

Preconditioning の分子メカニズムに関する研究

所属機関 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所
研究者名 山田 尚

《研究の概要》

心臓は致死的心筋虚血前に短時間の虚血・再還流を行うとその後の虚血に対し耐性を獲得する事が知られている。この現象は Ischemic Preconditioning (虚血条件付け) と呼ばれ、虚血直後から観察される早期相と 24 時間以降に観察される遅延相の二相から成り立っている。また、この現象は側副循環や酸化抵抗性の誘導、虚血抵抗性タンパク質の合成などとは関係なく、心筋細胞自体に由来する現象であると考えられている。通常、心筋細胞の虚血に伴う死はネクローシス型であるが preconditioning による影響はアポトーシス型細胞死系への修飾が示唆されている。しかし、Ischemic Preconditioning が成立する詳細な機構については不明な点が多い。そこで、分子生物学的な基盤にのっとして Preconditioning が成立する機構の解明を試みた。我々が注目した点は大きく分けて以下の 4 点である。①薬理的 Preconditioning 誘導時における心筋細胞における遺伝子発現の変化。②広く細胞の生死を制御する機構の分子生物学的な解析。③低酸素下において重要な働きを担う転写因子 HIF-1 の機能と制御機構の解析。④遅延相における心筋保護作用が期待される、シクロオキシゲナーゼ-2 およびプロスタノイド系の解析である。

我々の研究は、*in vivo* における opioid receptor- δ agonist の投与で左室心筋細胞における heat shock protein や DNA 損傷時の情報伝達に関連する GADD45、さらにプロスタグランジン合成酵素や Ras 様遺伝子など、情報伝達系に関与した遺伝子の変動していることを明らかにした。これらの変化はアポトーシスの修飾にも結びつくことが示唆された。さらに我々は、p21Cip1/WAF1 や cyclin D1 が抗アポトーシスに作用している結果を得た。HIF-1 の誘導には低酸素状況以外に複数の因子によっても制御されていることが判明した。そして、誘導された HIF-1 は細胞の生存にポジティブに働いていることが判明した。DNA チップを用いた検討から、adrenomedullin が HIF-1 によって制御されている新たな標的遺伝子として登場した。さらに、mTOR が HIF-1 の合成に重要な役割を演じていることを明らかにした。プロスタグランジンの研究では、*in vivo* での遅延相 Ischemic Preconditioning 発現において EP3 受容体が必須であり、心筋細胞には EP1 受容体、EP3 受容体、EP4 受容体、IP 受容体が存在し、EP3 受容体刺激のみが、ミトコンドリア K_{ATP} チャネル開放を促すこと、酸化ストレス下に細胞保護効果を担っているのは主に EP3 受容体であることを明らかにした。さらに心筋細胞内 Ca^{2+} 動態への影響も各受容体により異なることが明らかにされた。また、構造的に発現している COX-2 は、 PGE_2 の生合成、MMP-2 の制御を介して組織の線維化に深く関与している可能性が示唆され、心臓における COX-2-プロスタノイド系は、細胞傷害的というよりむしろ細胞保護的な役割を持つことが明らかにされた。

以上の結果は、Ischemic Preconditioning を応用した治療への開発に結びつくものと考えている。

山田 尚	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 助教授	Pharmacological Precondition 機構の解析とアポトーシス制御機構の解析
山田順子	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 助教授	
新村 健	慶応大学医学部 老年内科診療副部長	

研究報告

I 研究目的

ある種の薬物の前投与は Ischemic preconditioning (IP) 現象を誘導することが知られている。これは Pharmacological preconditioning (PP) と呼ばれ臨床応用が可能なものとして期待されている。現在までに PP を誘導できる薬物としては adenosine 受容体 agonist ならびに opioid 受容体 agonist が知られている。そこで、IP 現象に関与する遺伝子の同定を目的として PP 条件下での遺伝子発現変化を検討した。また、IP に関連する細胞死はネクロシス型ではなくアポトーシス型が想定されている。そこで、アポトーシスの誘導およびその制御に関連する遺伝子の動態を様々なストレス下で検討し、細胞死にいたる過程を明らかにすることを目的とした。

II 研究計画および材料と方法

1 Pharmacological preconditioning の網羅的遺伝子解析

10 週齢の C57BL/6J 雄性マウス (25g) を 3 群にわけ、

- (1) BW373U86 (opioid μ -receptor agonist) 1mg/kg を皮下注射にて投与した。
- (2) 2-chloro-N⁶-cyclopenyl-adenosine (CCPA, adenosine A₁ receptor agonist) 100 \cdot g/kg を腹腔内投与した。
- (3) Vehicle (sterile water) 2ml/kg を腹腔内投与した。

