

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590294

研究課題名(和文)プロスタノイドによる虚血心筋保護の情報伝達系の解明

研究課題名(英文)The elucidation of the signal transduction system of ischemic myocardial protection of prostanoids

研究代表者

結城 幸一 (YUHKI, KOH-ICHI)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80302420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞後のすみやかな心臓の再灌流は、心筋保護のために必須である。しかしながら、再灌流はそれ自身が虚血心筋の障害をかえって悪化させてしまうことがある(再灌流障害)。心筋神経終末からの過剰なノルエピネフリン放出は、虚血心筋障害に関与している。プロスタノイドは、プロスタグランジン(PG)とトロンボキサンからなる生理活性脂質である。本研究で我々は、PGE2受容体欠損マウスを用いて、心筋梗塞におけるプロスタノイドの心筋保護作用のメカニズムについて解析した。その結果、虚血心臓において、内因性のPGE2は、EP3受容体を介してノルエピネフリン放出を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：After the onset of myocardial infarction, timely myocardial reperfusion is essential for myocardial salvage. However, reperfusion itself exacerbates injury of previously ischemic myocardium. (reperfusion injury). The excessive release of norepinephrine from cardiac sympathetic nerve terminal is known to be involved in the pathogenesis of ischemic cardiac injury. Prostanoids are bioactive lipid mediators consisting of prostaglandins (PGs) and thromboxane. In this research, we analyzed the mechanism of the cardioprotective action of prostanoids in myocardial infarction, using mice lacking the PGE2 receptors. In ischemic hearts, we demonstrated that endogenous PGE2 suppresses norepinephrine release via EP3 receptor.

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：心筋梗塞 プロスタノイド

1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋梗塞は、動脈硬化巣の破綻に続いて形成された血栓が冠動脈を閉塞することにより突然発症し、心筋壊死を生じる疾患である。近年、緊急カテーテル治療法の進歩により、閉塞してしまった冠動脈の速やかな再灌流が可能となり、生存率は飛躍的に向上したが、心筋梗塞は今なお死因の上位を占めており、その治療法の確立が重要な課題となっている。冠動脈の閉塞は、心筋の壊死を生じるため速やかな血流の再灌流を必要とする。しかし、再灌流することによって生じるフリーラジカルなどがかえって病態を悪化させることが知られており、再灌流障害と呼ばれ問題となっている。

(2) 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) より成る生理活性脂質であり、生体内において非常に多彩な作用を示す。この作用は、標的細胞表面に存在する各プロスタノイドに特異的な受容体を介して発揮される。現在まで、PGD₂、PGE₂、PGF₂α、PGI₂、TXA₂ の受容体として DP、EP、FP、IP、TP が知られており、EP には EP₁~EP₄ の4種類のサブタイプが存在する。プロスタノイド受容体は、共役するシグナル伝達系によって3つのサブファミリーに分類できる。つまり、G_s に共役して cAMP 産生系に働く DP、EP₂、EP₄、IP、G_q に共役して細胞内 Ca²⁺ 動員に働く EP₁、FP、TP、G_i に共役して cAMP 産生抑制系に働く EP₃、である。一方、生体のほとんどの細胞が何種類かのプロスタノイドを産生すること、プロスタノイド受容体の組織発現が多岐に渡ること、さらに最近では、各 PG 受容体は発現する細胞によって共役する G タンパク質の種類が異なる場合や G タンパク質非依存性のシグナル経路が活性化されるケースも報告されていることなどからプロスタノイドの生体における作用や役割は多種多様な様相を呈している。我々はこれまでに、心肥大における PGI₂-IP 系の心肥大抑制作用 (*Circulation* 112:84-92,2005.)、炎症性頻脈における TXA₂-TP、PGF₂α-FP 系の頻脈惹起作用 (*Nat. Med.* 11:562-566,2005.)、腎血管高血圧における PGI₂-IP 系のレニン分泌促進作用を介した昇圧作用 (*J. Clin. Invest.* 114:805-812,2004.) を明らかにし、循環器疾患の病態形成におけるプロスタノイドの重要性を示してきた。一方、心筋梗塞においては、従来、低用量アスピリンを用いた抗血小板療法が、心筋梗塞発症後の血栓再発防止を目的として広く用いられている。これは、2種類存在するプロスタノイド産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) のうち、血小板に存在する常在型 COX (COX-1) を阻害することにより、血小板活性化能の高い TXA₂ 産生を抑制することを原理としている。その後、炎症により発現が誘導される誘導型 COX (COX-2) を選択的に抑制する COX-2 阻害薬が、炎症性疾患の軽減のために開発された。

