

# 学位論文の要旨

|       |    |    |       |
|-------|----|----|-------|
| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 高山 浩二 |
|-------|----|----|-------|

## 学位論文題目

### **Thromboxane A<sub>2</sub> and Prostaglandin F<sub>2</sub>α Mediate Inflammatory Tachycardia**

(トロンボキサンA<sub>2</sub> とプロスタグランジンF<sub>2</sub>α は炎症時の頻脈を仲介する)

#### 共著者名

結城 幸一、藤野 貴行、原 明義、山田 武宏、  
栗山 周子、苅部 秀寿、岡田 優二、谷口 隆信、  
高畑 治、岩崎 寛、成宮 周、牛首 文隆

#### 掲載学会雑誌名

未発表

## 研究目的

頻脈は、発熱および頻呼吸とともに全身性炎症の存在を示す主要兆候に挙げられている。心拍数は、主に自律神経系により調節されており、これには洞房結節の直接的な神経支配と副腎髄質からのカテコラミン分泌を介した間接経路が知られている。一方、プロスタノイドの産生を阻害する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が、発熱とともに頻脈を抑制することが知られていた。この結果、全身性炎症時に認められる頻脈は、発熱に伴う交感神経系の興奮に起因すると考えられてきた。しかし、全身性炎症時の頻脈の発生機構の詳細は不明のまま残されている。

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) D<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α、PGI<sub>2</sub> およびトロンボキサン (TX) A<sub>2</sub> から成り、これらは各々 DP、EP、FP、IP、TP 受容体に結合し、その作用を発揮する。また、EP には、EP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>、EP<sub>4</sub> の4種類のサブタイプ受容体が存在する (引用文献1)。従来、プロスタノイドには、急性期反応である発熱や視床下部-下垂体-副腎皮質軸の活性化での役割が知られており、プロスタノイドの全身性炎症にともなう頻脈での役割が予想された。しかし、プロスタノイドの心拍に関する作用としては、僅かに PGE<sub>2</sub> の陽性変時作用が報告されているのみであり、その炎症時の頻脈における役割は不明である。そこで、本研究は、プロスタノイド受容体欠損マウスを用い、全身性炎症時の頻脈におけるプロスタノイドの役割を解明することを目的とした。

## 材 料 ・ 方 法

実験は、まずマウス摘出右心房の拍動数に対する外因性プロスタノイドの作用を解析し、その作用部位を洞房結節の存在部位との関連から検討した。ついで、炎症性サイトカインを刺激として用い、摘出右心房の拍動数に対する内因性プロスタノイドの作用を解析した。最後に、リポポリサッカライド (LPS) 投与による全身性炎症モデルを用い、頰脈におけるプロスタノイドの役割を解析した。

### 1. 使用動物

動物は、雌性の野生型マウスおよび各プロスタノイド受容体欠損マウス (8~12 週齢) を用いた。これらのマウスの遺伝背景は、C57BL6 のものと同様である。ただし、EP<sub>4</sub> 欠損マウスの対照としては、これと同様の遺伝背景 (C57BL6/129SV) を持つ F2-野生型マウスを用いた。また、一部の解析では、TP と FP の両者を欠損するマウスを作出し、解析に用いた。

### 2. 摘出右心房標本および拍動数の測定

各マウスを麻酔した後、右心房を摘出した。この標本を、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 通気下、36°C の Krebs-Henseleit 緩衝液中に懸垂し、その拍動数を記録した。自律神経系の変時作用の検討時には、エピネフリンとアセチルコリンを累積投与した。プロスタノイドの作用を解析する時には、自律神経系及び内因性プロスタノイドの影響を除くため、緩衝液中にフェノキシベンザミン、プロプラノロール、アトロピン (各 1 μM) およびインドメタシン (5 μM) を加えた。PGF<sub>2</sub>α、I-BOP (TP アゴニスト)、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub> および PGI<sub>2</sub> は、各々累積投与した。

### 3. プロスタノイドの作用部位の解析

野生型マウスの右心房を緩衝液中で結節領域、移行領域および心耳領域の 3 領域に分割し、各領域から電極針を介して活動電位を記録し拍動数を測定した。フェノキシベンザミン、プロプラノロール、アトロピン (各 1 μM) およびインドメタシン (5 μM) 存在下で、PGF<sub>2</sub>α (10 nM) および I-BOP (1 nM) を、またそれら阻害薬の非存在下でエピネフリン (1 μM) を投与した。

### 4. サイトカインの摘出右心房の拍動数に与える効果の解析

サイトカイン刺激として、インターロイキン (IL) -1β (20 ng/ml)、腫瘍壊死因子 (TNF) -α (20 ng/ml) およびインターフェロン (IFN) -γ (10 ng/ml) の組合せを、緩衝液中に投与した。サイトカイン投与後、摘出右心房の拍動数を経時的に記録した。

