

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	結城 幸一
-------	----	----	-------

学 位 論 文 題 目

**Prostaglandin E₂ protects the heart from ischemia-reperfusion injury
via its receptor subtype EP₄**

(プロスタグランジン E₂ はその受容体サブタイプ EP₄ を介して
虚血-再灌流障害から心臓を保護する)

共著者名

肖 春陽、原 明義、藤野 貴行、栗山 周子、
山田 武宏、高山 浩二、高畑 治、苅部 英寿、
谷口 隆信、成宮 周、牛首 文隆

掲載学会雑誌名

Circulation (印刷中)

研 究 目 的

急性心筋梗塞は、動脈硬化性病変などに基づく冠動脈の閉塞に起因し、心血管死の主要な原因となっている。また、その病態生理は、心臓の虚血-再灌流障害と考えられている。一方、急性心筋梗塞時には、アンギオテンシンやエンドセリンなど種々のメディエーターが産生され、心筋の虚血-再灌流障害の進行を修飾している。最近、プロスタグランジン (PG) 産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) -2 が、急性心筋梗塞の心臓で発現誘導され、同時に PGE₂ の産生が亢進することが報告された。しかし、心筋の虚血-再灌流障害における PGE₂ の役割については不明である。

PGE₂ は、4種類の特異的受容体 (EP₁、EP₂、EP₃、EP₄) を介し、その作用を発揮する。また、ヒトを含めた動物の心臓において、EP₄ mRNA の高発現が報告されている。しかし、心臓での PGE₂-EP₄ 系の役割についての報告はない。

本研究は、EP₄ 欠損マウスと新規選択的 EP₄ アゴニストを用い、心臓の虚血-再灌流障害における PGE₂-EP₄ 系の役割解明を目的とする。

材 料 ・ 方 法

使用動物：雄性の野生型マウスと EP₄ 欠損マウス（10～16 週齢）および胎児マウスを用いた。

RT-PCR：胎児心臓の非筋細胞および成獣マウスの心室と心筋細胞から total RNA を抽出し、オリゴ dT と逆転写酵素によって cDNA を合成し、各 PGE₂ 受容体サブタイプ特異的プライマーを用い競合的 RT-PCR を行った。

急性心筋梗塞モデル：マウスを麻酔・人工呼吸器下で開胸し、左冠動脈前下行枝を結紮した。虚血から 1 時間後、結紮糸をほどき心臓の再灌流を行った。再灌流 24 時間後、心臓を Evans blue と triphenyltetrazolium chloride を用いて染色し、虚血領域と梗塞領域のサイズを解析した。

ランゲンドルフ式灌流心：マウス摘出心臓をランゲンドルフ式に灌流し、ペーシングにより拍動を一定とし、灌流液の循環を途絶・再開して虚血-再灌流負荷を加えた。この際、心収縮力、冠灌流量、灌流液中のクレアチンキナーゼ遊出量を測定した。

細胞培養：胎生 18～20 日のマウス胎児より心臓を摘出し、コラゲナーゼ処理し、分別接着法により心筋細胞と非筋細胞を単離し実験に用いた。

細胞内 cAMP 濃度の測定：培養心筋および非筋細胞を、選択的 EP₄ アゴニスト AEI-329 で 37 °C、30 分間刺激した。ついで、トリクロロ酢酸で反応を停止させ、RIA により cAMP 量を定量した。

血圧・心拍数の測定：血圧および心拍数を、tail-cuff 法を用い測定した。

使用薬物：選択的 EP₄ アゴニスト AEI-329 および 4819CD は、小野薬品工業より供与された。AEI-329 はエタノールに溶解し、4819CD は生理食塩水に溶解し用いた。

成 績

心臓における各 PGE₂ 受容体サブタイプ mRNA の発現

マウス心室において、EP₂、EP₃、EP₄ mRNA の発現が検出された。その発現量は、EP₄、EP₃、EP₂ で各々 54.3 ± 7.4 、 13.2 ± 2.3 、 1.3 ± 0.5 copies/ng total RNA であり、EP₄ mRNA が最も多く発現していた。一方、単離成獣心筋細胞は、EP₃、EP₄ mRNA を発現しており、胎児非筋細胞は EP₂、EP₃、EP₄ mRNA を発現していた。また、両者とも EP₄ mRNA を最も多く発現していた。