これらの投与量は文献および我々の実験より PP の確認された量である。投与後 1 時間、6 時間の各時点で各群のマウスから pentobarbital 麻酔下にすばやく心臓を摘出して、氷冷生理食塩水内で洗浄後、左心室のみを分離し total-RNA を抽出した。また、一部については 24 時間での解析も行った。

遺伝子発現動態の解析は Affymetrix の oligo-DNA array を用いて行った。すなわち total-RNA より cDNA を作成して、Mouse U74A oligo-DNA array を用いて遺伝子の発現解析を行った。一部については Mouse U74B, Mouse U74C も用いて検討した。

2 造血器由来の細胞に、histone deacetylase inhibitor (HDACI) や cytokine (Interferon) さらに放射線などのストレスを負荷し、細胞死や分化への影響を検討した。アポトーシスは Hoechst33342 および Propidium Iodide の二重染色後、蛍光顕微鏡下でクロマチンの凝集および核の断片化を指標として測定した。また、Annexin V と PI を用い、Flow cytometry でも検討した。遺伝子発現は Reverse-transcription PCR および、Western blot 法で行った。

III 研究成果

1 コントロール群において発現が見られ、かつ、1群3匹を用いた2つの群でコントロールに対して共通に増加、もしくは減少していると判定された遺伝子を抽出した。BW373U86投与後1時間では39の遺伝子(20のESTと19の遺伝子)において発現が増加した。逆に、減少した遺伝子は56(22のESTと34の遺伝子)であった。このうち2倍以上に発現が増加、もしくは1/2以下に発現が低下した遺伝子(ESTは除外)は、表1のようであった。

6時間後においては17の遺伝子(7のESTと10の遺伝子)で発現が増加し、逆に減少した遺伝子は24(7のESTと17の遺伝子)であった。このうち2倍以上に発現が増加、もしくは1/2以下に発現が低下した遺伝子(ESTは除外)は、表2のようであった。

上記の条件下で、遺伝子変動が確認されたもののうちRad遺伝子のみがCCPA投与時の1時間において同様な減少が確認された。

表 1-1 時間での変動

Gene(Increased)	Accession#
Heat shock protein 70	M12571
MHC class I with Set repetitive	X00246
Skeltal alpha-actin gene	M12347
C57/Black6 BC1 scRNA	U01310
GADD45	U00937
Gene(Decreased)	Accession#
Myosin light chain, alkali, cardiac atria	M19436
H19 fetal liver mRNA	X58196
G protein signaling regulator RGS2 mRNA	U67187
Ras-like GTP-binding protein Rad mRNA	AF084466

表 2-6 時間での変動

Gene(Increased)	Accession#
Prostaglandin D synthetase	AB006361
Gene(Decreased)	Accession#
H19 fetal liver mRNA	X58196
Myosin light chain, alkali, cardiac atria	M19436

2 細胞にチロシンキナーゼ阻害薬、HDACI、放射線照射などによってストレスを負荷するとアポトーシスが誘導される。このアポトーシスはMEK/ERK系の活性化によって抑制されることが明らかとなった。さらに、恒常的MEK活性型、cyclin D1やc-Mycの過剰発現といった、分子生物学的に改変した細胞を用いると、チロシンキナーゼ阻害薬とHDACIによるアポトーシスが著名に抑制された。HDACIはp21Cip1/WAF1を誘導することが知られてい

るが我々はその局在を検討した。驚くことに、誘導された p21Cip1/WAF1 は核ではなく細胞質に存在していた。さらに、p21Cip1/WAF1 の働きを放射線照射下の実験で検討した。その結果、放射線で誘導される p21Cip1/WAF1 は Interferon 前処理で誘導が抑制され、同時にそのリン酸化も阻止されていることが判明した。このような Interferon 前処理細胞は放射線感受性が亢進しており、p21Cip1/WAF1 が細胞周期の抑制以外に細胞の生存をポジティブに制御している可能性が示唆された。

IV 考案

opioid receptor- δ agonist の投与によって心筋細胞はストレスに曝された状況に近い遺伝子動態を呈していることが推察された。結果に示した以外の遺伝子で 2 倍未満の軽度変化を示した遺伝子群では C/EBP や HIF-1 α などの転写因子や Bcl-2 遺伝子群の Mcl-1 などがあった。統合して考えるとこれらの変動の方向性は次に起こりえる強いストレスに対し、過剰反応を抑制して細胞の生存に向けたアドバンテージを準備しているようにも思える。これらの方向性を明らかにするために MAPK 系や PI3K/AKT 系についてさらに詳細に検討していく必要がある。

