

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	菅 野 貴 康
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Prostaglandin E₂ Mediates the Late Phase of Ischemic Preconditioning in the Heart via Its Receptor Subtype EP₄</p> <p>(プロスタグランジンE₂ は EP₄ 受容体を介して心臓における後期虚血プレコンディショニングを仲介する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>川辺淳一，結城幸一，竹原有史，長谷部直幸，牛首文隆</p> <p>未 公 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>心筋梗塞は、本邦における食生活の欧米化や高齢化社会の進行にともない、発症頻度が高まっており、その効果的治療法の開発が急務となっている。虚血プレコンディショニング（IPC）とは、心臓に短時間の虚血負荷が加わると、その後の心筋梗塞にともなう虚血-再灌流障害が著明に軽減する現象であり、1986年 Murry らによって初めて報告された。以来、この現象を利用した新しい治療法の開発が期待されている。IPC には短時間虚血負荷の直後から数時間の間に働く初期 IPC と、24～72 時間の間に作動する後期 IPC が存在し、後者の臨床的意義がより高いことが指摘されている。しかし、この強力な心保護効果を示す IPC のメカニズムの詳細は不明である。一方、短時間虚血負荷にともない、プロスタグランジン（PG）合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ（COX）-2 の発現が誘導されること、COX-2 阻害薬により後期 IPC が消失することから、後期 IPC への PG 系の関与が示唆されていた（引用文献 1）。また、我々は PGE₂ 受容体サブタイプである EP₄ を欠損するマウスを用い、虚血-再灌流障害において PGE₂/EP₄ 系が心保護的に働くことを報告している（引用文献 2）。そこで、本研究では後期 IPC の成立において PGE₂/EP₄ 系が重要な役割を果たすとの仮説を立て、その検証を試みた。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 使用動物

雄性の野生型 (wild-type ; WT) マウスと EP₄ 受容体欠損 (EP₄^{-/-}) マウス (7~12週齢) を用いた。

2. 虚血プレコンディショニング (IPC) モデル

ペントバルビタール腹腔内投与 (50 mg/kg) による麻酔および人工呼吸管理下, 左側開胸後に心膜を切開した。冠動脈左前下行枝 (LAD) に, 8-0 ナイロン糸を掛けたのち, その両端をポリエチレンチューブに通して輪を形成し, 可逆的虚血負荷モデルを準備した。実際には, ナイロン糸の両端に 1.0 g の張力をかけて LAD を閉塞し, 張力を解除することで再灌流を行った。虚血の成否は, 心臓の色調変化 (白色化) と心電図変化 (QRS 幅増加, ST 上昇) で判断した。IPC 群は, 5 分間の LAD 閉塞と 5 分間の再灌流を 4 サイクル繰り返した (IPC 処置) 後に閉胸し, 24 時間後に 30 分間の LAD 閉塞と再灌流 (虚血-再灌流) を行った。対照群として, 開胸手術のみで IPC 処置をしない群 (sham 群) を併せて作成した。

3. EP₄ 受容体特異的アゴニスト (AE1-329) の効果

WT マウスに対して 30 μg/kg の AE1-329 あるいは vehicle (PBS) を皮下注射し, 30 分後に心臓の虚血-再灌流を行い, 梗塞サズを計測した。また, 虚血の前後で心エコーを行い, M モード法にて左室駆出率 (LVEF) を計測し, 心機能低下を ΔLVEF (虚血後LVEF-虚血前LVEF) として計算した。

4. 心臓組織内 COX-2 mRNA 発現量の測定

IPC 処置から 6 時間後に心臓組織サンプルから total RNA を抽出し, Reverse transcription PCR (RT-PCR) を行い, 心臓組織内の COX-2 mRNA 発現量を評価した。併せて, real-time PCR を用いて定量解析を行った。

5. 心臓組織内 PGE₂ 量の測定

心臓組織内 PGE₂ の定量は, 組織から C-18 SPE カラムを用いて, プロスタグランジンを抽出した後, PGE₂ EIA Kit (Cayman Chemical 社) を使用して ELISA 法により測定した。

6. 心筋梗塞サイズの計測

虚血領域 (area at risk ; AAR) を計測するために, 虚血-再灌流 2 時間後に再び LAD を結紮した状態で, 頸動脈から逆行性に Evans Blue 色素を注射し LAD 灌流域以外の部位を染色した。直後に心臓を摘出し, -80°C で 5 分間冷凍後, 左室長軸に対して垂直に 5 スライスに切り, 生存心筋組織域 (non-infarction area) を triphenyltetrazolium chloride (TTC) で染色すること

により、梗塞サイズ (infarction size ; IS) を計測した。実際には、虚血領域に対する梗塞サイズ比 (IS/AAR) を心筋梗塞サイズの指標として算出した。

7. 心筋組織内 Akt 活性化の解析

AE1-329 あるいは vehicle 投与30 分後、LAD を30 分間閉塞し、15 分間再灌流を行った後心臓を摘出した。心臓組織サンプルを lysis buffer 中でホモジナイズし、タンパク濃度を調整した後、Western blot 解析を行った。抗 phospho-Akt 抗体および抗 Akt 抗体を用いて、心筋組織内のリン酸化 Akt および総 Akt 量を定量し、総 Akt 量に対するリン酸化 Akt 量比を Akt 活性化の指標として算出した。