***In vivo* 心虚血-再灌流障害における内因性 PGE₂ の心筋保護作用**

In vivo 心虚血-再灌流障害モデルを用い、内因性 PGE₂ の役割を解析した。その結果、野生型に比し EP₄ 欠損マウスでは心臓の梗塞サイズが有意に (37%) 大きかった。この結果、内因性 PGE₂ は心臓の虚血-再灌流障害において EP₄ を介して心保護的に働くことが明らかとなった。

***Ex vivo* 心虚血-再灌流障害における内因性 PGE₂ の心筋保護作用**

血液・神経因子の影響を除外したランゲンドルフ式灌流心を用い、*ex vivo* 虚血-再灌流障害における内因性 PGE₂ の役割を解析した。この結果、野生型マウスと比較し、EP₄ 欠損マウスでは再灌流時の収縮期張力の回復が遅延し、クレアチンキナーゼ遊出量が高値を示した。これらの結果、PGE₂ の心臓保護作用は、その心臓への直接作用によることが明らかとなった。

AEI-329 の培養心筋細胞および非心筋細胞での細胞内 cAMP 濃度への作用

AEI-329 は、濃度依存的に培養非心筋細胞内 cAMP 濃度を増加させ、その EC₅₀ 値は 33 nM であった。一方、AEI-329 は 10 μM の濃度で、培養心筋細胞 cAMP 濃度を有意に増加させた。これらの AEI-329 の効果は、EP₄ 欠損マウスからの細胞では完全に消失した。これらの結果、PGE₂ は心筋細胞と非心筋細胞の両者に、EP₄ を介して作用することが示された。

***In vivo* 心虚血-再灌流障害における 4819CD の心筋保護作用**

In vivo 心虚血-再灌流障害モデルを用い、虚血前あるいは虚血後に 4819CD を皮下投与 (300 μg/kg) し、梗塞サイズに対する効果を解析した。この結果、虚血前と虚血後の両群において、4819CD はコントロール群に比し、梗塞サイズを有意に (約 40%) 減少させた。これらの効果は、EP₄ 欠損マウスで完全に消失した。これらの結果、EP₄ アゴニストは虚血前および虚血後のいずれの投与でも、心保護作用を示すことが明らかとなった。

考 案

本研究により、虚血-再灌流障害における PGE₂ の EP₄ を介した心保護作用が初めて明らかとなった。PGE₂-EP₄ 系の刺激は、心筋細胞と非心筋細胞の両者において細胞内 cAMP 濃度を上昇させた。非心筋細胞での細胞内 cAMP 濃度の上昇は、傷害性サイトカイン TNF-α の発現を下げ、抗傷害性サイトカイン IL-10 の産生を亢進することが報告されている。また心虚血-再灌流障害において肝細胞増殖因子 (HGF) が心筋保護に働くことが報告されており、PGE₂ の HGF 産生亢進作用が知られている。PGE₂ は、これらの機構や心筋細胞への直接作用によって心保護作用を示すと考えられるが、その詳細については今後の検討が必要である。

これまで、虚血性心疾患の治療にβ-ブロッカーやカルシウム拮抗薬などが用いられてきたが、これらの虚血発症後の投与での効果は少ない。一方、EP₄ アゴニストは虚血前と虚血後の両方の投与で心保護作用を示したことから、急性心筋梗塞に対する治療薬としての可能性が示唆された。

心筋梗塞後の再発防止のため、低容量アスピリンの投与が推奨されている。しかし、COX 阻害薬はPGE₂-EP₄ 系を抑制するため、再発した心筋梗塞を悪化させる可能性が考えられる。このような時、選択的 EP₄ アゴニストの有効性が、より明らかとなることが期待される。

結 論

内因性 PGE₂ および外因性に投与された 4819CD は、いずれも EP₄ を介して虚血-再灌流障害から心臓を保護する。EP₄ アゴニストの効果的で強い心保護作用は、その急性心筋梗塞の治療薬としての可能性を示唆している。