しかし、その一つであるロフェコキシブを用いた数種の大規模臨床試験において、この薬物が心筋梗塞の発生リスクを増大させることが報告された。その原因の1つとして血管内皮での PGI₂ 産生を抑制したことが考えられている。これらの事実は、心筋梗塞発症機軸におけるプロスタノイドの役割の重要性を示すものである。しかし、血栓形成後に生じる心筋梗塞自体の病態形成でのプロスタノイドの役割の詳細は不明である。このような状況下、我々は心筋梗塞に伴う COX-2 の発現誘導や COX 阻害薬の心筋梗塞増悪作用を見出した。これらの結果は、プロスタノイドが心筋梗塞の病態形成に関与することを示唆していた。これまでに我々は、プロスタノイド受容体欠損マウスを用い、心筋梗塞病態形成における PGI₂-IP 系と PGE₂-EP₄ 系が心保護作用を発揮することを明らかにした (*Circulation* 104:2210-2215,2001; *Circulation* 109:2462-2468,2004.)。また、PGE₂-EP₃ 系についても心保護作用を示すことが我々を含めた幾つかのグループから報告されている。しかし、その詳細については不明な点が多く残されている。

(3) 心筋虚血時には交感神経から神経伝達物質であるノルアドレナリンが過剰に放出され、再灌流後の不整脈発症の原因となっており、心機能障害の悪化に関与していると考えられている。このノルエピネフリン放出には、エンドセリン、アンジオテンシン、ヒスタミンなどの G 蛋白質共役型受容体の関与が報告されているが、内因性プロスタノイドの関与についての詳細な検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プロスタノイドが心筋梗塞の病態形成においてどのようなメカニズムにより心保護作用を発揮するのか解明することにある。

3. 研究の方法

(1) 心筋梗塞の病態生理は心臓の虚血-再灌流障害と考えられている。そこで、この病態 [一定時間の血流の遮断(栄養の途絶、無酸素化)と再開通(栄養供給の再開、再酸素化)] に即した実験系を用いて解析を行った。

(2) 摘出灌流心臓への虚血-再灌流実験
マウスをペントバルビタール(50 mg/kg 体重)で麻酔後、心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流装置(プライムテック製:IPH-L2)に装着し、大動脈に栄養液(95% O₂、5% CO₂ 混合ガスを十分に通気させた Krebs-Henseleit bicarbonate buffer)を逆行性に定圧(60 mmHg)で供給することにより冠動脈を灌流した。20~30 分間安定化させた後、栄養液の供給を途絶(30 あるいは 40 分間)-再開(60 分間)することにより虚血-再灌流負荷とした。

(3) 心虚血-再灌流負荷による灌流液へのノ

ルエピネフリン放出量の解析

摘出灌流心臓へ供給された後に排出された灌流液を、再灌流開始から5分後まで回収し、HPLCを用いてノルエピネフリン放出量を定量した。

(4) DNA マイクロアレイを用いた解析

虚血-再灌流負荷をかけた心臓と負荷をかけていない心臓について、RNeasy fibrous tissue mini kit (キアゲン)を用いてトータル RNA を抽出し、3D-Gene® マイクロアレイ解析 (東レ) をおこなった。

(5) 定量 RT-PCR による mRNA 発現量の解析

虚血-再灌流負荷後、心臓を摘出し、サンプリングした左心室をホモジナイズし、RNeasy fibrous tissue mini kit を用いてトータル RNA を抽出し、SuperScript VIL0 (インビトロジェン)により逆転写反応を行った。そこから total RNA 抽出、逆転写反応を行いサンプルとした。PCR は、TaqMan Probe 法により、7300 Real Time PCR System (アプライドバイオシステムズ)を用いて行った。

(6) ウェスタンブロット

虚血-再灌流負荷後、心臓を摘出、ホモジナイズし、抗リン酸化 ERK 抗体、抗リン酸化 p38MAPK 抗体、抗リン酸化 AMPK 抗体 (Cell signaling 社)を用いて、心臓保護に関係するキナーゼのリン酸化をウェスタンブロットにより解析した。

(7) マウス成獣心筋細胞の培養

麻酔をかけたマウスから心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流装置に装着し、カルシウムフリーの緩衝液で心臓を灌流後、500 U/ml コラゲナーゼ (Worthington)、10 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM:SIGMA)、0.02 mg/ml プロテアーゼ XIV、50 mM CaCl₂・2H₂O の加えられた緩衝液で20分間酵素処理灌流した。酵素処理終了後、酵素液を洗浄し、培養用培地 (DME:インビトロジェン)の濃度まで徐々にカルシウム濃度を上げ、最後の培養液には、BDMの代わりに25 μM のプレビスタチンを加えた。この単離したロッド状の成獣心筋細胞をラミニンコートされた培養容器にまきこみ接着させ、実験に用いた。

