

いて、血管平滑筋を刺激した後に RNA を抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなったところ、HAS1 および HAS3 に比較して、HAS 2 発現の圧倒的な増加が観察された(図 2)。さらにこの結果を確認するために、時間依存的な HAS2mRNA 発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGF β , PDGF-BB のそれぞれを、 10^{-6} M, 10ng/ml, 10ng/ml の濃度で刺激し、HAS 2 の発現を RT-PCR において定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329 による増加効果が最も強力であることがわかった。

以上の結果から、ヒアルロン酸産生増強の分子メカニズムとして、EP4 刺激を介して PKA の活性化がおり、これによる HAS2 の選択的な転写促進がおり、最終的に血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸分泌が促進されるメカニズムが想定された。

平滑筋におけるアデニル酸シクラーゼサブタイプの発現

EP4 刺激は G 蛋白質共役型受容体の活性化をへて、Gs 蛋白質の活性化、および引き続くアデニル酸シクラーゼの活性化を経て cAMP 産生を引き起こす。この下流に存在する PKA 刺激が HAS 2 の転写促進因子として働くことがわかった。しかるに血管平滑筋には多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプが発現している。我々は特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプがこのプロセスに重要な役割を果たす仮説をたてた。そこで定量的な RT-PCR 法を用いて、どのアデニル酸シクラーゼサブタイプが血管平滑筋細胞に多く発現するかを検討した。

RT-PCR の結果から、平滑筋細胞には 1 および 8 型を除くすべてのサブタイプの発現が検出された。この中ではとくに 2 および 6 型の発現がおおいことがわかった。そこで 2 および 6 型のそれぞれの関与を検討するために、siRNA の手法を用いて、それぞれのアデニル酸シクラーゼサブタイプの欠損実験をおこなった。いずれのサブタイプの欠損においても PGE 1 を介した cAMP 産生能は顕著な低下を示した。このことから両サブタイプは、いずれも PGE1 刺激の下流に存在することが推測された。そこでこれらのサブタイプによるヒアルロン酸産生を比較したところ、6 型サブタイプの欠損時においてヒアルロン酸産生能が低下するが、2 型ないし 5 型の欠損時にはそのような産生低下はみられないことがわかった。

さらにアデノウイルスをもちいて、2 型および 6 型サブタイプの過大発現をおこなったところ、2 型サブタイプの過大発現においてはヒアルロン酸産生は上昇しなかったが、6 型サブタイプの過大発現によってヒアルロン酸産生が顕著に増加することがわかった。以上の結果から、血管平滑筋細胞に発現する多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプの中でも、6 型サブタイプが EP4 刺激によるヒアルロン酸産生に重要な役割を果たしていることが想定された。

さらに 2 型および 6 型に選択的な刺激薬を用いた実験からは、アデノウイルスによるアデニル酸シクラーゼ蛋白発現と同等の効果が、アデニル酸シクラーゼ選択的の刺激薬によって得られることがわかった。このことは、アデノウイルスを使うことなく、薬理的な手法を用いることにより、ヒアルロン酸産生を制御できる可能性を示唆する。

4. 考察

ヒアルロン酸は細胞外器質として様々な作用を持つことが知られているが、その発現調節は十分わかっていない。我々は少なくとも血管平滑筋細胞によるヒアルロン酸産生には EP4 刺激が重要な役割をはたし、EP4 によるアデニル酸シクラーゼの活性化およびヒアルロン酸産生酵素の転写刺激を介して、ヒアルロン酸の産生が上昇することを示した。

これまでの実験で得られた結果で重要と考えられることは、これらの刺激が細胞内シグナル系をへて発揮されるが、関与する酵素サブタイプが特定されたことである。受容体レベルでは EP4 が主要な役割を果たし、その下流にあるアデニル酸シクラーゼのサブタイプに関しては 6 型サブタイプが重要な役割をになっている。さらに大切なことはヒアルロン酸産生酵素サブタイプであり、3 種のサブタイプの中でも 2 型のみが EP4 刺激によって転写活性が増強され、ヒアルロン酸産生を亢進させることがわかった。これらの結果から、ヒアルロン酸産生の分子メカニズムとして、高度に分化した特定のサブタイプを通じたシグナル伝達系が細胞内で構築されている可能性がしめされた。

細胞内には多数の酵素が存在し、その酵素サブタイプには複数存在することが知られている。シグナル伝達の過程においては、異なったサブタイプが相補的に作用し、同じような結果を生む場合と、それぞれのサブタイプが異なった機能を担っている場合がある。PGE 刺激によるヒアルロン酸産生に関しては後者の可能性が考えられる。EP4、アデニル酸シクラーゼ 6 型、およびヒアルロン酸産生酵素 2 型のそれぞれが機能的に共役していることがわかったが、その共役を可能とするメカニズムは不明である。いわゆるカベオリンなどのスカフォールド蛋白質などを通じて、特定のサブタイプ蛋白質が重合している可能性も考えられる。そのような検討に当たっては免疫沈降法や細胞における免疫染色法を用いた検討が必要であると考えられ、今後の検討課題である。また、今回の研究結果から、特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプを制御する活性薬理物質が、ヒアルロン酸欠乏組織などにおけるヒアルロン酸産生促進に応用できる可能性が示された。皮膚科学や整形外科分野を含めて、今後どのような分野において活用できるのかを検討する必要がある。

引用文献

1. Yokoyama U, Minamisawa S, Hong Q, Segi-Nishida E, Ghatak S, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Tool BP, Sugimoto Y, and Ishikawa Y: Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J. Clin. Invest.* 116; 3026-3034, 2006
2. Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y-Z, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S, and Ishikawa Y: Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293; H1662-72, 2007
3. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, and Ishikawa Y: PGE2-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. *J. Biol. Chem.* 283; 28702-28709, 2008

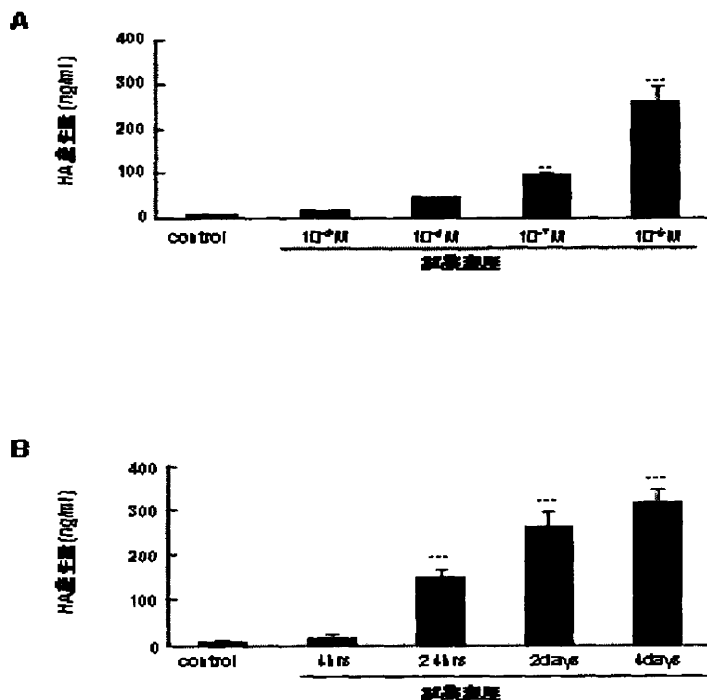


図1. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生制御

A. 容量依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。

血管平滑筋細胞を培養条件下で EP4 の選択的なアゴニストである ONO-AE1-329 を 48 時間に渡って添加し、ヒアルロン酸の産生を比較した。培養液中に浸出するヒアルロン酸を凝集法を用いて定量した。いずれも容量依存性にヒアルロン酸産生が増加している。