参 考 文 献

1. Xiao, C.-Y., Hara, A., Yuhki, K., Fujino, T., Ma, H., Okada, Y., Takahata, O., Yamada, T., Murata, T., Narumiya, S. and Ushikubi, F. Role of prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ in cardiac ischemia-reperfusion injury; a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 104: 2210-2215, 2001.
2. Yamada, T., Fujino, T., Yuhki, K., Hara, A., Karibe, H., Takahata, O., Okada, Y., Xiao, C.-Y., Takayama, K., Kuriyama, S., Taniguchi, T., Shiokoshi, T., Ohsaki, Y., Kikuchi, K., Narumiya, S. and Ushikubi, F. Thromboxane A₂ regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 108: 2381-2386, 2003.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	結城 幸一
<p>審査委員長 菊池 健次郎 ㊟</p> <p>審査委員 笹嶋 唯博 ㊟</p> <p>審査委員 牛首 文隆 ㊟</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Prostaglandin E₂ protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP₄</p> <p>(プロスタグランジン E₂ はその受容体サブタイプ EP₄ を介して 虚血-再灌流障害から心臓を保護する)</p>			
<p>急性心筋梗塞 (AMI) や急性冠症候群 (ACS) 時には、経皮的カテーテルインターベンション (PCI) による再灌流療法が日常的に行われている。虚血-再灌流時には心筋障害が生じ、その多寡が心機能の予後を左右することから再灌流障害の軽減治療法の開発は重要な課題とされている。一方、最近、AMI の心臓で Prostaglandin (PG) 産生の律速酵素である Cyclooxygenase (COX) -2 が発現・誘導され、PGE₂ 産生の増加することが報告された。PGE₂ には 4 種類の特異的受容体 (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄) が存在し、ヒトを含めた動物の心臓では EP₄ mRNA の高発現が指摘されている。しかし、心臓および虚血再灌流障害に関わる PGE₂-EP₄ 系の意義について検討した報告はみられない。そこで本論文では、心筋の虚血再灌流障害に寄与する PGE₂-EP₄ 系の意義を、10-16 週齢の雄性野生型 mouse、EP₄ 欠損 mouse および胎児 mouse と新しい選択的 EP₄ agonist を用いて検討した。</p> <p>実験の結果、1) 各 PGE₂ 受容体 subtype の mRNA の発現は、単離心筋細胞では EP₃, EP₄ の 2 種が、非心筋細胞では EP₂, EP₃, EP₄ の 3 種が検出され、いずれも EP₄ mRNA の発現量が最も多く認められた。2) 麻酔・人工呼吸下の左冠動脈前下行枝結紮および 1</p>			

時間後再灌流時の24時間後における梗塞サイズおよびCPK遊出量から評価した再灌流障害の程度は、野生型に比しEP₄欠損 mouse で有意に大きく、心筋収縮期張力の回復も遅延した。3) 選択的EP₄ agonist AEI-329の投与はいずれも有意に培養非心筋細胞および心筋細胞のcAMP濃度を上昇させ、これらの効果はEP₄欠損 mouse 由来の細胞では完全に消失した。4) 虚血-再灌流モデルにおける選択的EP₄ agonist 4819 CDの投与は、虚血前および虚血後のいずれにおいてもコントロール群に比し、梗塞サイズを有意に40%減少させ、これらの効果は、EP₄欠損 mouse で完全に消失した。

本研究の結果、心筋細胞、非心筋細胞のいずれにおいてもPGE₂-EP₄-cAMP系が存在し、この系が虚血-再灌流障害を軽減し、心保護作用を示すことが初めて明示された。とくに、EP₄ agonistの虚血前のみならず虚血後での投与の有用性は、临床上、AMI急性期やACSにおけるPCI治療による再灌流障害軽減治療としてのEP₄ agonistの臨床応用の可能性を強く示唆し、臨床使用可能なEP₄ agonistの開発を含めた、この領域の研究、発展に貢献するところ大と考えられる。なお、論文提出者に対する論文内容および関連領域に対する試問に対して、適切、明解な回答が得られ、学力も十分と判断された。以上より、本審査委員会は、本論文は博士(医学)に値すると判定した。