### 5. *In vivo* 全身性炎症モデルを用いた解析

Tail-cuff 法を用い、まず安静時の心拍数と血圧を測定した。ついで、LPS (10 mg/kg) を腹腔内投与し、心拍数と血圧を経時的に記録した。プロプラノロール (1 mg/kg) とインドメタシン (10 mg/kg) の効果を検討する場合は、LPS 投与 30 分前にそれらを腹腔内投与した。

## 成 績

### 1. 摘出右心房の拍動数に対する外因性プロスタノイドの作用

PGF<sub>2</sub>α は、濃度依存的に右心房の拍動数を増加させた。この陽性変時作用は FP 欠損マウスの右心房では認められなかった。また、I-BOP は、濃度依存的に右心房の拍動数を二相性に増加させた。その作用の一次相は TP 欠損マウスの右心房で、二次相は FP 欠損マウスの右心房で消失したことから、I-BOP の陽性変時作用は、低濃度で TP を、高濃度では FP を介することが示唆された。一方、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub> および PGI<sub>2</sub> にも陽性変時作用が認められたが、これらはすべて FP 欠損マウスの右心房でのみ消失し、これらの PG の作用は FP を介するものと考えられた。エピネフリンおよびアセチルコリンは、野生型マウスの右心房において、各々陽性および陰性変時作用を示した。また、これらの作用は、各プロスタノイド受容体欠損マウスの右心房でも同様に認められたことから、プロスタノイドの示す陽性変時作用は自律神経の作用とは独立したものと考えられた。これらの結果、PGF<sub>2</sub>α と TXA<sub>2</sub> が生体内で陽性変時作用を示すプロスタノイドであることが示唆された。

### 2. プロスタノイドの右心房内での作用部位

プロスタノイドの作用部位を明らかにするために、野生型マウスの右心房を結節領域、移行領域および心耳領域の 3 領域に分割し、各々を PGF<sub>2</sub>α、I-BOP および エピネフリンで刺激した。結節領域および移行領域は自動能を持ち拍動した。また、結節領域が移行領域より有意に高い拍動数を示したことから、結節領域に洞房結節が存在することが確認された。一方、心耳領域には自動能を認めなかった。PGF<sub>2</sub>α、I-BOP および エピネフリンは、結節領域において、右心房自体での作用と同等の陽性変時作用を示した。しかし、移行領域において、I-BOP と エピネフリンは陽性変時作用を示したが、PGF<sub>2</sub>α は有意な作用を示さなかった。これらの結果、生体において PGF<sub>2</sub>α と TXA<sub>2</sub> は洞房結節を含む領域で作用することが示された。また、洞房結節支配の途絶時に自動能を発揮する移行細胞が存在する移行領域での PGF<sub>2</sub>α と TXA<sub>2</sub> の作用の差から、結節領域と移行領域における FP と TP の発現分布の差異が示唆された。

### 3. サイトカインの摘出右心房に対する陽性変時作用での内因性 TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α の役割

炎症性サイトカインは、種々の組織において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を刺激し、その部位でのプロスタノイド産生を亢進させる。そこで、炎症性サイトカインで摘出右心房を刺激し、内因性プロスタノイド産生を介した心房拍動数に対する作用を解析した。野生型マウスの右心房において、炎症性サイトカインは、初期相と持続相から成る二相性の陽性変時作用を示した。しかし、その作用の初期相は TP 欠損マウスの右心房で、持続相は FP 欠損マウスの右心房で消失したことから、炎症性サイトカインの陽性変時作用の初期相は TXA<sub>2</sub> を、持続相は PGF<sub>2</sub>α を介することが示唆された。また、炎症性サイトカインの陽性変時作用はインドメタシンで完全に抑制されたことから、この作用は内因性プロスタノイドによることが裏付けされた。

### 4. *In vivo* 全身性炎症モデルにおける TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α の役割

LPS 全身性炎症モデルでは、LPS 刺激によって産生される炎症性サイトカインを主体とした免疫系シグナルが、全身性の炎症状態を引き起こす。野生型マウスにおいて、LPS は初期相と持続相から成る二相性の頻脈を惹起し、この間血圧の変化を認めなかった。しかし、この頻脈の初期相は TP 欠損マウスで減弱し、持続相は FP 欠損マウスで消失したことから、この頻脈の初期相は TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α を、持続相は PGF<sub>2</sub>α を介することが示唆された。また、TP と FP の両者を欠損するマウスでは、LPS による頻脈は完全に消失し、全身性炎症時の頻脈における PGF<sub>2</sub>α と TXA<sub>2</sub> の役割が確認された。さらに、プロプラノロールは野生型マウスの心拍数を有意に低下させたが、LPS による頻脈のパターン自体には影響を与えなかった。