B. 時間依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。

EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 を用いて、血管平滑筋細胞を培養し、刺激をおこなった。4、24、2 日、4 日間におけるヒアルロン酸の産生を比較した。

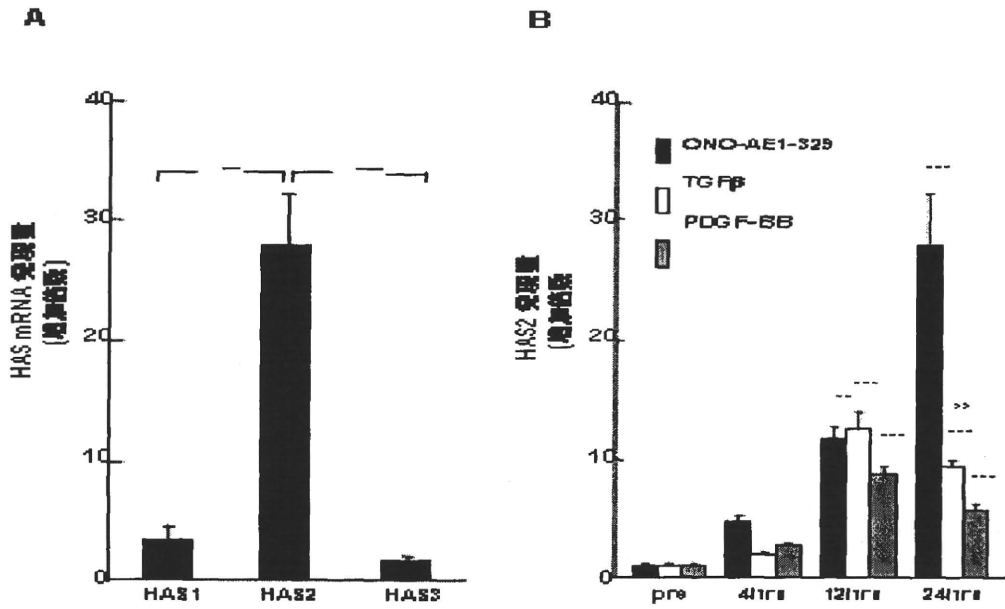


図2. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生酵素発現の変化

A. RT-PCR によってヒアルロン酸産生酵素のサブタイプ(HAS1,HAS2, HAS3)のmRNA 発現を定量した。EP4 選択的な刺激剤である ONO-AE1-329 を 10^{-6} M の濃度において、血管平滑筋を刺激した後に RNA を抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなった。HAS1 および HAS3 に比較して、HAS2 発現の圧倒的な増加が観察された。

B. 時間依存的な HAS2mRNA 発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGFβ、PDGF-BB のそれぞれを、 10^{-6} M, 10ng/ml, 10ng/ml の濃度で刺激し、HAS2 の発現を RT-PCR において定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329 による増加効果が最も強力であった。

ISSN 0918-6425

平成21年度

喫煙科学研究財団**研究年報**

SMOKING RESEARCH FOUNDATION ANNUAL RESEARCH REPORT 2009

財団法人喫煙科学研究財団

SMOKING RESEARCH FOUNDATION

19 cAMP シグナルとニコチン受容体

横浜市立大学医学部循環制御医学 石川義弘 佐藤元彦 奥村敏
横山詩子 岩坪耕策

要約

「背景目的」ニコチン受容体の果たす役割を細胞内セカンド・メッセンジャー系のなかで cAMP シグナルを中心に検討した。とりわけ cAMP 産生酵素であるアデニル酸シクラーゼおよびその下流酵素である Epac 発現と関連して、ニコチン受容体と cAMP シグナルの機能的関連について検討した。「方法」我々の開発したマウス神経細胞の初代培養系およびミニポンプによる個体レベルでの検討方法を用いて、Epac およびニコチン刺激の細胞生存性に関する影響を調べた。とりわけニコチンの短期および長期刺激による効果の違い、および Epac による細胞死制御メカニズムを PKA シグナルと関連して検討した。「結果」cAMP は PKA および Epac のどちらも活性化するが、神経細胞においては Epac の活性化は細胞死を亢進させた。分子メカニズムとして $Bc1-2$ の制御因子である Bim 発現の上昇が考えられた。ニコチン刺激による Epac 発現変化は短期刺激では減少だが、埋め込みポンプを用いた長期刺激では、必ずしも同様でない。また短期投与においても脳内部位によっても違いがみられた。「考察示唆」cAMP とニコチンシグナルの相互制御が存在するが、それを規定する重要な因子のひとつとしてアデニル酸シクラーゼの下流酵素である Epac が考えられた。Epac は神経細胞死の誘発因子として機能し、その発現にニコチンシグナルが関与する可能性が推測された。

1. 目的

cAMP シグナルは各種のホルモン信号伝達において G 蛋白共役型受容体の刺激を受けて活性化され、アデニル酸シクラーゼ酵素によって産生される物質であり、古典的な細胞内セカンドメッセンジャーとして知られる。一方で中枢においても神経伝達物質の細胞内シグナルの伝達に重要な役割を果たす。ニコチン受容体シグナルも中枢における重要な神経伝達機能を持つため、両者は自律神経シグナルという枠組みだけでなく、同時に多数の他のシグナル系に關与する多面性をもつ¹⁾。我々は、ニコチン受容体のシグナルが cAMP シグナルにどのように機能的に関連し、細胞機能、とりわけ細胞自体の生存性に関するかを、我々の開発した実験系・遺伝子操作モデルを用いて検討した。

従来の受容体・セカンドメッセンジャー研究は、受容体の下流シグナル(イオンチャンネルを含む)ないしセカンドメッセンジャーの標的酵素(各種キナーゼ)に焦点を当てるものが主流であった。我々は、受容体あるいはセカンドメッセンジャー産生酵素(アデニル酸シクラーゼ)に注目し、これらの分子間の相互制御は、サブタイプ特異的に起こるとの仮説を立てて検討をおこなってきた。ニコチン受容体は中枢においては $\alpha 2-9$ および $\beta 2-4$ よりなるヘテロトリメリックな 5 量体、あるいは $\alpha 7-9$ よりなるホモメリックな 5 量体などの多数のサブタイプが存在する²⁾。同様にアデニル酸シクラーゼにも 9 つに及ぶサブタイプが存在する。我々は各サブタイプの持つ意義を、サブタイプ特異的な制御薬、あるいは特定のサブタイプをノックアウトした動物モデルを使用して、その意義を検討してき

た^{3,4,5)}。これらの検討結果から、ニコチン受容体ないしアデニル酸シクラーゼの特定のサブタイプは(各々 $\alpha 7$ と6型)、物理的にも細胞膜表面上の特定ドメインに強い局在性を示し、お互いに活性調節をおこなっていることを明らかにしてきた⁶⁾。さらに最近の報告によれば、アデニル酸シクラーゼの下流標的として、旧来的なPKA以外にEpacと呼ばれるグアニンヌクレオチド交換因子が存在し、これが細胞生存性などの主要な細胞機能に重要な働きをしていることがわかり、先行研究ではEpacの発現が成長段階において変化することを報告してきた⁷⁾。

本申請ではこれらの仮説を実験動物および培養細胞系で実証することを目的とした。しかるに線条体においてはいわゆる線条体型アデニル酸シクラーゼ(5型酵素サブタイプ)をはじめとする主要蛋白の発現は、生後2週令以降にしか発現がみられず⁸⁾、このため実験系としては生後2週令以降のマウスより得られた線条体神経細胞の培養が必要であるが、いままでに線条体細胞の培養成功例は胎児のみである。そこで前回の助成を受けて成人マウスからの線条体神経細胞の培養系の確立を行い⁹⁾、その培養系を使用してcAMPシグナルとニコチンシグナルの機能関連を検討した。平成20年度は助成休止期間であったが、ニコチンおよびEpac研究¹⁰⁾を絶やすことなく続け、さらに平成21年度の助成を受けて、Epacが神経細胞死に果たす役割の分子メカニズムとニコチン刺激が及ぼす短期および長期効果の検討を行った。