一般的な抗アポトーシス遺伝子として注目されている遺伝子以外で、同様な働きを担える遺伝子として p21Cip1/WAF1 が浮かび上がった。p21Cip1/WAF1 は c-Myc によってその発現が負に制御されていることを示したが、c-Myc が過剰発現している状況では直接的な DNA 損傷に対する抵抗性が弱いことが判明した。これらを基礎に p21Cip1/WAF1 の局在とリン酸化に注目して研究を行うと、ストレスの種類によっては p21Cip1/WAF1 の存在が細胞の生存と密接に結びつくことが判明した。現時点では p21Cip1/WAF1 と心筋細胞障害との関連は不明である。しかし、p21Cip1/WAF1 は心筋保護作用に向けて、期待の持てる標的遺伝子であるかもしれない。そこで我々は p21Cip1/WAF1 を様々に改変し、それらを用いた心筋細胞への遺伝子もしくはタンパク質治療に向け研究を開始している。

V 研究成果の発表

- 1 Junko Horiguchi-Yamada, Sachiko Fukumi, Shinobu Saito, Ritsuko Nakayama, Satsuki Iwase, and Hisashi Yamada. DNA topoisomerase II inhibitor, etoposide, induces p21^{WAF1/CIP1} through downregulation of c-Myc in K562 cells. *Anticancer Res*, 2002; 22: 3827-3832.
- 2 Satsuki Iwase, Nobutake Akiyama, Tetsuaki Sekikawa, Shinobu Saito, Yasuhiro Arakawa, Junko Horiguchi-Yamada, and Hisashi Yamada. *Both NUP98/TOP1 and TOP1/NUP98 Transcripts Are Detected in ad e novo AML With t(11;20) (p15;q11)*. *Genes Chromosomes and Cancer*. 38: 102-105. 2003.
- 3 Takeshi Kawano, Junko Horiguchi-Yamada, Satsuki Iwase, Yusuke Furukawa, Yasuhiko Kano, and Hisashi Yamada. Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and STI571 while activation of MEK1 interferes with it. *Mol Cell Biochem*. 258: 25-33, 2004.
- 4 Takeshi Kawano, Junko Horiguchi-Yamada, Shinobu Saito, Satsuki Iwase, Yusuke Furukawa, Yasuhiko Kano, Hisashi Yamada. Ectopic cyclin D1 expression blocks

STI571-induced erythroid differentiation of K562 cells. *Leukemia Res.* 28: 623-629, 2004

- 5 Takeshi Kawano, Junko Horiguchi-Yamada, Satsuki Iwase, Masaharu Akiyama, Yusuke Furukawa, Yasuhiko Kano, Hisashi Yamada. Depsipeptide enhances imatinib mesylate-induced apoptosis of Bcr-Abl positive cells and ectopic expression of cyclin D1, c-Myc or activated MEK abrogates this effect. submitted.
- 6 Pretreatment of interferon- α potentiates sensitivity to X-ray irradiation in Daudi cells: involvement of p21^{CIP1/WAF1} expression. Horiguchi-Yamada J, Yamada H. in preparation

