

学 位 論 文 題 目

Reduced brain injury after occlusion of the middle cerebral artery in mice lacking the prostaglandin E₂ receptor EP₄

(プロスタグランジン E₂ 受容体 EP₄欠損マウスで認められた
中大脳動脈閉塞による脳傷害の軽減)

共著者名

結城 幸一、藤野 貴行、川辺 淳一、
原 明義、苅部 英寿、高畑 治、
山田 武宏、細木 弥生、岩崎 寛、
成宮 周、牛首 文隆

(未公表)

研 究 目 的

プロスタグランジン (PG) は、多彩な生理作用を発揮する生理活性脂質であり、脳においても生理的・病態生理的に重要な役割を果たすと考えられている。一方、PG 生合成系は、リン脂質からアラキドン酸を切り出すホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)、アラキドン酸の PGH₂ (PG の前駆物質) への転換を触媒するシクロオキシゲナーゼ (COX)、PGH₂ から PG (PGI₂、PGF₂、PGD₂、TXA₂) を作り出す各 PG 合成酵素群から成る。このうち、PG 合成の律速酵素である COX には、COX-1 と COX-2 の 2 種類のサブタイプが存在するが、脳には常在型の COX-1 に加え、誘導型である COX-2 が恒常的に発現しているという特徴がある。また、脳血栓症においては、賦活化された COX-2 が産生する PGE₂ が脳虚血障害に関与することが指摘されているが、その詳細については不明な点が多い。そこで本研究は、PGE₂ 受容体サブタイプである EP₄ を欠損するマウスを用い、PGE₂-EP₄ 系が果たす脳血栓症の病態形成における役割の解明を目指した。

材 料・方 法

1. 使用動物

動物は、雄性の野生型マウスおよび EP 欠損マウス (6~12 週齢) を用いた。

2. 脳血栓症モデル

左内頸動脈を経由し、フィラメントに装着した円柱状シリコン (直径 200 μm) を中大脳動脈に楔入して血流を遮断し、脳血栓症モデルを作成した。

3. 血流の測定

Laser-Doppler 血流計のプロローブを頭蓋骨に固定し、中大脳動脈の支配領域 (Core) とその辺縁部 (Periphery) の脳血流量を、虚血直前、虚血直後、虚血 24 時間後に測定した。数値は、虚血直前の血流量に対する % で表記した。

4. 脳梗塞巣サイズの計測

脳虚血 24 時間後、Willis 動脈輪にシリコンが留まるものは除外し、中大脳動脈にシリコンが楔入した脳のみを標本として摘出した。これを 1 mm 厚にスライスしたのち、組織の虚血状態を評価可能な試薬である Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) で染色して脳梗塞巣のサイズを計測した。数値は、大脳全球のサイズに対する % で表記した。

5. 運動機能障害の評価

脳虚血 24 時間後、5 段階よりなる Neurological deficit score (0 点: 運動機能正常、1 点: 尾を持ち上げると脳虚血と反対側の体幹と前足を屈曲する、2 点: 尾を持ち上げると脳虚血と反対側に回りながら歩く、3 点: 通常でも脳虚血と反対側に傾いている、4 点: 自発運動消失) を用い、運動機能障害の程度を盲検法によって評価した。

成 績

1. 脳梗塞巣のサイズ

虚血 24 時間後における EP 欠損マウスの脳梗塞巣サイズ ($7.4 \pm 0.9\%$, $n = 6$) は、野生型マウス ($16.7 \pm 0.5\%$, $n = 5$) に比べ有意に減少していた。また、この減少は大脳皮質領域において顕著であった。このことから、PGE₂-EP₄系は主に大脳皮質領域で働くものと考えられた。

2. 運動機能障害

虚血 24 時間後における EP 欠損マウスの Neurological deficit score (2.0 ± 0.46) は、野生型マウスに比べ有意に小さかった (3.4 ± 0.2 , $n = 5$)。この結果、EP 欠損マウスでは、脳梗塞サイズの減少により運動機能障害が軽度になると考えられた。

3. 脳血流の変化

虚血直後では、Core と Periphery とともに EP 欠損マウスと野生型マウスで同等の血流量低下が認められた。しかし、虚血 24 時間後、Periphery の血流量は、野生型マウス ($26.3 \pm 3.6\%$, $n = 5$) に比べ EP 欠損マウス ($51.2 \pm 7.9\%$, $n = 5$) において有意に多かった。一方、Core については両群間に差は認められなかった。この結果は、EP₄ 欠損マウスでの脳梗塞サイズの減少と一致するものと考えられた。

考 案

本研究により、脳血栓症において、EP₄欠損マウスでの脳梗塞サイズが野生型マウスに比べ有意に減少することが明らかとなった。また、EP₄欠損マウスでの脳虚血に伴う運動機能障害の程度は、野生型マウスに比べ有意に軽度であった。さらに、EP₄欠損マウスの虚血24時間後での中大脳動脈灌流領域辺縁部の血流量は、野生型マウスに比べ有意に豊富であった。これらの結果は、虚血に際し産生されるPGE₂がEP₄を介して脳虚血障害を悪化させることを示している。