2. 方法

1. 神経細胞におけるEpacと細胞死

培養神経細胞において、Epacシグナルによるアポトーシス誘導と下流のシグナル系の変化について検討した。cAMPアナログでPKAおよびEpacをそれぞれ選択的に刺激する化合物を用いた薬理学的手法や、Epacをアデノウイルスを用いて神経細胞に過大発現し細胞死に対する影響をみる遺伝子導入手法によって検討した。

2. 培養神経細胞におけるニコチン刺激とEpac発現変化

初代神経細胞培養および埋め込み式ミニポンプをもちいて、ニコチンの投与を培養細胞および個体レベルにおいておこない、Epac発現に対する効果を検討した。とくに様々な部位の神経細胞に対して細胞種特異性の検討もあわせて行った。

倫理面への配慮

DNAプラスミドなどバイオハザード類は、学内審査委員会の承認を受け、組み換えDNA実験指針および学内の安全基準にそって使用した。動物実験に当たっては、学内の審査委員会の承認を受け、そのガイドラインに従って動物実験を行っていった。

3. 結果

A. Epacの細胞死に対する効果

これまでの我々の研究結果から⁷⁾、Epacの発現は心臓と中枢にともに高度にみられる

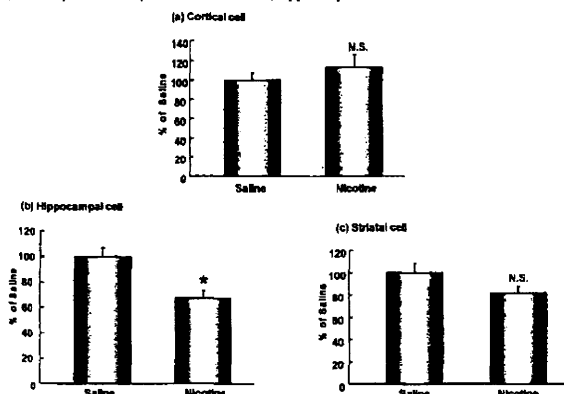
ことがわかっている。そこでE p a c 選択的なc AMPアナログを用いて、皮質および心筋培養細胞に対して刺激実験をおこなった。この結果から、E p a c 刺激は培養皮質細胞では細胞死を亢進させるが、培養心筋細胞では亢進させない。逆にPKA選択的なc AMPアナログを用いた場合は、心筋細胞で細胞死を亢進させるが、皮質細胞ではそのような効果がないことがわかった。そこでアデノウイルスにE p a c およびPKAを組み込み、同じく培養細胞においてE p a c およびPKAを過大発現させたところ、c AMPアナログを用いた薬物的な刺激効果と同様の結果が得られた。このことから、E p a c は神経細胞に選択的に細胞死を引き起こす可能性が示唆された。これは旧来的にいわれていたc AMPシグナルがPKAを介して神経細胞保護に働くことと異なるメカニズムの存在を意味する。

B. 神経細胞の生存性とE p a c 発現

E p a c はc AMPによって直接活性化されるグアニンヌクレオチド調節因子であり、RapなどのGTP結合蛋白質の活性を制御することが知られている¹⁰⁾。先行研究においてもE p a c 1を線条体細胞に過大発現すると、細胞死が顕著に亢進することを明らかにしている。そこで皮質細胞において同様の検討を行ったところ、やはり細胞死の亢進が見られた。このことはEpacは少なくとも線条体および皮質における神経細胞においては細胞死を増加させる作用を持つことを示唆する。

神経細胞の細胞死はB c l 2 蛋白によって制御されることが知られている。そこでE p a c による細胞死の制御メカニズムを検討するために、B i m と呼ばれるB c l 2 の制御蛋白質の変化を検討したところ、B i m の発現がE p a c を発現させた神経細胞で顕著に上昇していることが判明した。同様の効果はアデノウイルスによる遺伝子導入およびc AMPアナログによる選択的E p a c 刺激においても確認された。B i m はB c l 2 に結合し、B c l 2 による細胞死抑制効果を妨げるメカニズムが提唱されている。B i m が神経細胞に発現し、その発現をE p a c が亢進させるために、E p a c 過大発現によって神経細胞にのみ細胞死が起こるメカニズムが示唆された。一方で心筋ではB i m 自体の発現が無いため、E p a c による効果も見られない可能性がある。

Fig1. The expression of Epac1 mRNA in cortical, hippocampal and striatal cell simulated with nicotine.



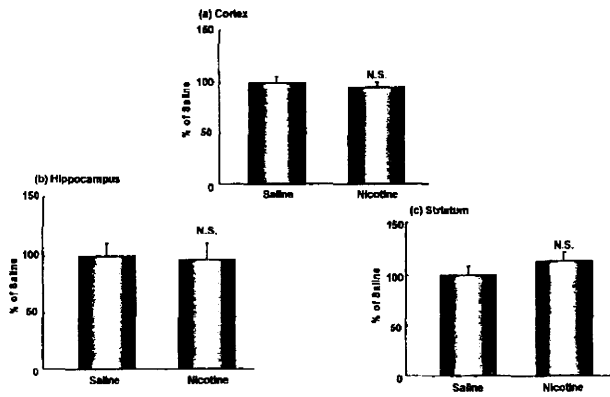
Method) 胎生16-18日のマウスの大脳皮質、線条体、海馬の樹状細胞層を培養7日に10μMのニコチンで4日飼育し、Epac1のmRNAをリアルタイムPCRにて測定した。N=4, *p<0.01, N.S. vs. Saline

Result) 海馬細胞においてのみニコチン刺激によりEpac1 mRNAの発現が減少した。

C. ニコチン刺激とEpac 発現

先行研究においてニコチンを培養神経細胞に4日間暴露させ、Epac 発現がどのように変化するかを検討したところ、とくに海馬を中心としてE p a c 1 の発現が低下することが示された。そこでニコチンを浸透圧ミニポンプに入れて12週令マウス皮下に植え込み(2.5 mg/kg/hr)、

Fig2. The expression of Epac1 mRNA in cortex, striatum and hippocampus from mice injected with nicotine.



Method) 12週齢の雄マウスに浸透圧ポンプを挿入し、2.5mg/kg/dayでニコチンを4週間投与(慢性投与)。大脳皮質、海馬、基底核線条体のEpac1 mRNAをリアルタイムPCRにて測定した。N=4, N.S. vs. Saline
Result) どの部位においてもEpac1の発現量に有意な差はなかった。また、体重変化においても顕微的な差は認められなかった。

4週間にわたって連続投与を行った。終了後に脳各部位からmRNAを抽出し、RT-PCRにて定量したが、Epac1発現に有意な変化はみられなかった。一方でPKA系のシグナルである活性化CREBの発現亢進が見られた。また、Aktおよびp38MAPKの発現亢進がみられた。

これらの結果から、ニコチン投与のEpac1に対する急性効果と慢性効果は異なる可能性が示唆され、さらに神経細胞種類によって

も異なる可能性が示唆された。ニコチンの急性投与によってEpac1発現が変化し、これが神経細胞の生存性制御に関与する可能性が示唆されたが、少なくともニコチンの慢性投与による保護作用には、Epac1発現の変化の関与は少ない可能性が考えられた。