研究報告

I 研究目的

転写因子 HIF-1 は、低酸素環境での血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現誘導、細胞増殖ならびにアポトーシスの制御などに重要であり、虚血性心血管疾患、固形腫瘍、糖尿病性網膜症などにおいて中心的役割を果たしている。HIF はダイオキシン受容体などとともに bHLH-PAS 型転写因子に属し、そのファミリーには HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α などがある。これらは Arnt をパートナーとしたヘテロ 2 量体を形成し、低酸素依存性に標的遺伝子の発現を主に正に制御する。また、その機序や生物学的意義は不明な点が多いが、IPAS などのネガティブレギュレーターも存在する。中でも HIF-1 α は中心的役割を有し、その活性化機構の解析も進展している。正常酸素分圧下では HIF-1 α 分子中の oxygen-dependent degradation domain (ODD) に存在するプロリンは水酸化されており、HIF-1 α は pVHL などのユビキチンリガーゼと結合しユビキチン化されプロテアソーム依存性に速やかに分解される。ヒトでは数種類のプロリン水酸化酵素が同定されている。また、HIF-1 α 分子内の C 末端領域の転写活性化領域に存在するアスパラギンも水酸化されており、CBP/p300 などの転写共役因子との相互作用が不可能となっている。かかるアスパラギン水酸化酵素は当初 FIH として報告されたものである。一方、低酸素分圧において、HIF-1 α はこれらの水酸化反応から免れ、タンパクレベルで安定化して核に移行し、CBP/p300、TIF2 などと相互作用して転写を活性化させる。最近の X 線結晶解析により、これらの水酸化酵素は jelly roll 構造という特異な構造をとり、2-oxoglutarate を補酵素として酸素をセンシングすることが明らかになっている。Semenza らは、HIF-1 はエリスロポイエチン遺伝子の 3' エンハンサー領域に存在する低酸素応答性 DNA 配列に結合して転写レベルでその発現を正に調節することを見出した。その後、HIF-1 研究は、固形腫瘍の血管新生機構と関連することが明らかになるなど、臨床医学にまで波及する展開を見せている。腫瘍深部の酸素分圧はきわめて低く、固形腫瘍がたとえば数 mm 以上の大きさに発育するためにはかかる環境に適応する必要がある。実際、多くの固形腫瘍において HIF-1 とその標的遺伝子である VEGF などの過剰発現が観察されている。HIF-1 α 過剰発現のメカニズムに関しては、pVHL の変異など、ユビキチン-プロテアソーム系の異常の報告もある。

一方で、正常組織においても酸素分圧は常に変動していることは自明であり、それを裏付ける実際の測定結果も存在する。肝臓や脳などにおいては、血流異常がない場合でも酸素分圧が 25mmHg 以下の箇所も多いことは注目に値する。しかし、従来これらの臓器機能のとくに細胞レベルでの研究において酸素分圧の影響はあまり考慮されておらず、正常組織における HIF-1 α 生理的役割に関しても不明な点が多い。生体において免疫応答や炎症が起こるのは主に血管外であり、局所酸素分圧は低いことが多い。好中球やリンパ球は異物刺激を受容後、活性化され、貪食、分裂、増殖やサイトカイン産生など、エネルギーを必要とする働きをする。かかる細胞の低酸素下における活性化はある意味では逆説的であり、免疫応答や炎症の制御機構を解明する上できわめて興味深い。過去にかかる問題にアプ

ローチした研究は少なく、末梢血単核球において低酸素下でマイトゲン刺激後のサイトカインや接着分子の発現が増加する、好中球の寿命は *ex vivo* において低酸素下で延長する、という報告が断片的に存在するのみであった。

すでに申請者は、共同研究者の Poellinger 教授とともに、HIF-1 α の低酸素における活性化機構を明らかにしてきた。また、その過程で、HIF-1 による遺伝子転写を抑制する内因性拮抗分子 IPAS を発見し、HIF-1-IPAS のバランスが細胞～組織の低酸素に対する応答性を規定することを示した (*Nature*, 2001)。一方、かかるシステムの臨床的重要性も心筋梗塞後などにおいて確認されている (*NEJM* 2001)。そこで、HIF-1-IPAS の転写因子のサーキットの分子機構を解明し、その人為的制御法を確立することによって臨床医学へ貢献することを目的とする。

II 研究計画および材料と方法

1 HIF-1 活性化機構の解析

2 細胞培養系を用いた HIF-1-IPAS システムの解析

1) HIF-IPAS システム分子の発現・機能制御の分子機構の解析

2) HIF-1 標的遺伝子の同定とその機能の解析

----1)、2)に際し、DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析とプロテオミクス解析を多用して包括的に究明する。

