

学 位 論 文 要 旨

氏 名

大庭 和人  印

論 文 題 目

Downregulation of the proangiogenic prostaglandin E receptor EP3 and reduced angiogenesis in a mouse model of diabetes mellitus

(糖尿病マウスモデルにおける血管新生を促進するプロスタグランジンE受容体・EP3のダウンレギュレーションと血管新生の障害)

指 導 教 授 承 認 印

七里 真義  印

Downregulation of the proangiogenic prostaglandin E receptor EP3 and reduced angiogenesis in a mouse model of diabetes mellitus

(糖尿病マウスモデルにおける血管新生を促進するプロスタグランジン E 受容体・EP3 のダウンレギュレーションと血管新生の障害)

【背景】

糖尿病は、心血管合併症を併発し死亡率を増加させるが、その分子的メカニズムは十分に解明されていない。糖尿病では、創傷や潰瘍の治癒が遅延することが知られているが、そのプロセスは血管新生に依存している。これまでにアラキドン酸の代謝物であるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) が、その受容体 EP3 を介して血管新生を促進することが報告された。プロスタグランジンはシクロオキシゲナーゼ (COX) とプロスタグランジン合成酵素の連続した作用によって生成される。COX には 2 つのアイソフォームが知られており、COX-1 は様々な組織において構成型酵素として発現しているが、COX-2 は分裂促進因子、サイトカイン、成長因子、腫瘍促進物質によって誘導される。これまでにスポンジ移植モデルにおいて、スポンジ移植片の周囲に形成される肉芽組織における血管新生のメカニズムについての研究が行われてきたが、血管新生が COX-2 の mRNA の誘導に付随して起こるだけでなく、選択的 COX-2 阻害薬の投与によって阻害されることが報告された。そして、 PGE_2 の局所投与により血管新生が促進されることや、COX-2 ないし PGE_2 による血管新生促進の際には血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現の上昇を伴っていること、 PGE_2 合成酵素の誘導のノックアウトマウスにおいて血管新生と肉芽形成の障害を認めることが報告され、 PGE_2 が動物実験において COX-2 の血管新生作用を調節することが示されている。 PGE_2 の受容体には EP1~4 があるが、これまでに EP3 ノックアウトマウスにおける、創傷治癒の際の血管新生の障害が報告されている。これらの報告を踏まえて、私達は糖尿病における血管新生障害に PGE_2 -EP3 経路が関与するのではないかという仮説をたて、糖尿病性足潰瘍に対する治療標的となりうるかの研究を開始した。

【目的】

PGE_2 -EP3 経路が、糖尿病性足潰瘍の治療標的となりうるか否かを明らかにする。

【方法】

① 糖尿病モデルの作成

雄性 8 週齢の C57BL/6 マウスを無作為に糖尿病群と、非糖尿病の対照群に分類した。糖尿病群には 100mg/kg の Streptozotocin を腹腔内投与して糖尿病を誘発した。また、対照群には同量のクエン酸バッファーを投与した。糖尿病群は糖尿病誘発後 2 週で血糖値を測定し、血糖値が 400mg/dl 以上の個体を糖尿病マウスとして採用した。

② スポンジ移植モデルの作成

糖尿病誘発後 4 週で両側背部皮下に直径 8mm、高さ 5mm の円柱状のポリウレタン製のスポンジを移植し、その翌日に線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) をスポンジ内に投与しスポンジ周囲の肉芽形成を促進した。

③ 血管新生の評価

スポンジ移植後 5~14 日後にスポンジ肉芽組織を採取し、血管密度を PECAM-1 の免疫染色で、PECAM-1 遺伝子発現を real-time PCR で評価した。

④ 血管新生促進因子の評価

PGE₂の合成経路の評価のため COX-2 とプロスタグランジン E 合成酵素(mPGES-1)を、PGE₂の受容体の評価のため EP1~4 を、その他の血管新生促進因子として VEGFA や SDF-1 の遺伝子発現を Real-time PCR で評価した。

⑤ EP3 受容体刺激

30nmol の EP3 作動薬 ANO-AE248 をスポンジ移植後より毎日、スポンジ内へ局所投与した。

【結果と考察】

① 糖尿病モデルにおける血管新生の障害の評価

糖尿病群は、対照群に対して、スポンジ移植後 5、7 日のスポンジ肉芽組織の血管密度と PECAM-1 発現の有意な低下を認めた。血管新生は、創傷治癒において重要な過程であるが、この結果は、糖尿病が FGF-2 に依存した肉芽形成の際の血管新生を抑制したことを示唆した。