4. 考察

我々の検討にて明らかになったように、Epac1はとりわけ神経細胞の生存性の制御には重要な役割を果たすことが考えられた。旧来はPKAを中心としたcAMPシグナルは神経細胞の生存性を亢進させることが知られていたが、近年になって発見されたEpac1系のシグナルが亢進すると、神経細胞の生存性はむしろ低下することが考えられた。このメカニズムとして、PKA系のシグナルではCREBをはじめとした転写調節系の関与が示唆されているが、Epac1系のシグナルではBcl2の結合蛋白質であるBim発現の制御が考えられた。少なくとも培養細胞から得られた結果では、Bim発現はmRNAおよび蛋白の両方のレベルで発現が亢進した。Bim発現は皮質系の神経細胞でとくに高い発現があることが知られているから、Epac1を介したBim発現制御は、神経細胞においては重要な役割を果たすことが考えられた。

また我々の研究結果から、ニコチン受容体刺激がEpac1発現を変化させることがわかっている。とりわけ培養神経細胞を用いた実験では、海馬神経細胞において3-4日のニコチンへの急性暴露によってEpac1発現が減少することが確認されている。しかるに浸透圧ミニポンプを用いて4週間の長期にわたって行われた慢性投与実験においては、ニコチン投与はEpac1発現を必ずしも減少をさせなかった。このことから、ニコチンの短期および長期投与のEpac1発現に及ぼす効果が異なる可能性が示唆された。この違いが、ニコチンの細胞機能制御に果たす役割とどのように関連するかが今後の検討課題である。

5. 引用文献

1. Khiroug L, Sokolova E, Giniatullin R, Afzalov R, Nistri A. Recovery from desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells is modulated by intracellular calcium through distinct second messengers. J. Neurosci.

18:2458-66 1998

2. Gotti C, Riganti L, Vailati S, Clementi F. Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery *Curr Pharm Des.* 12:407-28, 2006
3. Ishikawa Y: Isoform-targeted regulation of cardiac adenylyl cyclase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41; S1-S4, 2003
4. Iwatsubo K, Tsunematsu T, and Ishikawa Y. Isoform-specific regulation of adenylyl cyclase; a potential target in future pharmacotherapy *Expert Opinion on Therapeutic Targets,* 7;441-451, 2003
5. Ishikawa Y: A new paradigm in cAMP signal. *Cardiovascular Anesthesia Suppl.* 8; 62-65, 2004
6. Oshikawa J, Toya Y, Fujita T, Sakai I, Hashimoto Y, Kawabe J, Umemura S, and Ishikawa Y: Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 regulates cAMP signal via inhibiting a calcium-sensitive adenylyl cyclase isoform. *Am. J. Physiol.* 285:C567-C574, 2003
7. Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y-Z, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S, and Ishikawa Y: Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293; H1662-72, 2007
8. Iwamoto T, Iwatsubo K, Okumura S, Hashimoto Y, Tsunematsu H, Toya Y, Herve D, Umemura S, Ishikawa Y: Disruption of type 5 adenylyl cyclase negates the developmental increase in Golf expression in the striatum. *FEBS Lett.* 564; 153-156, 2004
9. Iwatsubo K, Suzuki S, Li C, Tsunematsu T, Nakamura F, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Toya Y, Umemura S, and Ishikawa Y: Dopamine induces apoptosis in young, but not in neonatal, neurons via Ca²⁺-dependent signal. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293:C1498-508, 2007
10. Bos JL. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci.* 12:680-6, 2006

6. 発表

1. O Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y and Minamisawa S: T-type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J. Biol. Chem.* (2009) 284:24025-34
2. O Sato M, Honda T, Jiao Q, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Lanier SM, and Ishikawa Y: An involvement of activator of G protein signaling 8 on hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes and its interaction with connexin 43. *J. Biol. Chem.* (2009) 284:31431-40
3. O Kheirbek M, Britt J, Beeler J, Ishikawa Y, McGehee D, and Zhuang X: Adenylyl cyclase type 5 is critical for corticostriatal plasticity and striatum-dependent learning. *J. Neurosci.* (2009) 29:12115-24
4. Jiao Q, Bai Y, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, and Minamisawa S: Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2009) 297; H576-82
5. Hu CL, Chandra R, Ge H, Pain J, Yan L, Babu G, DePre C, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Sadoshima J, Vatner SF, Vatner DE. Adenylyl Cyclase Type 5 Protein Expression during Cardiac Development and Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2009) 297:H1776-82
6. Baljinnyam E, Iwatsubo K, Kurotani R, Wang X, Ulucan C, Iwatsubo M, Lagunoff D and Ishikawa Y. Epac Increases Melanoma cell migration by Heparan Sulfate-Related Mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2009) 297:C802-13
7. Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S,

- Minamisawa S, Okumura S, and Ishikawa Y: Caveolin gene transfer improves glucose metabolisms in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2009) 298(3):C450-6
8. Mann L, Heldman E, Bersudsky Y, Almog O, Belmaker RH, Ishikawa Y, Vatner SF, and Agam G. Inhibition of specific adenylyl cyclase isoforms by mood stabilizers may be related to their mechanism of action. *Bipolar Disorders* (2009) 11:885-96
 9. Ebina T, Ishikawa Y, Uchida K, Suzuki S, Imoto K, Okuda J, Tsukahara K, Hibi K, Kosuge M, Sumita S, Mochida Y, Ishikawa T, Uchino K, Umemura S, and Kimura K: A case of giant coronary aneurysm and literature review. *J. Cardiol.* (2009) 53; 293-300
 10. Okumura S, Suzuki S, and Ishikawa Y: Effect of targeted disruption of type 5 adenylyl cyclase gene. *J. Pharmacol. Sci.* (2009) 109:354-9
 11. Sato M and Ishikawa Y: Accessory proteins for heterotrimeric G protein: Implication in the cardiovascular system. *Pathophysiology* in press
 12. Shimada C, Kurotani R, Fukumura H, Ono S, Eguchi H, and Ishikawa Y: Drug Delivery System Using Magnetic Materials. *Jap J Pathophysiology* in press

7. 英文アブストラクト

cAMP and nicotinic receptors

Yoshihiro ISHIKAWA, Sayaka SUZUKI, Motohiko SATO, Satoshi OKUMURA, Utako YOKOYAMA, Kousaku IWATSUBO

Department of Physiology, Yokohama City University Graduate School of Medicine

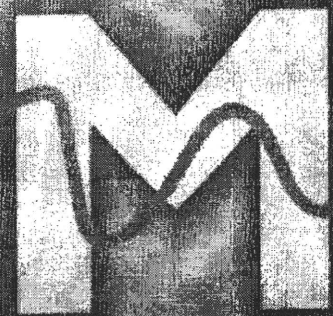
We examined the role of nicotinic receptor stimulation in regulating Epac expression and the role of Epac in regulating neuronal cell apoptosis. We found that overexpression of Epac increased the number of apoptotic cells in cultured neuronal cells, but not in cardiac cells. In contrast, overexpression of PKA increased apoptosis in cardiac cells, but not in neuronal cells. These findings suggest that the role of Epac is different from that of PKA in regulating cell apoptosis between neuronal and cardiac cells although both Epac and PKA are activated by cAMP. Molecular mechanism of inducing apoptosis in neuronal cells was found to increase the expression of Bim, which is a molecule upstream of Bcl2, binding and preventing Bcl2 from exerting its anti-apoptotic effect. We also found that acute nicotinic administration in cultured neuronal cells decreased Epac expression while chronic administration had no changes in neuronal Epac expression. These findings suggest the role of nicotine in regulating Epac expression differs between acute and chronic settings. Nevertheless, nicotine receptor stimulation can regulate the expression of Epac in neuronal cells, which is an important regulator of cellular apoptosis in neurons.

