

155. 新規血管新生促進方法の開発

村田 幸久

Key words: プロスタグランジン, 虚血, 血流,
血管新生

東京大学 大学院農学生命科学研究科
放射線動物科学研究室

緒言

全身をくまなく走行する血管は、あらゆる臓器に酸素と栄養を供給する。ヒトの死因の多くを占める心筋梗塞、脳梗塞や糖尿病に合併して起こる虚血性下肢壊死は、生活習慣病に伴って起きる動脈硬化によって血管が閉塞し、その下流組織が虚血状態に陥り壊死する病態（閉塞性血管疾患）である。虚血組織には、いち早く血管を新生させて血流を補う必要がある。現在、血管新生促進を目的に血管内皮増殖因子 (VEGF) の投与が行われているが、その治療効率は低く、投与後拡散してしまい、生理的な血管機能にも影響を与えるため出血などの副作用がでる¹⁾。つまり、より“強力”でかつ“局所的”な血管新生制御方法の確立が求められている。

炎症メディエーターであるプロスタグランジン (PG) は血圧から、体温、痛みの調節まで多様な生理活性を示す²⁾。その1つである PGD₂ は、細胞膜のアラキドン酸を基質として、シクロオキシゲナーゼ (COX) と PGD₂ 合成酵素によって代謝・産生される。これまでに、肥満細胞が大量に産生する PGD₂ がアレルギーの発症に関与することが分かっている³⁾。しかし、PGD₂ の組織における半減期は 50 秒と非常に短く、検出が困難なことから、その詳細な産生機構や生理作用については明らかにされていなかった。

本研究では、PGD₂ 産生制御の分子機構の解明と PGD₂ 検出方法の確立を行うとともに、その産生阻害が虚血組織における血流改善作用を持つ可能性を示唆するデータを得たので報告する。

方法および結果

1. PGD₂ 産生制御機構の解明

PGD₂ を産生する炎症性細胞の細胞膜には、膜構造蛋白質である X が存在しており、そこに複数の情報伝達分子が結合して、効率的なシグナル伝達を行っている。X 結合モチーフが PGD 合成酵素 (PGDS) に確認されることから、“膜の構造蛋白質 X による PGDS 活性調節モデル”を提案し、その証明に取り組んだ。

その結果、siRNA を用いて X 欠損処置を行った細胞では無処置の細胞と比較して、PGD₂ 産生量の減少が確認された。また、免疫染色法を用いた検討において、細胞内で X と PGDS の共局在が観察された。免疫沈降法においても、X と PGDS の結合が観察された。さらに、PGDS 結合すると推測される部位を欠損させた、細胞膜透過性 X を作製して細胞に処置したところ、PGD₂ 産生量が有意に抑制されることが分かった。

これらの結果から、細胞膜上に存在する X が COX と PGDS の橋渡しの役割を担うことで、PGD₂ の産生効率を上げている可能性が示唆された。また PGDS との結合能を欠損した細胞膜透過性 X の投与が、PGDS 活性を干渉阻害できる新しいツールになりうるということが分かった。

2. PGD₂ 検出方法の確立

半減期の短い PGD₂ の組織濃度測定は困難であるが、その代謝産物が安定的に尿中に排出されることが分かっている。本項目では PGD₂ 代謝産物が虚血性筋壊死の病態マーカーとして有用であるかを検討した。

その結果、マウスの虚血性筋壊死モデルから採取した尿中の PGD₂ 代謝産物排出濃度を測定し、組織中の PGD₂ 濃度推移と比較検討した。その結果、虚血処置 7 日目をピークとして PGD₂ 代謝産物排出濃度 (図 1) と組織 PGD₂ 濃度の上昇が観察された。さらにこれらの濃度上昇と症状の進展には、正の相関関係が確認された。

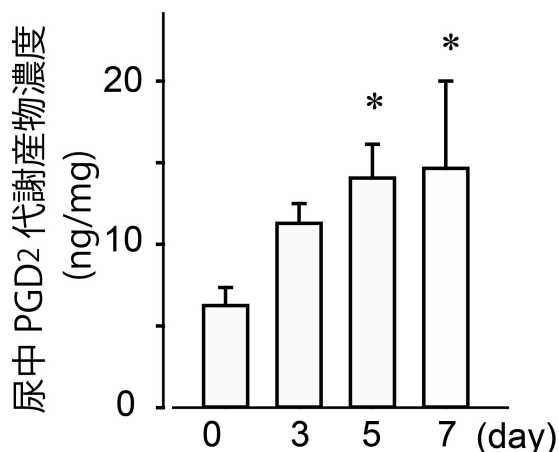


図 1. 虚血処置後に尿中に排泄される PGD₂ 代謝産物の濃度推移。

マウスの左下肢大腿動脈を結紮後、0、3、5、7 日後に尿中に排泄される PGD₂ 代謝産物を、質量分析装置を用いて測定した結果。*p < 0.05, student t-test.