② PGE₂の産生経路の評価

糖尿病群は、対照群に対して、スポンジ肉芽組織の COX-2 発現は移植後 5、7、14 日において、mPGES-1 発現は移植後 5 日において、有意な低下を認めた。過去に PGE₂の局所投与が、VEGF の誘導を介してスポンジ移植片の血管新生を増強することが報告されたが、炎症部位での PGE₂産生密接に関連する酵素である COX-2 と mPGES-1 の発現低下を認めたことは、糖尿病モデルマウスにおける血管新生の抑制に、局所の PGE₂レベルの低下が関与することを示唆し、これは炎症部位への PGE₂受容体陽性細胞の動員の障害を示唆した。

③ PGE₂の受容体の評価

糖尿病群は、対照群に対して、移植後 5、7 日におけるスポンジ肉芽組織の EP3 発現の有意な低下を認めた。しかし EP1、2、4 の有意な発現の低下を認めなかった。過去に同様のスポンジ移植モデルにおいて EP3 欠損マウスにおける血管新生の障害が報告されているが、今回の結果は、糖尿病における血管新生の障害にも EP3 シグナルの減弱が関わることを示唆した。また、過去に GFP のキメラマウスを用いた研究で EP3 を発現した骨髄由来細胞が肉芽形成の際に、局所に動員されることが報告されていることから、今回の結果は糖尿病マウスにおける、炎症部位への EP3 陽性細胞の動員の障害を示唆した。今回の報告は糖尿病における血管新生の障害と EP3 のダウンレギュレーションに関連付ける最初の報告である。

④ その他の血管新生促進因子の評価

糖尿病群は、対照群に対して移植後 5、7 日における VEGFA 発現と SDF-1 発現の有意な低下を認めた。VEGFA は生理的及び病理的血管新生の主要な調節因子であり、VEGF 阻害薬は進行癌や加齢性黄斑変性症の治療に対して FDA に承認されている。また、過去に共同研究者の天野らはスポンジ移植片に対して VEGFA の局所投与を行い、その血管新生増強を確認したことを報告した。今回の結果は糖尿病における血管新生障害に VEGFA レベルの低下が関与することを示唆した。一方、ケモカインである SDF-1 とその受容体 CXCR4 を介する経路は、VEGFA 依存性および非依存性の腫瘍における新生血管形成に関与することや、乳癌において Akt 経路を介して VEGF 発現をアップレギュレートすることが報告されている。加えて、CXCR4 は膠芽細胞腫における低酸素下において低酸素誘導因子(HIF)-1α と VEGF を介してアップレギュレートされることも報告されている血管新生促進因子である。今回の結果は、糖

尿病における血管新生障害に、スポンジ肉芽組織の SDF-1 のダウンレギュレーションが関与することを示唆した。

⑤ 糖尿病モデルにおける EP3 受容体刺激による血管新生の回復の評価

次に糖尿病スポンジ移植モデルに EP3 作動薬を投与し EP3 刺激を行った。EP3 作動薬投与群は、生理食塩水を投与した Vehicle 群に対して、スポンジ移植後 7 日における、血管密度とスポンジ肉芽組織 PECAM-1 発現の有意な上昇を認めた。この結果は EP3 受容体作動薬が糖尿病による血管新生障害を改善させることを示唆した。

⑥ 糖尿病スポンジ移植モデルにおける EP3 受容体刺激による VEGFA 発現と SDF-1 発現の変化

次に糖尿病スポンジ移植モデルに対して、スポンジ移植後 7 日で初めて EP3 作動薬を投与し、スポンジ肉芽組織の VEGFA 発現及び SDF-1 発現の経時的な変化の評価を行った。VEGFA 発現は EP3 作動薬投与後 6 時間で、SDF-1 投与群は投与後 3、6 時間で、投与前に対する発現の上昇を認めた。過去に同様のスポンジ移植モデルにおいて EP3 作動薬の投与により局所の VEGFA 発現が上昇することが報告されているが、今回の結果は、EP3 作動薬が糖尿病による局所の VEGFA 発現低下を改善することを示唆した。一方、過去に SDF-1 とその受容体 CXCR4 が、COX-2 の誘導と EP3/EP4 シグナルに反応した骨髄細胞の局所への動員に重要であることが報告されているが、今回の結果は、糖尿病における血管新生の障害において、EP3 作動薬が局所の SDF-1 発現低下を改善することを示唆した。

これまでの結果より、糖尿病マウスにおいて EP3 シグナルが減弱が、VEGFA と SDF-1 の発現低下を引き起こし、その受容体 VEGFR や CXCR4 等の陽性細胞の局所への動員を障害して、血管新生を障害することと、EP3 刺激により回復することが示唆された。

【結語】

EP3 作動薬は糖尿病性足潰瘍に対する新たな治療法となりうる。