会報23号

2010年7月発行

磁気と健康

Information
on The
Magnetic
Health Science
Foundation



財団法人 磁気健康科学研究振興財団

磁性体を利用した薬剤送達法

黒谷 玲子 横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学
福村 英信 横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・横浜市立大学大学院医学研究科運動器病態学
佐藤 悟 横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・横浜市立大学大学院医学研究科顎顔面口腔機能制御学
江口 晴樹 横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・(株)HHI
石川 義弘 横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・Cardiovascular Research Institute,
Department of Cell Biology & Molecular Medicine and Medicine (Cardiology), New
Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey

1.はじめに

我々は病気になると、病院へ行きお薬を飲んで健康を取り戻す。しかし、体調を崩している時に飲むお薬は、お薬の効果だけでなく、気分が悪くなったりする副作用も持ち合わせている。そこで、生体内で薬剤を必要な時に必要な場所に届けることができれば、必要な場所での薬剤濃度を高くすることができ、投薬量を減らすことにつながり、薬剤によって引き起こされる副作用の軽減につながると考えられてきた。このようなシステムを薬剤送達法(ドラッグデリバリーシステム、DDS)という。我々は、中でも磁性体と磁場を利用した薬剤送達法に注目し、新しい磁性体の探索とその応用を目指している。

現在我々が研究している癌治療法は、主に、外科療法、化学療法、放射線療法があり、それぞれ単独、もしくは併用されている。しかしながら、どの治療法を選択しても、悪心、嘔吐、食欲不振、下痢、脱毛、肝機能障害などの種々の副作用が伴ってしまう問題がある^[1-5]。そこで、この副作用の問題を解決するために、30年以上も前から、多くの研究者が必要な時に必要な場所に薬剤を届けることができる薬剤送達法の開発に取り組んでいる。ここでは、我々が現在目指している磁性体と磁場を利用した薬剤送達法の開発の観点から、他の薬剤送達法についてご紹介したい。

2.薬剤送達法(ドラッグデリバリーシステム、DDS)

薬剤送達法は、安全に標的とする器官、組織、細胞で薬剤の効果を発揮させるために開発されてきた。薬剤送達法は、1)標的・特異的薬剤送達法、2)放出制御薬剤送達法、3)吸収法の大きく3種に分類される。特に標的・特異的薬剤送達法は、標的とする器官、組織、および細胞に薬剤を送達する方法であり、正常細胞に与える薬剤の副作用の大幅な軽減が期待される。近年、新たな構造、物質、及び装置を生成するために、大きさが1~100ナノメートル(nm)の物質を理解し制御する技術であるナノテクノロジーとバイオテクノロジーが結びついたナノバイオテクノロジーの分野でもナノテクノロジーを生かした新しい薬剤の開発や薬剤送達法の開発が行われている。主なナノ材料として、①リポソーム^[6]、②高分子ミセル、③デンドリマー、④水溶性高分子、⑤ナノゲル、⑥エマルジョン、⑦マイクロスフェア^[7]などが開発されている。これらを利用し、生きた細胞をナノレベルで操作したり、ナノ材料を生物に導入して制御する研究が行われている。なかでも、興味深い方法の一つとしてリポソームを利用した標的・特異的薬剤送達法が注目されている^[8,9]。

リポソームは、脂質2重膜で構成されているため、疎水性および親水性の両方の薬剤をリポソーム内に含有できるだけでなく、リポソーム表面に特異抗体、リガンド、ポリマーなどを修飾可能である[図1]^[10-13]。

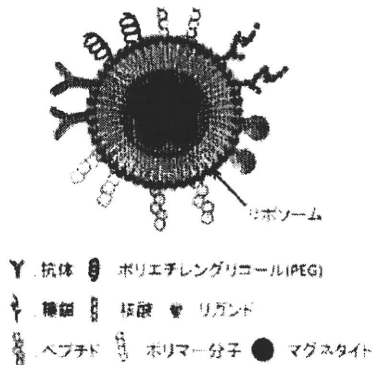
また、アルブミンに抗がん剤ハクリキタセル(微小管重合を促進することにより複製を抑制する薬剤)を結合させ、ナノ粒子化したアブラキサンという薬剤は、水溶性を持ち、ハクリキタセル単体よりも高い抗腫瘍効果を示したことで、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration, FDA)で、はじめての化学療法用のナノ粒子として認可された^[14]。

一方、磁性体を利用した薬剤送達法は、1970年代には開発され始め^[15]、酸化鉄(マグネタイト、 Fe_3O_4)とドキソルピシンという薬剤を含有したアルブミン粒子を水欠磁石で肉腫(腫瘍)に集めることにより、効果的な腫瘍縮小が認められている。1980年代になって、マグネタイトを含有したリポソーム(磁性体マグネタイト)を動物生体内で集める研究がされるようになった。さらに、1990年代前後からマグネタイトを動物

に投与し、交流磁場を印加することで抗腫瘍効果を発揮させる温熱療法に関して報告されるようになった¹⁷⁾。また、1980年代にはマグネタイトの核磁気共鳴画像法(MRI)の画像診断用の造影剤として使用できることが報告され^{17),18)}、現在も臨床で使用されている。研究者のなかには、マグネタイトが長期間、患者の体内にとどまっても鉄イオンとして溶け出るだけで、鉄分は栄養素であるから安全であるとする者もいる。ニッケルやコバルトなども磁性体であるが、安全性を考えると使いにくいいため、マグネタイトは、薬ではないが毒性が低いと考えられ、新しい治療法の素材として注目されてきた。

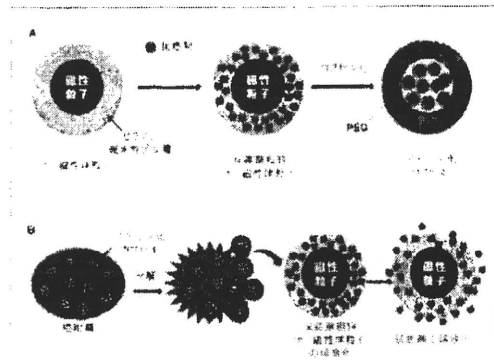
さらに、最近の報告では、薬剤とナノ磁性体粒子を含有した新しいステルス化カプセルが開発されている。これは、ナノ磁性体粒子表面を親水性のゲル層(ハイドロゲル層)で覆い、ゲル層に抗癌剤を含有させた抗癌剤担持ナノ磁性粒子を作成後、この抗癌剤担持ナノ磁性粒子を多数含ませ、最終的に表面にポリエチレングリコール(PEG)を付加したカプセルである。このカプセル化によって抗癌剤を磁石で標的部に送達可能にする新たな材料となった。このカプセルは、ナノ磁性体粒子表面をゼラチンによって親水性ゲル層を作成すること、PEGをカプセル表面に付加することで、ステルス化されているが^[図2]、ゼラチンやPEGは、既に臨床応用されている安全な材料である。このカプセルと磁場の利用によって血管分岐部でナノ磁性体粒子を目的方向へ誘導し薬物を集積させ、このカプセルの集積をMRIで確認することで薬剤投与量の減量と副作用の軽減を同時に達成することを目標とした研究がなされている¹⁹⁾。

【図1】薬剤送達に利用されるリボソーム



リボソーム表面には、抗体、PEG、糖鎖、核酸など多種のプロープを修飾可能である。また、リボソーム内にマグネタイトを含有させることで磁性化可能である。

【図2】抗癌剤を担持したナノ磁性体親水性ゲル粒子を含むステルス化カプセル



A. 抗癌剤担持ナノ磁性粒子作成とステルス化カプセル作成過程
 B. 癌組織に送達された後に起こる抗癌剤担持ナノ磁性粒子の徐放化と抗癌剤の徐放化

ここで使用されているゼラチンは、反応性官能基を数多く持ち、親水性ゲル状の生理活性物質・低分子薬物の徐放キャリアとして放出制御薬剤送達法に有用な材料である。すなわち、抗がん剤担持ナノ磁性体親水性ゲル粒子を含むステルス化カプセルを、磁場誘導により標的である癌組織に送達・集積させた後、PEGで覆われた生体吸収性のカプセルを加水分解により崩壊させることで、カプセル内部の抗がん剤担持ナノ磁性体から抗癌剤を徐放させることが可能である^{20,21)}。さらに、取束超音波照射、磁場誘導、電磁波などの外部エネルギーをがん部位に照射させることによって、ステルス化カプセルの崩壊を促進させ、より選択的に癌組織で薬剤担持ナノ磁性体粒子から薬剤を徐放化させるシステムが構築されてきている。この試みにより、磁気誘導および集積によるステルス化カプセルの“癌”ターゲティング(空間的制御)およびステルス化カプセルからの徐放化(時間的制御)を同時に制御できると期待されている^{22,24)}。