## 考 案

本研究は、まず TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α が各々固有の受容体である TP と FP を介した摘出右心房での陽性変時作用を示すことを明らかにした。また、その作用部位として洞房結節を含む領域が示唆された。しかし、TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α が洞房結節細胞自身に直接作用するのか、あるいは近傍細胞に働いて間接的に作用するのかは、今後の検討が必要である。サイトカイン刺激により、野生型マウスの右心房の拍動数が二相性に増加したが、TP と FP 欠損マウスの右心房では各々初期相と持続相が抑制された。また、インドメタシンでサイトカインの陽性変時作用が完全に抑制された。この結果は、右心房で産生された内因性 TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α がその拍動数を増加させることを示すと考えられた。In vivo 全身性炎症モデルの検討では、LPS 投与により野生型マウスで二相性頻脈が観察された。この頻脈は、TP と FP 欠損マウスで減弱し、TP および FP の二重欠損マウスで完全に消失した。この結果、TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α が in vivo の全身性炎症状態において右心房で産生され、頻脈を惹起することが示された。また、プロプラノロールは LPS による頻脈パターンに影響しないことから、全身性炎症時の頻脈はプロスタノイドの独立した作用であり、交感神経系は少なくとも今回の実験条件下では頻脈に関与しないと考えられた。したがって、従来知られていた NSAIDs の頻脈抑制作用は、それらが直接右心房での TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α の産生を抑制する結果であることが示唆された。





## 結 論

TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α は、全身性炎症時にサイトカインを主体とした免疫系シグナルを介して洞房結節周辺で産生され、頻脈を惹起する。最近、PGE<sub>2</sub> が視索前野に存在する EP<sub>3</sub> を介して発熱を惹起し(引用文献 2)、中枢神経系の EP<sub>1</sub> と EP<sub>3</sub> を介して視床下部-下垂体-副腎皮質軸を活性化すること(引用文献 3)が報告された。これらの結果と本研究で解明された TXA<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub>α の役割を併せ、プロスタノイドは全身性炎症時における急性期反応を制御することにより、生体の防御機構において重要な役割を果たすと考えられる。

## 引 用 文 献

1. Narumiya, S., Sugimoto, Y. and Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties and functions. *Physiol. Rev.* **79**, 1193-1226, 1999.
2. Ushikubi, F. *et al.* Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub>. *Nature* **395**, 281-284, 1998.
3. Matsuoka, Y. *et al.* Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4132-4137, 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    | 高山 浩二  |
|  |        | 審査委員長 | 高井 章      |
|  |        | 審査委員  | 菊池 健次郎 印  |
|  |        | 審査委員  | 岩崎 寛      |
|  |        | 審査委員  | 牛首 文隆     |
| 学位論文題目   |        |       |  |
| <b>Thromboxane A<sub>2</sub> and prostaglandin F<sub>2α</sub> mediate inflammatory tachycardia</b>   |        |       |  |
| 「トロンボキサン A <sub>2</sub> とプロスタグランジン F <sub>2α</sub> は炎症時の頻脈を仲介する」   |        |       |  |
| <p>本研究は、各種プロスタノイド受容体の欠損したマウスを用い、炎症性頻脈の発生におけるプロスタノイド、特にトロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) とプロスタグランジン F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) の関与を検討したものである。</p> <p>著者らはまず野生型マウスから摘出した心房標本において、β アドレナリン受容体阻害剤の存在下で、TXA<sub>2</sub> 受容体(TP)または PGF<sub>2α</sub> 受容体(FP)の特異的アゴニストによる刺激をおこなうと拍動頻度が上昇することを観察した。</p> <p>ついで、同様の摘出心房標本を用いた実験系において、いくつかの炎症性サイトカイン (IL-1β, TNF-α および INF-γ) 投与の効果を見たところ、野生種では初期相と持続相とからなる二相性の応答が見られたが、TP 欠損マウスの標本では初期相が、FP 欠損マウスでは持続相が消失することを示した。</p> |        |       |  |
| (以下次ページ)   |        |       |  |

さらに、著者らは、in vivo 全身性炎症の状態を想定し、生きたマウスにリポポリサッカライド(LPS)の腹腔内投与の効果調べている。その結果、まず、LPS 投与が、正常マウスでは、初期相と持続相とからなる二相性の頻脈応答を惹起することを観察した。LSP の効果を TP 欠損マウスおよび FP 欠損マウスで同様に調べると、二相のうち、それぞれ初期相と持続相が消失していることを示した。

これらの結果は、炎症性サイトカインによる刺激により局所で産生される TXA<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> が、それぞれに特異的な膜受容体と、それらに接続するおそらく別系統の信号伝達系を介して、炎症性頻脈の発生に重要な役割を演ずることを強く示唆するものとして非常に興味深い。

論文提出者は、4名の審査員による個別の口頭試問においても、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、当人がこの領域に置いて十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。