成 績

1. IPC 処置にともなう心臓内 COX-2 mRNA の発現

WT マウスの IPC 群において、IPC 処置から6 時間後、COX-2 mRNA の発現が著明に増加した。

2. IPC 処置にともなう心臓内 PGE₂ の産生増加

心臓組織内 PGE₂ は、IPC 処置から24 時間後で WT マウス、EP₄^{-/-} マウスともに有意な増加を認めたが、両マウス群間での差は見られなかった。

3. IPC 処置の心保護効果

WT マウスにおいて、心筋梗塞サイズ (IS/AAR) は、sham 群と比較し IPC 群で有意に低下した (各々 48.7±3.6%, 27.2±4.1%, n = 4-5, p<0.01)。しかし、EP₄^{-/-} マウスでは sham 群とIPC 群で有意差を認めなかった。

4. EP₄ 受容体アゴニストの心保護効果

まず、AE1-329 の末梢血圧に影響しない最大投与量 (0.03mg/kg) を確認した。WT マウスにおいて、コントロール群と比較して AE1-329 投与群で梗塞サイズ (IS/AAR) が有意に低下した (各々 55.8±5.0%, 33.4±5.3%, n = 6, p<0.01)。また、AE1-329 は心機能低下 (ΔLVEF) も有意に抑制した。

5. EP₄ 受容体アゴニストの Akt 活性化作用

WT マウスの心臓において、虚血-再灌流にともなう Akt 活性化は、AE1-329 投与群において有意に増強した (p<0.01)。なお、虚血-再灌流処置をしない WT マウスの心臓では、AE1-329 の Akt 活性化作用は認めなかった。一方、EP₄^{-/-} マウスの心臓では、AE1-329 の Akt 活性化増強作用は認めなかった。

考 案

我々が用いたマウス IPC モデルにおいて 24 時間以降に明らかな心保護効果が認められ、本モデルが優れたマウス IPC 実験モデルであることを確認した。本モデルを用いた検討で、① IPC 処置後、心臓内 COX-2 発現誘導とそれに伴う PGE₂ の産生増加が認められたこと。② EP₄^{-/-} マウスの心臓において後期 IPC が消失したことから、後期 IPC の成立において PGE₂/EP₄ 系が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

後期 IPC では、可逆的虚血負荷から 24-72 時間後に心保護に働くメディエーターが誘導されることにより強力な心保護効果が発現されると考えられている。本研究は、可逆的虚血負荷後 24 時間で内因性 PGE₂ 産生が亢進していることが、後期 IPC の発現にとって重要であることを示した。実際、後期 IPC における PG 環境を模した、虚血-再灌流前の EP₄ 受容体アゴニスト投与は、心筋梗塞巣の縮小効果や心機能改善効果を示した。

PI3-K/Akt 系は、GSK-3 の活性化などを介して抗アポトーシス効果をもたらすことから、IPC 発現において重要な役割を果たすシグナル系として知られている（引用文献 3）。今回、EP₄ 受容体刺激により心筋虚血-再灌流にともなう Akt の活性化が亢進することを明らかにすることができ、これが後期 IPC における PGE₂/EP₄ 系の作用発現のメカニズムの一つと考えられた。

結 論

心筋の可逆的虚血負荷によって惹起される心保護作用、いわゆる IPC 現象が PGE₂/EP₄ 系を介して調節されていること、およびその細胞内機序として、心臓での抗アポトーシス機構に参与する Akt の活性化を増強する作用を明らかにした。

引 用 文 献

- 1) Shinmura K, Tang XL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 29 2000;97(18):10197-10202.
- 2) Xiao CY, Yuhki K, Hara A, et al. Prostaglandin E2 protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation*. May 25 2004;109(20):2462-2468.
- 3) Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res*. May 1 2006;70(2):240-253.

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	菅野 貴康
<u>審査委員長 谷口 隆信</u> <u>審査委員 長谷部 直幸</u> <u>審査委員 牛首 文隆</u>			
学位論文題目			
Prostaglandin E ₂ mediates the late phase of ischemic preconditioning in the heart via its receptor subtype EP ₄ (プロスタグランジン E ₂ は EP ₄ 受容体を介して心臓における後期虚血プレコンディショニングを仲介している)			
<p>虚血プレコンディショニングとは、心筋に予め短時間の虚血負荷を加えておくことにより、その後の心筋梗塞に伴う心筋障害が著明に軽減される現象であり、虚血直後に現れる早発性と24時間後から認められる遅発性の2種類が知られている。本論文はマウスの心筋虚血再還流モデルにおいて、遅発性虚血プレコンディショニングの分子機構の解明に取り組んだものである。申請者らはノックアウトマウスや受容体特異的な作動薬を用い、プロスタグランジン E₂がその受容体の一つである EP₄を介して心筋の遅発性虚血プレコンディショニング応答を仲介していることを証明した。EP₄特異的作動薬は遅発性プレコンディショニングの最終段階を速やかに誘導できることから、この成果は虚血性心筋障害に対する新しい治療法の開発に道を拓くものであると考えられる。更に、小さなマウスの心臓で虚血モデルを作製して再現性のある結果を得るには、申請者のたゆまぬ精進があったものと審査委員会は評価している。査問においても、申請者は本論文の臨床的背景となる循環器内科学や当該研究分野に関して確かな知識／経験／見識を具有していることが確認され、論文審査の結果と合わせて、合格と判定した。</p>			