選択的に刺激することで血小板凝集抑制作用を示すことを初めて明らかにした。

## (4) 今後の展望

古くから抗炎症薬として使用されているアスピリンなどのNSAIDsに加え、近年、副作用の少ない抗炎症薬としてCOX-2選択的阻害薬が多く分野で用いられている。しかし、COX-2阻害薬の一部が心血管系イベントのリスクを増加させることが報告された。その詳細な機序は不明であるが、非選択的にプロスタノイド産生を抑制するCOX-2阻害薬の限界を示すものであり、個々のプロスタノイド受

容体をターゲットとした新規の薬物の開発が進められている。抗血小板薬に関しても、血小板機能調節における TXA<sub>2</sub> と PGI<sub>2</sub> の役割を基にこれら受容体を標的とする薬物が開発されてきたが、PGE<sub>2</sub> 受容体をターゲットとした抗血小板薬は存在しない。本研究により、EP<sub>4</sub> アゴニストのヒト血小板に対する凝集抑制の効力が高いことが明らかとなり、EP<sub>4</sub> アゴニストの新規抗血小板薬としての可能性が示唆された。

#### 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 Naoki Nakagawa, 他 13 名 (9 番目)、The intrinsic prostaglandin E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice、Kidney International、査読有、in press
- ② Koh-ichi Yuhki, Fumiaki Kojima, Hitoshi Kashiwagi, 他 4 名、Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies、Pharmacology and Therapeutics、査読有、Vol.129、2011、195-205
- ③ Shuhko Kuriyama\*, Hitoshi Kashiwagi\* (\*These authors contributed equally to this work.), 他 10 名、Selective activation of the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype EP<sub>2</sub> or EP<sub>4</sub> leads to inhibition of platelet aggregation、Thrombosis and Haemostasis、査読有、Vol.104、2010、796-803

[学会発表] (計 4 件)

- ① Hitoshi Kashiwagi、Inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> synthase prevents reduction in the anti-platelet effect of a prostaglandin I<sub>2</sub> receptor agonist after repeated administration、第 82 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、国立京都国際会館 (京都府)
- ② 柏木仁、プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体サブタイプ EP<sub>4</sub> の抗血小板療法ターゲットとしての可能性、第 20 回日本循環薬理学会、2010 年 11 月 11 日、札幌市教育文化会館 (北海道)
- ③ Hitoshi Kashiwagi、Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> emerge as novel targets for anti-platelet therapy、2010 Keystone Symposia (Bioactive Lipids: Biochemistry and

Diseases)、2010 年 6 月 8 日、ウェスティンホテル京都 (京都府)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柏木 仁 (KASHIWAGI HITOSHI)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60510609

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし