

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	栗山 周子
学位論文題目			
Prostaglandin E₂ inhibits platelet activation <i>via</i> its receptor subtypes EP₂ and EP₄			
(プロスタグランジン E ₂ はその受容体 EP ₂ と EP ₄ を介して血小板活性化を抑制する)			
共著者名			
結城 幸一、山田 武宏、藤野 貴行、原 明義、 岡田 優二、高山 浩二、荻部 英寿、高畑 治、 吉田 晃敏、成宮 周、牛首 文隆			
掲載学会雑誌名			
未発表			
研究目的			
<p>血小板は、血液凝固系とともに、生理的な止血機構にとって必須の構成要素となっている。また、血小板は、病態生理的には血栓症や動脈硬化症などの病態形成に重要な役割を果たす。一方、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成るプロスタノイドは、血小板活性化の制御に中心的な役割を果たす。なかでも、TXA₂ が強力な血小板活性化作用を有し、PGI₂ がその抑制作用を示すことが知られている (引用文献 1)。</p> <p>PGE₂ は、その受容体である EP を介して作用を発揮するが、EP には EP₁、EP₂、EP₃、EP₄ の 4 種類のサブタイプが存在する (引用文献 2)。従来 PGE₂ は、血小板刺激物質による血小板凝集反応において、低濃度でその反応を亢進し、高濃度ではそれを抑制する二相性の作用を示すことが知られている。最近我々は、低濃度の PGE₂ の血小板凝集促進作用は EP₃ を介した作用であることを明らかにした (引用文献 3)。しかし、PGE₂ の示す血小板凝集抑制作用の機構については不明である。</p> <p>本研究は、プロスタノイド受容体欠損マウスと新規 EP アゴニストを用い、PGE₂ の示す血小板凝集抑制作用の機構解明を目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 使用動物

動物は、雄性 8~12 週齢の野生型、EP₂、EP₃、EP₄、PGI₂ 受容体 IP あるいは EP₃ と IP の両者を欠損するマウス (各々 WT、EP₂^{-/-}、EP₃^{-/-}、EP₄^{-/-}、IP^{-/-}、EP₃^{-/-}/IP^{-/-} マウス) を用いた。これらのマウスの遺伝背景は、C57BL/6 マウスのもと同様である。しかし、EP₄^{-/-} マウスの遺伝背景は 129 sv/ola と C57BL/6 の F2 と同等であるため、EP₄^{-/-} マウスの対照としてはこれと同様の遺伝的背景を持つ F2-WT マウスを用いた。

2. 競合的 RT-PCR を用いた血小板での各 EP サブタイプの発現解析

麻酔した WT マウスの心臓から採取した血液を、700 rpm で 5 分間遠心した。ついで、上清を 3,000 rpm で 10 分間遠心した後、血小板の沈澱をリン酸緩衝生理食塩液に浮遊させ洗浄血小板液とした。再度洗浄血小板を遠心し、沈澱した血小板から Isogen を用いて total RNA を調整した。ついで、total RNA (1 µg) を oligo dT プライマーおよび SuperScript II を用いて逆転写し、cDNA を作製した。この cDNA を各 EP サブタイプに対応するプライマーを用いて PCR 法で増幅し、各 EP サブタイプ mRNA の発現を解析した。また、各 mRNA の定量には、PCR の際に各 EP サブタイプの cDNA に競合する competitor を同時に増幅させる競合的 RT-PCR 法を用いた。

3. 血小板凝集反応の解析

心臓採血した血液を 700 rpm で 5 分間遠心し、その上清を多血小板血漿 (PRP) とした。また、PRP 採取後の血液をさらに 3,000 rpm で 10 分間遠心し、その上清を乏血小板血漿 (PPP) とした。ついで、PRP 中の血小板数を血球計算板で計測し、血小板数が $3.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ となるように調整した。血小板凝集反応は、PRP に様々な薬物を添加し、光透過法型血小板凝集計を用いて観察した。この際、未刺激の PRP の光透過度を凝集率 0%、PPP の光透過度を凝集率 100% に設定した。薬物の凝集抑制の程度は、45-55% の凝集率を示す濃度の U-46619 (TXA₂ 受容体である TP のアゴニスト) の凝集に対する抑制率で判定した。被検薬物は、U-46619 投与の 1 分前に添加した。薬物は、EP のナチュラルリガンドとして PGE₂、EP₂ アゴニストとして AE-259 および EP₄ アゴニストとして AE-329 を用いた。