また、放出制御薬剤送達法には、決まった温度で水に対する溶解性を変化させる刺激応答型の高分子である温度応答性高分子材料の研究と利用が盛んに行われている。代表的なものに、ポリ-N-アルキルアクリルアミド²⁵⁾やポリエチレングリコール・ポリプロピレングリコールブロック共重合体²⁶⁾などがある。これらの材料を利用した温度応答性ゲルを応用し、疾患によって特異的に変化する化学的な刺激に応じて薬剤放出を制御するシステムが研究されている。すなわち、決まった刺激に応じて薬物を放出し、回復を検知したら、直ちに薬物放出を停止させるオートフィードバック機能を備えたシステムが研究されている。同時に、デバイスの開発も行われ、温度応答性ゲルを用いた体温近傍での微小温度変化による薬物放出の

オン・オフ制御システムとして、とくにポリ共重合三次元架橋ゲルを利用した温度変化に应答した膨潤-収縮変化に伴う薬物放出を可能にしている²⁷⁾。最近では、分解性のポリマーで構成された内核を持つ温度应答高分子ミセル型キャリアを設計し、体温以上の温度(40℃)でのみ薬物放出を促進することに成功している²⁸⁾。

吸収法の薬剤送達システムとしては、スキンパッチや埋め込み型のポンプなどが開発され、使用されている。経皮吸収システムでは、肝臓や消化管での初回通過効果を回避できること、緩徐に長時間にわたって吸収されるため貼付している間は安定した血中濃度を維持できること、副作用発現時に応じて投与が中止可能であることなどの利点がある^{29),30)}。

3.最後に

近年の高分子化学やナノテクノロジーの進展は、特異性の高い標的化薬剤送達を可能とし、分子・細胞イメージング全般に大きな貢献が期待されている。たとえば、樹状に枝分かれした巨大分子であるテンドリマー、3次元全ての方向から電子を閉じ込めた量子ドット、多数の炭素原子で構成されるクラスターであるフラーレン、生体膜に類似のリボソームなどは、個別化医療、高精度な標的化治療などへの利用が期待されている。

我々は、化合物自体が細胞傷害性のような生物学的な特徴を有する新規磁性体の同定を試み、単剤で細胞傷害性と磁性を有する化合物を磁石で腫瘍内に送達させる抗癌剤送達法の開発に取り組んでいる。将来的には我々が開発中の磁性薬剤と磁場を利用した薬剤送達法が臨床で応用され、副作用の軽減につながることを期待し、日々の研究に取り組んでいる。

4.Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare and New Energy and Industrial Technology Department Organization (NEDO) of Japan and the Magnetic Health Science Foundation.

参考文献

- (1) Recht A, Come SE, Gelman RS, Goldstein M, Tishler S, Gore SM, Abner AL, Vicini FA, Silver B, Connolly JL, Schnitt SJ, Coleman CN, Harris JR. Integration of conservative surgery, radiotherapy, and chemotherapy for the treatment of early-stage, node-positive breast cancer: sequencing, timing, and outcome. *J Clin Oncol*. 9 (9) : 1662-7. 1991
- (2) Schnell FM. Chemotherapy-induced nausea and vomiting : the importance of acute antiemetic control. *Oncologist*. 8 (2) : 187-98. 2003
- (3) Morse MA. Supportive care in the management of colon cancer. *Support Cancer Ther*. 3 (3) : 158-70. 2006
- (4) Zidan J, Haim N, Beny A, Stein M, Gez E, Kuten A. Octreotide in the treatment of severe chemotherapy-induced diarrhea. *Ann Oncol*. 12 : 227-9. 2001
- (5) Kornek GV, Ulrich-Pur H, Penz M, Haider K, Kwasny W, Depisch D, Kovats E, Lang F, Schneeweiss B, Scheithauer W. Treatment of advanced breast cancer with vinorelbine and docetaxel with or without human granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol*. 19 (3) : 621-7. 2001
- (6) Kiwada H, Sato J, Yamada S, Kato Y. Feasibility of magnetic liposomes as a targeting device for drugs. *Chem Pharm Bull*. 34 (10) : 4253-8. 1986
- (7) Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Nanomedicine for drug delivery and imaging a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int J Cancer* 120: 2527-2537. 2007.
- (8) Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnology for molecular imaging and targeted therapy. *Circulation* 107: 1092-1095. 2003

- (9) Farokhzad OC, Langer R : Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 1456-1459,20068. McBain SC, Yiu HH, Dobson J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int J Nanomedicine*, 3 (2) : 169-80, 2008
- (10) Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lübke AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res*, 60 (23) :6611-8, 2001
- (11) Cheong I, Huang X, Thornton K, Diaz LA Jr, Zhou S. Targeting cancer with bugs and liposomes : Ready, Aim, Fire. *Cancer Res*, 67 (20) : 9605-8, 2007
- (12) Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Review*, 4 : 145-60, 2005
- (13) Chowdary KP, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*, 27 (11) : 1717-24, 2004.
- (14) Widder KJ, Morris RM, Poore G, Howard DP Jr, Senyei AE. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci*, 78 (1) : 579-81, 1981
- (15) Gradishar WJ:Albumin-bound paclitaxel : a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother* 7 : 1041-1053,2006
- (16) Wada S, Yue L, Tazawa K, Furuta I, Nagae H, Takemori S, Minamimura T. New local hyperthermia using dextran magnetite complex (DM) for oral cavity : experimental study in normal hamster tongue. *Oral Dis*, 7(3):192-195, 2001
- (17) Renshaw PF, Owen CS, McLaughlin AC, Frey TG, Leigh JS Jr. Ferromagnetic contrast agents: a new approach. *Magn Reson Med*, 3(2):217-225,1986.
- (18) Mendonca Dias MH, Lauterbur PC. Ferromagnetic particles as contrast agents for magnetic resonance imaging of liver and spleen. *Magn Reson Med*, 3(2):328-330, 1986
- (19) Wang G, Tucker JG, Roberts MS, Hirst LW. In vitro and in vivo evaluation in rabbits of a controlled release 5-fluorouracil subconjunctival implant based on poly (D,L-lactide-co-glyco-lide). *Pharm Res*, 13 (7) : 1059-64, 1996
- (20) El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin : from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, 34 : 203-22, 2008
- (21) Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discov Today*, 12 : 1061-7, 2007
- (22) Yie W, Chien : New developments in drug delivery systems. *Med Res Rev*, 10 (4) : 477-504, 1990
- (23) Widera G, Johnson J, Kim L, Libiran L, Nyam K, Daddona PE, Cormier M. Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine*, 24 : 1653-64, 2005
- (24) Jun-ichiro Jo, Fumito Mishima , Shin-ichi Takeda , Masaya Yamamoto , Yoshihiro Muragaki-Hiroshi Iseki , Norihide Saho , Jun Kubota-Akira Sasaki , Shigehiro Nishijima , Yasuhiko Tabata. *Drug Delivery System* 22-5, 2007
- (25) Bae YH, Okano T, Kim SW :Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N-alkyl substituted acryl-amide) in water. *J Polym Sci Part B : Polym Phys* 28:923-936,1990
- (26) Schmolka IR : Artificial skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res* 6 : 571-582,1972.
- (27) Hoffman AS : Applications of Thermally reversible poly-mers and hydrogels in therapeutics and diagnostics. *J Control Release* 6 : 297-305,1987.
- (28) Nakayama M, Okano T, Miyazaki T, Kohori F, Sakai K, Yokoyama M. Molecular design of biodegradable polymeric micelles for temperature-responsive drug release.
- (29) 杉林聖次 森本雍志 : 経皮吸収システム(TTS). *日本臨床*56:619-627,1998
- (30) 杉林聖次 : 薬物の経皮系粘膜吸収 - Overview. *Drug Delivery System* 15 : 492-498,2000

研究事業名：医療技術実用化総合研究事業
研究課題名「高齢者に向けた心不全治療薬の開発」
所属機関 横浜市立大学
研究代表者 石川義弘

研究目的：

心不全はすべての心臓病の末期像であり、我が国民の3大死因のひとつである。心不全治療の世界標準指針は慢性的に亢進した交感神経活動の抑制であり、レニンアンギオテンシン系阻害剤とベータアドレナリン受容体遮断薬（ベータ遮断薬）はその代表薬として使用されている。然るにベータ遮断薬導入に当たっての最大の副作用は一過性の心機能抑制であり、とくに高齢者には大きな妨げとなる。さらに呼吸機能抑制もあり、肺気腫などの合併症の多い高齢者では大きな問題である。

ベータアドレナリン受容体の働きは細胞内アデニル酸シクラーゼ酵素を活性化し、細胞内cAMP濃度を高めて心機能を調節することであり、ベータ遮断薬の薬理効果はアデニル酸シクラーゼ活性の抑制に他ならない。ベータ遮断薬による呼吸機能抑制の本質は、肺気管支にもベータアドレナリン受容体が発現するため、ベータ遮断薬によって気管支の収縮が起こることである。ベータアドレナリン受容体は3つのサブタイプしかないが、アデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、心臓型とよばれるサブタイプ(5型)は心臓に特異的に発現する。従って心臓型アデニル酸シクラーゼを選択的に阻害することが出来れば、呼吸器抑制を起さずにベータ遮断薬と同等の心不全治療ができるはずである。

これまでの我々の遺伝子操作動物や薬理実験結果から、心臓型サブタイプを抑制した動物では、定常状態の心機能低下はないが、心不全など様々な病態生理下では心筋保護作用を示すことがわかった。さらに80万種類以上の薬剤をコンピュータモデルにて検討した結果、心臓型サブタイプを選択的に抑制できる化合物が複数同定された。これには市販の抗ヘルペス剤の一部を含み、これまでの研究でも抗ヘルペス剤の心不全予防効果が確認されている。本研究は学際的プロジェクトであり、心臓型サブタイプの選択的な抑制剤を、高齢者にも安心して使える心不全治療薬として開発することを目的とする。

方法および結果：

心不全治療薬への臨床開発を目的として、マウス慢性カテコラミン負荷および心筋梗塞モデルを使用して、平成21年度に続いて抗ヘルペス薬による心筋保護効果を検討した。本年度は、とくに既存のベータ遮断剤と比較しての作用分子メカニズムの検討を行った。一般にベータ遮断薬ではMEKシグナルの活性化は見られないが、抗ヘルペス剤においては心筋細胞のMEKシグナルの顕著な亢進が見られ、これが本薬剤の心筋保護効果に重要な役割を果たすことが考えられた。なお本発見は平成22年度11月のアメリカ心臓協会年次集会上においてMarcus賞の最終候補論文として発表された。また我々は抗ヘルペス剤のヒト臨床試験を念頭に、大型動物(イヌ)における治療効果を検討するべく、ペーシング誘発性心不全モデルにおける心機能保護効果を検証している。

さらに我々は抗ヘルペス剤の基本骨格を基として、改良型抗ヘルペス剤の開発を行った。既存の抗ヘルペス剤は脂溶性が強いため中枢神経系への副作用がありうる。したがって水溶性が高くかつ既存の抗ヘルペス剤と同等の心臓型サブタイプ選択的抑制作用を持つ薬剤は心臓に対する治療効果が高いと予測された。そこで新規化合物の設計と合成を行い、複数種の水溶性化合物の開発に成功した。心筋組織のアデニル酸シクラーゼ活性に対する新規誘導体の抑制効果は既存の抗ヘルペス剤と同等であり、さらに慢性カテコラミン刺激心不全動物において、既存の抗ヘルペス剤と同等の心筋細胞死抑制効果を示すことを見出した。以上の基礎薬理データから新規誘導体は心不全抑制薬としての有用性が確認され、特許申請を行った。

考察：

心臓型サブタイプの抑制による心筋保護効果は、遺伝子操作モデルおよび薬剤による抑制の両手法で確認されている。さらに本年の研究では既存のベータ遮断剤と異なるメカニズムを有することが示された。次年度は大型動物における心不全治療効果について検討していく予定であり、医師主導型の臨床試験の開始を念頭に検討を進めていく。さらに我々

は、中枢への移行を減少させた新規化合物の合成に成功した。新規化合物は既存の抗ヘルペス剤と同等のアデニル酸シクラーゼ抑制効果および心筋保護作用を示すことがわかっている。かつて鎮痛解熱薬として開発されたアスピリンに血小板凝集抑制作用がみつき、現在では抗血栓剤として使用されているように、かつてはヘルペス治療薬として開発された薬が心不全治療薬となるかもしれない。

代表監修 中澤 誠 財団法人脳神経疾患研究所附属総合東北病院小児・生涯心臓血管病態研究所所長

監修 横山 詩子 横浜国立大学医学部 循環器内科学助教授

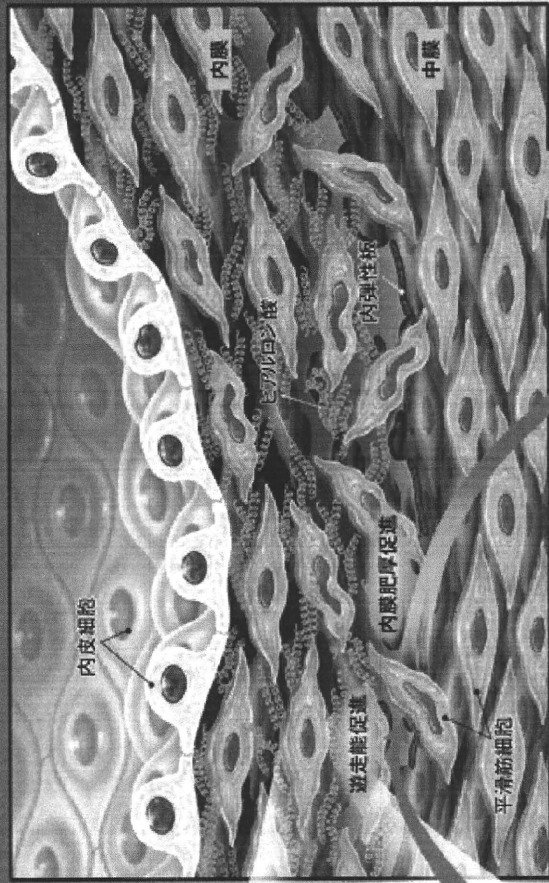
南沢 享 早稲田大学先端理工学部生命医科学専攻教授

総括コメント

出生による胎内生理から胎外生理への移行での適応障害は、生命を脅かす。ここでは循環系の移行について、①胎盤循環停止と心臓血管相互作用からみた循環適応とその異常を解説、②肺血管の生理的発生と基礎と、出生後適応および肺高血圧について基礎病態をPPHNとの関連で解説、③動脈管の成熟と出生後の閉鎖機転の基礎を分子生物学的に説明、その病態を示す。臨床医は、これらの基礎を踏まえてそれぞれに正確を得た適正な対応ないし治療を行うことが必要である。