以上のことから、PGD₂ 代謝産物が虚血性疾患の病態マーカーとして有用である可能性が示唆された。現在、心筋梗塞など他の虚血性筋壊死モデルにおいても尿中に排泄される PGD₂ 代謝産物がマーカーとして有用であるか、また PGD₂ 代謝産物が虚血性筋壊死の病態マーカーとして特異性を持っているかについて、他の病態との比較を行いながら検討を行っている。

3. 血管・組織再生方法の確立

本項目では PGD₂ 産生阻害が障害局所の血管透過性を上げ、“組織の再構築を促進する可能性”について検討を行った。

その結果、PGDS 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて虚血性筋肉壊死モデルを作製し、虚血処置をした下肢の血流量を経時的に測定した。その結果、野生型 (WT) マウスと比較して PGDS KO マウスにおいては虚血状態からの血流回復が有意に早いことが分かった。また、運動能力試験により、PGDS KO では虚血処置からの運動能回復が WT と比較して非常に早いことが分かった (図 2)。さらに病理切片解析により、PGDS KO では虚血処置による筋肉壊死面積が WT に比較して小さいことが明らかとなった (図 3)。

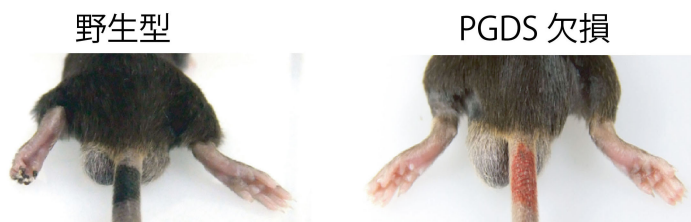


図 2. PGDS 欠損による虚血性下肢壊死の回避 (肢の外観)。

野生型マウスと PGDS 欠損マウスは下肢大動脈 (左脚) を結紮後、7 日後の脚の状態を撮影した。野生型マウスでは虚血処置により血流が減り、筋肉の委縮が起こっているのが観察される。PGDS 欠損マウスは虚血処置による血流減少の回復が早く、筋肉の委縮の程度が弱い。

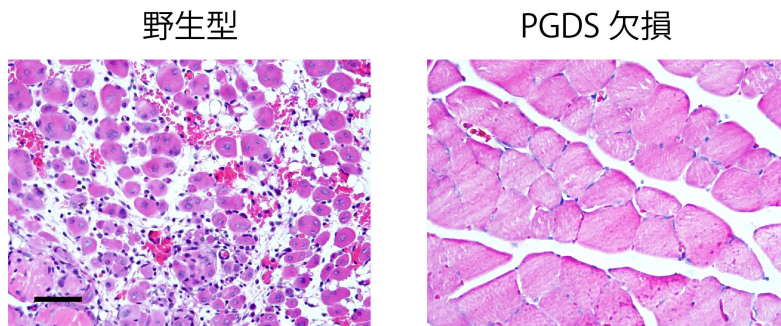


図3. PGDS 欠損による虚血性下肢壊死の回避（筋肉の病理切片像）。

右図) 上記マウスの下肢筋肉の病理切片の写真。虚血処置7日後、野生型マウスの腓腹筋では多くの筋細胞の壊死が観察された。一方でPGDS欠損マウスでは、虚血処置による筋肉の壊死の程度が野生型の物に比べて顕著に小さかった。Scale bar: 100 μ m.

以上の結果より、PGDS 遺伝子欠損は虚血状態に陥った組織に伸びる、血管側復路の形成を促進する可能性が示唆された。現在、PGDS 阻害剤の投与によっても同様の治療効果が得られるかについて検討を行っている。

考 察

本研究では (1) 細胞膜構造蛋白質である X が PGD 合成酵素活性を調節していること、(2) 膜透過性 X 変異ペプチドが PGD₂ 産生抑制に有用であること、(3) 尿中に排泄される PGD₂ 代謝産物が虚血性筋壊死病態のマーカーとなり得ること、(4) PGD₂ 産生抑制が虚血性疾患の治療効果を持つ可能性があること、を明らかにした。虚血性疾患の新しい治療方法の開発を目指して、今後更なる検討を行いたい。

本研究を遂行するにあたり、上原記念生命科学財団様より助成賜りましたことを心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Chen, Y. X., Nakashima, Y., Tanaka, K., Shiraishi, S., Nakagawa, K. & Sueishi, K. : Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) in the atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19** : 131-139, 1999.
- 2) Serhan, C. N. & Savill, J. : Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.*, **6** : 1191-1197, 2005.
- 3) Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Yoshida, N., Kimura, K., Mizoguchi, A., Honda, Y., Nagai, H. & Narumiya, S. : Prostaglandin D₂ as a mediator of allergic asthma. *Science*, **287** : 2013-2017, 2000.