成 績

1. 血小板における各 EP サブタイプ mRNA の発現量

WT マウスの血小板では、TP および IP mRNA の豊富な発現を認めた。また、EP サブタイプ mRNA のうち、EP₂、EP₃、EP₄ mRNA が発現していた。これらの発現量は、各々 <0.01 、 52.5 ± 22.0 、 0.83 ± 0.07 copies/ng of total RNA であり、EP mRNA の中では EP₃ mRNA の発現が最も高かった。一方、EP₁ mRNA の発現は確認できなかった。

2. PGE₂ の U-46619 凝集抑制作用

WT マウスの血小板において、U-46619 は濃度依存的にその凝集を惹起した (U-46619 凝集)。また、U-46619 凝集は、WT マウスと各 PG 受容体欠損マウスの間で有意な差を認めなかった。

PGE₂ は、WT、F2-WT、EP₂^{-/-}、EP₄^{-/-} マウスの血小板での U-46619 凝集を濃度依存的に抑制した。しかし、これらの血小板の間で、PGE₂ の U-46619 凝集抑制作用の強さに有意な差を認めなかった。また、その IC₅₀ 値は 10 μM 以上であり、本来の PGE₂ の作用濃度と比較して高かった。一方、IP^{-/-} マウスの血小板では、高濃度側で PGE₂ の U-46619 凝集抑制作用の低下が認められた。この結果、PGE₂ の一部は、特に高濃度領域で IP に作用していると考えられた。さらに、EP₃^{-/-}/IP^{-/-} マウスの血小板では、PGE₂ の U-46619 凝集抑制作用の IC₅₀ 値が 100 nM と低下し、その凝集抑制作用が著明に増強していた。この結果、PGE₂ の EP₃ を介した凝集亢進作用が、PGE₂ の EP₂、EP₄ を介する凝集抑制作用を凌駕していたと考えられた。

3. EP₂、EP₄ アゴニストの U-46619 凝集抑制作用

EP₂、EP₄ アゴニスト (AE-259、AE-329) は、いずれも WT マウス血小板において U-46619 凝集を濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ 値は各々 300、100 nM であった。また、これらのアゴニストの U-46619 凝集抑制作用の IC₅₀ 値は、各々 EP₂^{-/-}、EP₄^{-/-} マウスで WT マウスの IC₅₀ 値に比較して著明に増加していた。一方、それらの IC₅₀ 値は、EP₃^{-/-}/IP^{-/-} マウスで、WT マウスの IC₅₀ 値より軽度低下していた。これらの結果、AE-259、AE-329 の EP₃ や IP への作用は PGE₂ より弱く、これらのアゴニストの各々 EP₂、EP₄ への特異性は高いと考えられた。





考 案 ・ 結 論

PGE₂ の血小板に対する作用では、その低濃度での EP₃ を介する血小板凝集促進作用や、高濃度での IP を介する血小板凝集抑制作用が前面に現れ、PGE₂ の EP₂ や EP₄ を介する血小板凝集抑制作用が隠されていた。しかし、EP₃^{-/-}/IP^{-/-} マウスの血小板において、この PGE₂ の EP₂ や EP₄ を介する作用が明らかとなった。また、EP₂、EP₄ アゴニストを用いた実験結果より、EP₂ あるいは EP₄ を刺激することによって血小板凝集が抑制されることが示された。また、新規薬物である AE-259 および AE-329 は、各々 EP₂ と EP₄ への特異性が高いことが示された。したがって、これらの薬物には血小板活性化をコントロールする薬物としての臨床応用が期待される。一方、血小板における PGE₂ の EP₂ や EP₄ を介した活性化抑制作用の生理的意義については、今後の検討が必要と考えられた。

引 用 文 献

1. Coleman, R.A., Kennedy, I., Humphry, P.P.A., *et al.* Prostanoids and their receptors. In: Emmett, J.C. (Ed.), *Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol.3: Membranes and receptors*. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 643-714, 1990.
2. Narumiya, S., Sugimoto, Y. & Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* **79**: 1193-226, 1999.
3. Ma, H., Hara, A., Xiao, C.-Y., *et al.* Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃. *Circulation*. **104**: 1176-1180, 2001.

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	栗山 周子
<p>審査委員長 谷口 隆信 </p> <hr style="width: 80%; margin: 5px auto;"/> <p>審査委員 吉田 晃敏 </p> <hr style="width: 80%; margin: 5px auto;"/> <p>審査委員 高井 章 </p> <hr style="width: 80%; margin: 5px auto;"/> <p>審査委員 牛首 文隆 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Prostaglandin E₂ inhibits platelet activation via its receptor subtypes EP₂ and EP₄. (プロスタグランジンE₂はその受容体EP₂とEP₄を介して血小板活性化を抑制する)</p> <p>共著者名 結城 幸一、山田 武宏、藤野 貴行、原 明義、岡田 優二、高山 浩二、苅部 英寿、高畑 治、吉田 晃敏、成宮 周、牛首 文隆</p> <p>掲載学会雑誌名 未発表</p>			

血小板は血液凝固系と共に止血機構の要であり、血栓症や動脈硬化症などの病態形成においても重要な因子である。血小板の機能調節においてはプロスタノイドが非常に重要であり、特に活性化因子としてのトロンボキサンA₂及び抑制因子としてPGI₂はそれぞれ血小板自身及び血管内皮から放出されて血小板の活性化を微妙に調節しながら血管内の恒常性を維持している。

著者らはマウスの血小板において5種類全てのプロスタノイドに対応する8種類の受容体について、RT-PCRを行ってその発現量を検討したところ主要な受容体であると考えられるTPとIPの他にもEPが発現していることを明らかにした。EPには4種類のサブタイプが存在するが、このうちマウスの血小板で発現されているのはEP₂、EP₃、EP₄の3種類で、このうちEP₃が最も多くTPやIPに匹敵する量であったが、次いでEP₄、EP₂の順でEP₂は極微量であった。EP₃については血小板内のCa²⁺濃度を上昇させて凝集反応の亢進作用を示すことが既に知られており、著者らはEP₂、EP₄について検討を行った。

PGE₂はEP₃を介して血小板凝集の亢進を、さらに高濃度ではIPを介して凝集の抑制を引き起こすため、EP₃とIPを同時に欠失したダブルノックアウトマウスの血小板を実験に使用した。U46619による血小板凝集に対してPGE₂は抑制作用を示し、IC₅₀値は100 nMでありこの抑制作用はEP₂、EP₄を介していると考えられた。次いで、EP₂、EP₄に特異性の高いアゴニストを用いて、検討を行ったところ、EP₂アゴニストAE259はIC₅₀値300 nMで、EP₄アゴニストAE329はIC₅₀値100 nMで血小板凝集を抑制した。これらのアゴニストによる凝集抑制は野生型マウスの血小板でも若干IC₅₀値は上昇したものの、同じように認められ、これらのアゴニストの選択性は高いと考えられた。

これらの結果から、生理的な状態でのPGE₂の血小板に対する作用は、低濃度においてはEP₃を介した凝集促進的なものが、高濃度ではIPを介した凝集抑制的なものが全面に現れ、EP₂やEP₄を介する凝集抑制作用はマスクされていると考えられた。しかしながら、この論文で使用されたEP₂及びEP₄特異的なアゴニストは野生型マウスの血小板においても凝集抑制作用を示し、薬剤としての可能性が示された。また通常は隠れているEP₂やEP₄の血小板抑制機能が病的な状態においてどのような意義を持つのか、病態との関連性について今後の解明が期待される。

以上この論文で述べられている実験結果並びに考察は、血小板におけるPGE₂の作用機構について新しい側面を切り開くものです。

申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文/諮問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告申し上げます。