

6) 脳虚血傷害におけるプロスタグランジン E₂-EP₄ シグナル系の役割解明と治療への応用

研究代表者 小島 史章

背景と目的

脳卒中は、悪性新生物、心疾患に次いで死亡原因となる疾患である。また、本疾患は要介護状態となる原因疾患の第1位であり、その後遺症による医療費の増加も大きな社会問題となっている。現在、脳梗塞急性期の治療薬として国際的に有効性が認められているものに血栓溶解薬があるが、その恩恵を受けることのできる患者は全体の5%に満たない。そのため、脳梗塞の病態形成機構の解明や有効な新しい治療法の開発は急務といえる。近年、これまでとは異なるアプローチとして、炎症制御の観点からの脳梗塞治療が期待されている。

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、標的細胞に存在する4種類の特異的受容体 (EP₁、EP₂、EP₃、EP₄) を介し、多彩な作用を発揮する生理活性脂質である¹⁾。脳虚血状態において、虚血周辺部位での PGE₂ の過剰産生が認められており²⁾、脳梗塞を含む脳血栓症の病態形成における PGE₂ の役割が注目されている。実際、PGE₂ の産生に関わる酵素である COX-2³⁾ やその下流で PGE₂ の産生に特異的に働く末端酵素である膜型 PGES-1⁴⁾ を欠損するマウスでは、中大脳動脈閉塞モデルでの脳梗塞サイズが、対照群に比べ減少することが報告されている。

一方、各 EP 欠損マウスを用いた検討では、PGE₂ は EP₁⁵⁾ および EP₃⁶⁾ を介して脳傷害的な作用を発揮するのに対して、EP₂⁷⁾ を介して脳保護的な作用を示すという相反する作用が報告されている。これは、脳虚血時に産生された PGE₂ が、その受容体亜型のいずれと結合するかにより、傷害の増強および軽減の両方の作用を発揮する可能性を示唆する。しかし、脳に高発現する EP₄ の脳血栓症病態形成における役割については、これまで詳細な検討がされていない。そこで本研究は、EP₄ を欠損させたマウスを用いて、脳梗塞の病態形成における PGE₂-EP₄ 系の役割を解明することを目的とした。

方法

6 ~ 12 週齢の雄性野生型マウスおよび EP₄ 欠損マウスを用いて、脳虚血の病態を反映する脳血栓症モデ

ルを対象とした解析を行った。先端部 4 mm に太さ 0.2 mm となるようにシリコンコーティングを施した、長さ 1.5 cm の 8-0 縫合糸モノフィラメントを作製した。次いで、麻酔下でマウスの左外径動脈を結紮したのち、左内頸動脈を経由して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。虚血は、レーザードップラー血流計を用いて確認した。脳虚血障害の程度は、神経症状の観察（運動機能障害の程度：Neurological deficit score を 5 段階に評価）、中大脳動脈支配領域とその辺縁領域の血流量の測定、梗塞サイズの測定（1 mm 厚に脳をスライスし Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) によって染色）によって評価した。なお、解析は、虚血 24 時間後の開頭時にフィラメントが中大脳動脈を閉塞していることが実体顕微鏡下で確認できた個体について行った。また、現在もっとも可能性の高い抗炎症の脳細胞標的と考えられるミクログリアの初代純培養系を用いて、炎症性虚血関連因子の発現に及ぼす特異的 EP₄ アゴニストおよびアンタゴニストの効果を実タイム RT-PCR 法により解析した。

結果と考察

虚血直後の中大脳動脈支配領域とその辺縁領域の血流量はともに 野生型マウスと EP₄ 欠損マウスで同等に低下していた。また、虚血 24 時間後の中大脳動脈支配領域とその辺縁領域の血流量についても、野生型と EP₄ 欠損マウスで同等に低下しており、両群間に差異を認めなかった。虚血 24 時間後に摘出した脳をスライスして TTC 染色を施行したところ、EP₄ 欠損マウスの大脳全球のサイズに対する脳梗塞領域の割合 ($20.5 \pm 1.3\%$, $n=24$) は、野生型マウス ($20.2 \pm 0.9\%$, $n=28$) と同程度であった。さらに、虚血 24 時間後における Neurological deficit score についても、EP₄ 欠損マウス (1.6 ± 0.2 , $n=25$) と野生型マウス (2.0 ± 0.2 , $n=29$) の両群間に有意な差を認めなかった。

一方、我々はミクログリアの初代純培養系を用いて、炎症性虚血関連因子のひとつである血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現に及ぼす EP₄ アゴニストおよびアンタゴニストの効果について検討をおこなったところ、野生型マウス由来のミクログリアにおける VEGF の mRNA 発現が、EP₄ アゴニスト (ONO-AE1-329: 10^{-10} - 10^{-6} M) による 3 時間の刺激で、その用量に依存して増強されることを見出した。この作用は、EP₄

欠損細胞ならびに EP₄ アンタゴニスト (ONO-AE3-208: 10^{-6} M) の共存下で培養した野生型細胞では認められなかったことから、EP₄ を介した反応であると考えられる。本研究によって、脳内 PGE₂ が、EP₄ を介してミクログリアにおける VEGF の発現を増強するように制御する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79: 1193-226, 1999
- 2) Nogawa S, Zhang F, Ross ME, et al. Cyclooxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci.* 17: 2746-55, 1997
- 3) Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, et al. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 1294-9, 2001
- 4) Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 11790-5, 2006
- 5) Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med.* 12: 225-9, 2006
- 6) Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, et al. Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J Neuroimmunol.* 184: 172-9, 2007
- 7) McCullough L, Wu L, Haughey N, et al. Neuroprotective function of the PGE₂ EP₂ receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci.* 24: 257-68, 2004