3) 細胞のアポトーシス、増殖に与える HIF-1-IPAS システムの作用とその分子機構の解析

3 恒常的活性型 HIF-1 を発現するアデノウイルス、動物モデルの作成ならびに解析

4 HIF-1、IPAS 分子を発現するトランスジェニックマウスの作成と解析

----4 は Poellinger 教室において作成する。

5 HIF-1、IPAS を分子標的とした創薬の分子基盤確立と化合物スクリーニング

III 研究成果

申請者は最近 HIF-1 研究の過程で HIF-1 α レベルが低酸素以外の因子によっても制御されていることを見出した。末梢血リンパ球などの正常細胞では HIF-1 α mRNA は恒常的に発現しているが低酸素だけでは HIF-1 α のタンパク発現に十分ではない。とくに、T 細胞においては T 細胞受容体を介した活性化刺激により HIF-1 α のタンパク発現は著明に増加し、その標的遺伝子の発現を通じてアポトーシスから逃れる。驚いたことに、HeLa 細胞などの腫瘍細胞においても、培養液中の血清あるいは増殖因子を除去することによりかかる正常細胞にみられる現象が再現される。従来、低酸素における HIF-1 α タンパク発現の増加は、HIF-1 α の安定化と Internal Ribosome Entry Sites (IRES) を介した Cap 非依存性の翻訳維持によると考えられていた。申請者は、すでに、増殖因子などの刺激が Akt \rightarrow mTOR \rightarrow S6 キナーゼ (S6K)、そして Akt とは独立に、PGC-1 \rightarrow ATP \rightarrow mTOR \rightarrow S6K を介して Cap 依存性翻訳のレベルでも HIF-1 α 合成を促進させること示唆する結果を得ている。以上の結果はがん細胞においても HIF-1 α のタンパクレベルは低酸素以外のシグナルによってもダイナミックかつ多彩にコントロールされる可能性を示すものである。

われわれは、末梢血 T 細胞の抗原刺激依存性活性化に与える低酸素の役割を調べ、示唆に富む成績を得た。従来、抗原刺激により活性化された T 細胞は細胞死に陥り、過剰な免

疫応答を阻止するとともにその収束にも寄与すると考えられていた (activation-induced cell death, AICD)。実際にわれわれの系においても、正常酸素分圧下においては T 細胞の寿命は抗原刺激をミミックした抗 CD3 抗体処理により短縮した。しかし、驚いたことに、低酸素分圧下においては T 細胞寿命は抗 CD3 抗体処理により無刺激の場合に比較してむしろ延長していた。かかる現象は、組織における免疫応答の低酸素におけるポジティブフィードバック機構の存在を示唆する。各酸素分圧における抗 CD3 抗体刺激 T 細胞における HIF-1 α のタンパク発現を検討した結果、T 細胞の寿命延長と並行していることがわかった。興味深いことに、T 細胞においては、HIF-1 α のタンパク発現には低酸素のみでは不十分であり、抗 CD3 抗体や PMA などの刺激が必須であることも判明した。その際、他の成長因子などでは低酸素においても HIF-1 α の発現は認められなかった。抗 CD3 抗体刺激下においても HIF-1 α mRNA 発現量には変化はなく、翻訳レベルの制御が重要であることが示唆された。その後、HIF-1 α の発現は rapamycin によって抑制されることなどから、抗 CD3 抗体刺激、あるいは T 細胞受容体を介したシグナルは、mTOR を介した S6 キナーゼのリン酸化によって HIF-1 α の mRNA からタンパクの合成を正に制御することが示唆され、新たなパラダイムを形成しつつある。

われわれは DNA チップを用いて T 細胞における低酸素、抗 CD3 抗体存在下における遺伝子発現動態を包括的に解析した結果、従来 HIF-1 の標的として知られている遺伝子以外にも多くの遺伝子の発現が変化することを知った。HIF-1 標的遺伝子の中では、adrenomedullin の mRNA 発現動態は HIF-1 α のタンパク発現動態ときわめて類似の動きをすることに着目した。adrenomedullin の生理活性部位を含む合成ペプチド断片を T 細胞培養液中に添加した結果、正常酸素分圧下においても抗 CD3 抗体依存性の細胞死が抑制されることを確認した。さらに、T 細胞において adrenomedullin の受容体が発現していること、低酸素における抗 CD3 抗体の細胞死低下作用が adrenomedullin 拮抗ペプチドによって抑制されること、をも確認した。以上から、HIF-1 \rightarrow adrenomedullin の経路が末梢組織における T 細胞制御にきわめて重要であることが推定される。たとえば、抗原刺激を受けずにたまたま血管外へ遊送した T 細胞は低酸素分圧下、つまり間質や組織中では死にやすく、また、血管内において抗原刺激を受けた T 細胞も AICD を回避し得ない。したがって、われわれの結果は、低酸素環境自体が HIF-1 を介して局所選択的免疫応答の増幅に貢献している可能性を示すものとも考えられる。

IV 考案

最近、T 細胞において HIF-1 の標的遺伝子である VEGF の発現が同様な刺激によって誘導され、T 細胞を Th1 に分化させることが報告された。すなわち、低酸素分圧下において、T 細胞は活性化刺激受容後異物排除に積極的に関与することがを示すものである。これらの結果は、生体における免疫応答や炎症反応の局所環境下における合目的的制御とそのメカニズムを提示し、きわめて示唆に富むものである。ここで、好中球、単球において選択的に HIF-1 α 遺伝子を破壊したマウスにおいても局所の炎症反応がきわめて減弱していることが報告されている。したがって、HIF-1 α は細胞種を超えて低酸素下における生体制御の軸となっている可能性が高い。

また、われわれの研究結果は、HIF-1 α システムが酸素分圧のみならず細胞特有のシグナ

ル系にも制御されることを示した点でも興味深い。一方、HIF-1 依存性転写はグルココルチコイドによっても正に制御されていることも明らかになった。現在、血管平滑筋、心筋、肝臓などにおける HIF-1 α の活性化機構の解明と生理的役割に関して研究を展開している。HIF システムの生物学的意義が包括的に解明されれば生体統御機構に関する理解が一層深まることは間違いなく、また、ガス状分子のセンシング機構の解明という視点からも HIF 研究は先端的である。

V 研究成果の発表

- 1) 田中廣壽、牧野雄一：気の生物学. 医学のあゆみ 201:517-522, 2002
- 2) Yuichi Makino, Hiroshi Nakamura, Eiji Ikeda, Kei Ohnuma, Kenji Yamauchi, Yutaka Yabe, Lorenz Poellinger, Yasunori Okada, Chikao Morimoto, and Hirotoishi Tanak: Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. J Immunol. 171: 6534-6540, 2003
- 3) Tsunenori Kodama, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Yuichi Makino, Rika Ouchida, Kensaku Okamoto, Tetsuya Hisada, Hiroshi Nakamura, Chikao Morimoto and Hirotoishi Tanaka: Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression. J Biol Chem. 278:33384-33391, 2003

研究報告

I 研究目的

Ischemic preconditioning (IPC) とは、短時間の非致死性虚血発作が先行する事により、次におきる長時間の虚血発作による細胞傷害が有意に軽減するという、細胞・臓器の有する内因的ストレス適応機転である。この現象は最初に心臓で発見され、その後、多くの臓器（脳・消化管・肝臓・腎臓・肺等）で確認された。IPC には早期相と遅延相とがあり、遅延相の IPC 発現においては、新たに誘導される誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) とシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) とが重要な役割を担っている。COX-2 誘導に伴い心臓で産出が増加するプロスタノイドは、PGI₂ と PGE₂ であった。そこで、我々は COX-2-プロスタノイド系による心筋保護の機序を解明することを目的に、(1)プロスタノイドによる心筋保護効果がいかなるプロスタノイド受容体を介して発現しているのかを検討し、(2)プロスタノイドによる心保護効果の機序の解明を試みた。さらに(3)心臓に恒常的に発現している COX-2 の役割についても検討を行った。

II 研究計画および材料と方法

選択的に各プロスタノイド受容体遺伝子を破壊した遺伝子操作動物モデル、(2)各種プロスタノイド受容体に選択性の高い agonist と antagonist、(3)選択的に COX-2 遺伝子を破壊した遺伝子操作動物モデルを実験の材料に用いた。4種類の PGE₂ の受容体 knockout マウス (EP1、EP2、EP3、EP4 KO マウス) は、京都大学成宮周教授より提供を受けた。COX-2 KO マウスは東京都精神神経研究所の山形要人博士より提供を受けた。

1. 遅延相の ischemic preconditioning 発現に関与する PGE₂ 受容体の同定

全ての実験は 4種類の PGE₂ の受容体 KO マウスと対照となる同系統の wild-type マウスの 2群において行なわれた。麻酔下に気管切開を行い挿管、酸素吸入下で人工呼吸器による呼吸管理を行った。顕微鏡下で左側胸部第4肋間より開胸し、左冠動脈前下行枝の起始部より約 2mm 下を結紮・開放を繰り返すことにより、IPC を誘導した。心筋虚血は心電図変化並び肉眼的に確認し、すばやく閉胸し、抜管後、保温、補液、酸素吸入を行い回復させた。24 時間後再度麻酔下に開胸し、前日と同部位で左冠動脈前下行枝を結紮することにより心筋虚血を作成した。30 分間の虚血に引き続き、6 時間の再灌流を行った後心臓を摘出し、TTC 染色により心筋梗塞サイズを計測した。本研究は Louisville 大学、Roberto Bolli 教授との共同実験によった。

2. 成獣ラット単離心筋細胞を用いたプロスタノイドによる心筋保護効果の機序の解明

成獣ラットより心筋細胞を単離し mRNA または蛋白質を抽出した。RT-PCR 法または Western immunoblotting 法により心筋細胞に発現するプロスタノイド受容体を同定した。

成獣ラット単离心筋細胞を H₂O₂ 添加緩衝液で灌流した際(酸化ストレス下)の細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化 (fluo-3 による)、細胞 viability (形態変化で評価または trypan blue 取り込みによる) に及ぼす各種プロスタノイド受容体 agonist の効果と、さらに ATP 感受性 K⁺

チャンネル遮断薬、glibenclamide と 5-hydroxydecanoate (5-HD) を併用した際の影響を検討した。

成獣ラット単離心筋細胞をグルコース無添加緩衝液で灌流し、ミトコンドリアの flavoprotein 酸化度を 488nm 励起、520nm 吸収波長での flavoprotein 蛍光度をもってミトコンドリア ATP 感受性 K⁺チャンネル開放の指標とし、各種プロスタノイド受容体 agonist のミトコンドリア ATP 感受性 K⁺チャンネル開放に及ぼす効果を検討した。

3. COX-2 ノックアウトマウスにおける心臓ならび腎臓線維化進展の機序

Heterozygous (COX-2^{+/-})、または homozygous (COX-2^{-/-}) の COX-2KO マウスを対照となる wild-type マウスとともに飼育し、8 週齢または 12 週齢の時点で心臓、腎臓を摘出し、病理学的検討と心臓と腎臓から抽出した蛋白を用いて Western immunoblotting と zymography とを行った。

III 研究成果

1. 遅延相の IPC 発現に関与する PGE₂ 受容体の同定

IPC を行わない群での心筋梗塞サイズは EP2、EP3、EP4 KO マウスと wild-type マウスとで有意差を認めなかったが、EP1 KO マウスにおける心筋梗塞サイズは wild-type マウスと比べ有意に小さかった。wild-type マウスにおいて心筋梗塞サイズは IPC により 58%縮小した。IPC 効果は、EP1、EP2、EP4 KO マウスにおいても同等に確認されたが、EP3KO マウスにおいては心筋梗塞縮小効果は消失していた。

2. 成獣ラット単離心筋細胞を用いたプロスタノイドによる心筋保護効果の機序の解明

心筋細胞には EP1、EP2、EP3、EP4 ならびに IP 受容体の mRNA が発現していた。EP3 受容体 splicingvariant としては EP3B のみが存在していた。Western immunoblotting により EP1、EP3、EP4、IP 受容体の発現が確認された。

PGI₂ アナログ、Carbaprostacyclin (cPGI₂) は H₂O₂ 灌流時の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制し、細胞寿命を有意に延長した。しかし、より IP 受容体に選択性の高い PGI₂ アナログ、cicaprost や ONO-1301 の細胞保護効果は不十分であった。一方、EP3 受容体選択的 agonist、ONO-AE-248 は H₂O₂ 灌流時の細胞内 Ca²⁺濃度に影響を与えることなく、細胞寿命を有意に延長した。EP1 と EP3 両者の agonist である sulprostone は、EP1 antagonist、ONO-8711 併用時のみ細胞寿命を延長した。PPAR δ 受容体 agonist、L-165041 には細胞保護効果を認めなかった。cPGI₂ および ONO-AE-248 の細胞寿命の延長効果は 5-HD の併用により消失したが、glibenclamide 併用はその効果に影響しなかった。

Diazoxide により、flavoprotein 酸化度は最大値 (2,4-dinitrophenol 投与による) の 30%にまで可逆的に上昇し、その効果は 5-HD の併用により完全に抑制された。cPGI₂ および ONO-AE-248 の投与はそれ自体では flavoprotein 酸化度を変えなかったが、diazoxide との併用により、diazoxide 単独投与時に比べ flavoprotein 酸化度を増加した。一方、ONO-1301 は diazoxide との併用時も flavoprotein 酸化度を変えなかった。

3. COX-2 ノックアウトマウスにおける心臓ならび腎臓線維化進展の機序

cox-2^{-/-}においては、8 週齢より腎機能の悪化 (血清尿素窒素、クレアチニン値の上昇) が見られたが、wild-type と cox-2^{+/-}では 12 週齢まで腎機能の悪化はみられなかった。病理形態学的検討では、すべてのマウスで 12 週齢まで心臓や腎臓に明らかな線維化は見ら

れなかったが、cox-2^{-/-}では8週齢から腎皮質の非薄化が観察された。COX-1、PGI₂ならびにTXA₂的合成酵素の蛋白発現レベルには、wild-type、cox-2^{+/-}、cox-2^{-/-}の3群間で差を認めなかったが、細胞質型と膜型両方のPGE₂合成酵素の発現レベルは、心臓、腎（腎臓により顕著に）ともにWT>cox-2^{+/-}>cox-2^{-/-}の順に減じていた。内皮型並びに誘導型一酸化窒素合成酵素の発現レベルには3群間で差を認めなかった。MMP-2蛋白発現レベルとZymographyから求めたMMP-2活性は、cox-2^{-/-}において低下していたが、MMP-9発現レベル、活性には3群間で差を認めなかった。