4. 研究成果

(1) 虚血-再灌流後の心交感神経からのノルエピネフリン放出

野生型マウスおよび EP₃ 欠損マウスのいずれの心臓においても虚血にする前の灌流液からは、ノルエピネフリンを検出できなかった。これに対し、野生型マウス心灌流液において再灌流開始後1分間のノルエピネフリン放出量は、最も高い値を示し、その後減少していった。一方、EP₃ 欠損マウス心灌流液においては、再灌流開始1分間のノルエピネフリン放出量が野生型マウスの約3倍と有意に高い値を示した。一方、冠血管の弛緩収縮の変化を表す灌流液量については、再灌流後に虚血前の2~3倍に増加したが、両群間で有意な差は認められず、冠血管の弛緩に PGE₂-EP₃系は

関与していなかった。この結果は、PGE₂-EP₃系による虚血心筋保護作用の一部として、虚血時に心臓組織内で内因性に産生された PGE₂ が、EP₃ 受容体を介して神経終末からの過剰なノルエピネフリン放出を抑制し、心機能障害の抑制に関与していることを示している。

(2) 虚血-再灌流による心臓組織内 mRNA 発現変化の解析

野生型マウスと EP₃ 受容体欠損マウスとで、虚血-再灌流負荷を加えたサンプルについて比較を行った。その結果、DNA マイクロアレイでいくつかの遺伝子発現量に変化が認められ、リアルタイム RT-PCR で確認をおこなった。その結果、アポトーシス関連遺伝子の発現が有意に変化していた。

(3) 虚血-再灌流による心臓組織内リン酸化蛋白質産生量の変動解析

心臓の虚血-再灌流負荷前と負荷後の心臓サンプルについて、虚血心筋保護作用が報告されているリン酸化 ERK、リン酸化 p38 MAPK、リン酸化 AMPK の産生量を比較したが、今回の条件下では、虚血-再灌流による産生量の増加に野生型マウスと EP₃ 欠損マウスの心臓間で有意な差は認められなかった。

(4) マウス成獣心筋細胞の培養

成獣心筋細胞への EP₃ アゴニスト刺激による蛋白質発現の変化を介した虚血心筋保護作用を解析するために、成獣心筋細胞の長時間培養系の確立を試みた。BDM の代わりにプレビスタチンを培養系に添加することにより、BDMでは不可能だった24時間以上の長時間培養が可能となった。この系を用い、低酸素刺激や過酸化水素刺激といった虚血状態におけるプロスタノイドの役割については現在さらに検討中である。

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7件)

小島史章、結城幸一、柏木仁、糸井志麻、牛首文隆 虚血による神経障害の分子メカニズム プロスタノイドの役割 日本臨牀 in press (査読無)

Aburakawa Y (15人中13番目), et al. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind Limb model. *Circ. J.* 25:1053-1062, 2013. (査読有)

Toda K, Ono M, Yuhki K, Ushikubi F, and Saibara T. 17 β -Estradiol is critical for the preovulatory induction of prostaglandin E₂ synthesis in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 362: 176-182, 2012. (査読有)

Nakagawa N, Yuhki K, Kawabe J, Fujino T, Takahata O, et al. The intrinsic

prostaglandin E₂-EP₄ system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice. *Kidney Int.* 82: 158-171, 2012. (査読有)

結城幸一、柏木仁、小島史章、牛首文隆
エイコサノイド 臨床検査 56巻145頁-150頁、2012. (査読無)

結城幸一、柏木仁、小島史章、牛首文隆
プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた心血管系におけるプロスタノイドの作用血栓と循環 20巻4頁-8頁、2012. (査読無)

小島史章、結城幸一、柏木仁、桑井志麻、牛首文隆
PG/LT と炎症 日本臨床 70巻 (suppl.8) 231頁-235頁、2012. (査読無)

〔学会発表〕(計5件)

Kashiwagi H, Yuhki K, Kojima F, Kumei S, Sakai Y, Narumiya S, Ushikubi F.
Thromboxane A₂ plays a critical role in reduction of the anti-platelet effect of prostaglandin I₂ receptor agonist beraprost after repeated administration.
第87回日本薬理学会年会、2014年3月19日～21日 (発表は21日) 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

結城 幸一 (YUHKI KOH-ICHI)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80302420