細胞質PLA₂あるいはCOX-2を欠損するマウス(引用文献1、2)やCOX-2阻害薬が投与されたマウス(引用文献3)では、中大脳動脈閉塞モデルによる脳梗塞のサイズが、対照群に比べ有意に減少することが報告されている。これらの結果は、脳内PG系が総じて脳虚血傷害を増強することを示している。一方、PGE₂がEP₂を介して脳虚血傷害を軽減するという相反する報告(引用文献4)も認められる。本研究の結果、PGE₂-EP₄系が、従来報告されてきた脳内PG系の脳虚血傷害増強作用の本体であることが示唆された。

結 論

本研究は、PGE₂-EP₄系が脳血栓症での脳虚血傷害を増強することを明らかにした。この知見は、脳虚血障害の機構解明に資するのみでなく、EP₄アンタゴニストの脳血栓症治療薬としての可能性を示している。

引 用 文 献

1. Bonventre, J.V., Huang, Z., Taheri, M.R., O'Leary, E., En, L., Moskowitz, M.A. and Sapirstein, A. Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂. *Nature* **390**: 622-625, 1997.
2. Iadecola, C., Niwa, K., Nogawa, S., Zhao, X., Nagayama, M., Araki, E., Morham, S. and Ross, M.E. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 1294-1299, 2001.
3. Nagayama, M., Niwa, K., Nagayama, T., Ross, M.E. and Iadecola, C. The cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 ameliorates ischemic brain injury in wild-type mice but not in mice with deletion of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**: 1213-1219, 1999.
4. McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., Breyer, R.M. and Andreasson, K. Neuroprotective function of the PGE₂ EP₂ receptor in cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **24**: 257-268, 2004.

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	李 曉 正
<p>審査委員長 田中達也 ㊟</p> <p>審査委員 岩崎寛 ㊟</p> <p>審査委員 牛首文隆 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Reduced brain injury after occlusion of the middle cerebral artery in mice lacking the prostaglandin E2 receptor EP4 (プロスタグランジン E2 受容体 EP4 欠損マウスで認められた中大脳動脈閉塞による脳傷害の軽減)</p>			
<p>脳血栓症は、先進国での主要な死因や神経学的欠陥の原因となっており、その予防や治療が医学における重要な課題となっていますが、脳血栓症の病態形成機構には不明な点が多く残されています。最近、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) -2 が脳梗塞巣周辺で発現誘導されること、また、COX-2 阻害薬や COX-2 欠損マウスを用いた解析から、COX-2 により産生されるプロスタグランジン (PG) E2 が脳血栓症時の脳障害を憎悪させることが報告されています。一方、PGE2 には異なった情報伝達機構を持った EP1-EP4 の4種類のサブタイプ受容体が存在し、その役割を分担しています。</p>			

したがって、どの PGE2 受容体サブタイプが、脳血栓症の病態形成に役割を果たすのかを明らかにすることが重要と考えられています。

本研究は、PGE2 受容体サブタイプである EP4 を欠損するマウスを用い、PGE2-EP4 系が果たす脳血栓症の病態形成における役割を解析しました。その結果、中大脳動脈閉塞による脳血栓症モデルにおいて、虚血 24 時間後での EP4 欠損マウスの脳梗塞巣サイズは、野生型マウスに比べ有意に減少していました。また、この梗塞巣サイズの減少は大脳皮質領域において顕著であり、PGE2-EP4 系は主に大脳皮質領域で働くものと考えられました。また、この時 EP4 欠損マウスの Neurological deficit score は、野生型マウスに比べ有意に小さく、EP4 欠損マウスでは脳梗塞サイズの減少により運動機能障害が軽度になったと考えられました。さらに、虚血直後では、虚血部位 (Core) とその周辺部 (Periphery) とともに EP4 欠損マウスと野生型マウスで同等の血流量低下が認められましたが、虚血 24 時間後では Periphery の血流量は野生型マウスに比べ EP4 欠損マウスにおいて有意に多いことが観察されました。

これらの結果は、虚血に際し産生される PGE2 が EP4 を介して脳虚血障害を悪化させることを示唆しており、PGE2-EP4 系が従来報告されてきた脳内 PG 系の脳虚血傷害増強作用の本体であることが示されました。また、この知見は脳虚血障害の機構解明に資するのみでなく、EP4 アンタゴニストの脳血栓症治療薬としての可能性を示すものであり、当該分野の発展に大きく貢献し得る知見と考えられます。

なお、論文提出者に対する本論文の内容並びに関連分野に関する諮問に対し、適切な回答が得られました。以上より、本論文は医学博士の学位に値するものと判断致しました。