IV 考案

実験1、2より(A) *in vivo*での遅延相IPC発現においてEP3受容体が必須であり、(B) 心筋細胞にはEP1受容体、EP3受容体、EP4受容体、IP受容体が存在し、(C) EP3受容体刺激のみが、ミトコンドリアK_{ATP}チャネル開放を促すこと、(D) 酸化ストレス下に細胞保護効果を担っているのは主にEP3受容体であることが明らかにされた。

さらに心筋細胞内Ca²⁺動態への影響も各受容体により異なることが明らかにされた。今後の課題として、各受容体以降の細胞内情報伝達、特にIP受容体刺激による心筋細胞内Ca²⁺動態変化の主体、EP3受容体刺激によるミトコンドリアK_{ATP}チャネル開放に至る情報伝達系を解明していく必要がある。さらにEP1受容体やEP4受容体の役割についても充分解明されておらず、今後の課題として残った。

実験3からは、構造的に発現しているCOX-2は、PGE₂の生合成、MMP-2の制御を介して組織の線維化に深く関与している可能性が示唆された。

炎症や心筋壊死後の過剰な発現・産出の場合は検討していないものの、以上の研究より、心臓におけるCOX-2-プロスタノイド系は、細胞傷害的というよりむしろ細胞保護的な役割を持つ極めて重要な脂質メディエーターであることが明らかにされ、臨床的には循環器疾患患者における非ステロイド系消炎鎮痛剤の使用に関して示唆に富む成果が得られた。

V 研究成果の発表

1. Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, Kodani E, Han H, Zhu Y, Bolli R. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 2002 Mar 22; 90(5):602-8.
2. Kodani E, Xuan YT, Takano H, Shinmura K, Tang XL, Bolli R. Role of cyclic guanosine monophosphate in late preconditioning in conscious rabbits. *Circulation*. 2002 Jun 25; 105(25): 30 46-52.
3. Shinmura K, Bolli R, Liu SQ, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Srivastava S, Bhatnagar A. Aldose Reductase Is an Obligatory Mediator of the Late Phase of Ischemic Preconditioning. *Circ Res*. 2002 Aug 9; 91(3):240-6.
4. Bolli R, Shinmura K, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Guo Y, Dawn B. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates

- ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 15; 55(3):506-519.
5. Kodani E, Xuan YT, Shinmura K, Takano H, Tang XL, Bolli R. Delta-opioid receptor-induced late preconditioning is mediated by cyclooxygenase-2 in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Nov; 283(5): H1943-57.
 6. Shinmura K, Nagai M, Tamaki K, Tani M, Bolli R. Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates opioid-induced late phase of preconditioning in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Dec; 283(6): H2534-43.
 7. Tang XL, Kodani E, Takano H, Hill M, Shinmura K, Vondriska TM, Ping P, Bolli R. Protein tyrosine kinase signaling is necessary for NO donor-induced late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Apr; 284(4): H1441-8. Epub 2002 Dec 12.
 8. Shinmura K, Kodani E, Xuan YT, Dawn B, Tang XL, Bolli R. Effect of aspirin on late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Apr 2; 41(7): 1183-94.
 9. Bolli R, Shinmura K. Cyclooxygenase-2 in myocardial ischemia: is it really a friend? (Author reply) *J Am Coll Cardiol.* 2003 Nov 5; 42(9): 1714-5.
 10. Shinmura K, Nagai M, Tamaki K, Bolli R. Gender and aging do not impair opioid-induced late preconditioning in rats. *Basic Res Cardiol.* 2004 Jan; 99(1): 46-55. Epub 2003 Sep 09.
 11. Shinmura K, Tamaki K, Nagai M, Sato T, Ishida H, Bolli R. Prostacyclin attenuates oxidative damage of myocytes by opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels via the EP3 receptor. (submitted for publication).
 12. Shinmura K, Nagai M, Tamaki K, Bolli R. Loss of ischemic preconditioning in the ovariectomized rat: Possible involvement of impaired phosphorylation of serine729 residue of PKC- ϵ . (submitted for publication).
 13. Shinmura K, Tamaki K, Yamada J, Yamada H. A comparison of gene expression profiles in murine hearts preconditioned by adenosine A1 or opioid δ receptor activation. (in preparation).