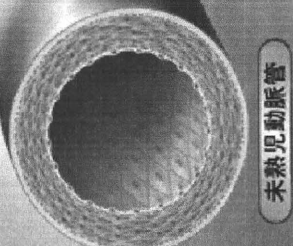
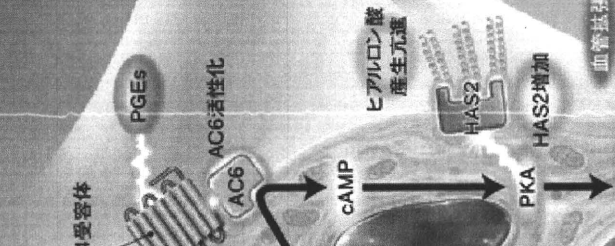
(財団法人脳神経疾患研究所附属総合東北病院小児・生涯心臓血管病態研究所所長 中澤 誠)

動脈管の胎生期における成熟



動脈管平滑筋細胞

- PGE: プロスタグランジンE
- EP4: PGE受容体EP4サブタイプ
- ATP: アデニン3リン酸
- AC6: アドニル酸シクラーゼ6型
- cAMP: 環状アデニン1リン酸
- PKA: cAMP依存性リン酸化酵素
- HAS2: ヒアルロン酸合成酵素2型
- MLCK: ミオシン軽鎖キナーゼ

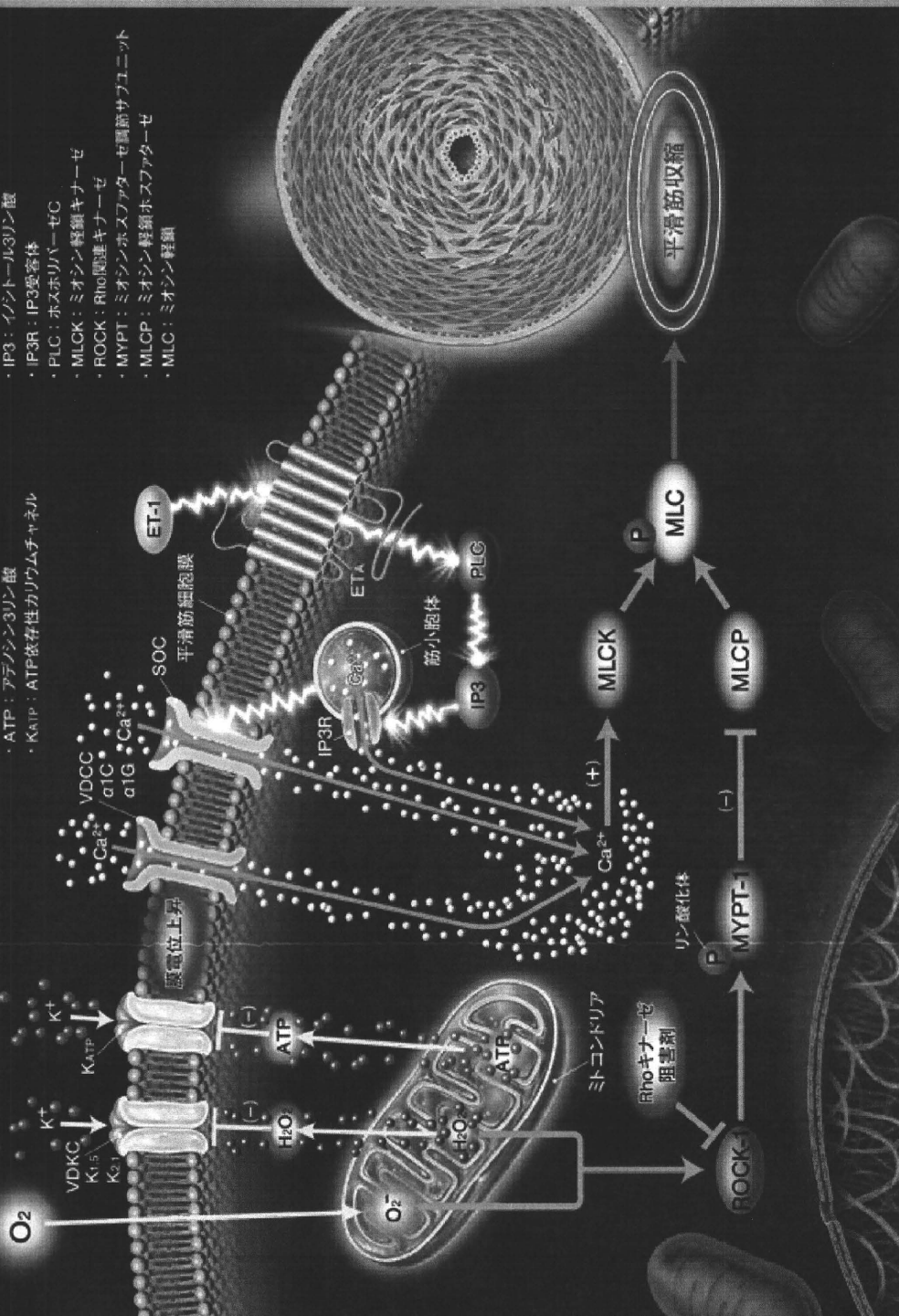


動脈管の胎生期における成熟

動脈管閉鎖の機序は①胎生期から始まる血管組織の構築の変化—血管リモデリングと、②出生後の血管収縮とリモデリングの完成の2つが重要である。出生後の速やかな血管収縮のために、動脈管には平滑筋ミオシン重鎖アイソフォームSM2など胎生期には少ない成熟型の収縮イレメントが発現している。また胎生期から起こる構造変化の代表は動脈管内膜肥厚であり、すでに胎生後期より動脈管内腔の狭小化が生じており、未熟児の動脈管や先天性動脈管閉塞患者では、内膜肥厚の形成が不十分であることが報告されている。内膜肥厚には、動脈管平滑筋細胞の増殖と内膜への遊走、ヒアルロン酸をはじめとする細胞外基質の増加、断片化したエラスチン繊維による内弾性板の分断など多くの現象が複合的に関与している。プロスタグランジンE (PGE)は動脈管平滑筋細胞膜上にあるPGE受容体の1つであるEP4を刺激することでアドニル酸シクラーゼ6型 (AC6)を活性化させ、環状アデニン1リン酸 (cAMP)を産生する。産生されたcAMPはcAMP依存性リン酸化酵素 (PKA)の活性化を介してヒアルロン酸合成酵素2型 (HAS2)の発現を増加させ、ヒアルロン酸産生を亢進させる。ヒアルロン酸産生が亢進すると、それに伴い動脈管平滑筋細胞の遊走能が促進され、内膜肥厚形成が促される。内膜肥厚部位にはフィブロネクチンなどの接着因子も多く発現し、さらに動脈管平滑筋細胞の遊走を促進し、内膜肥厚形成を促す。つまりPGE-EP4シグナルは胎生期に血管を拡張させる一方、内膜肥厚を誘導し生後の閉鎖に向けた準備をしていると考えられる。

動脈管の出生後における収縮

- ・ K⁺: カリウムイオン
- ・ Ca²⁺: カルシウムイオン
- ・ O₂: 酸素
- ・ O₂: 活性酸素スーパーオキシドアニオン
- ・ H₂O₂: 過酸化水素
- ・ ATP: アデノシン3リン酸
- ・ K_{ATP}: ATP依存性カリウムチャネル



- ・ VDKC: 膜電位依存性カリウムイオンチャネル (K_{1.5}, K_{2.1}はそのアイソフォーム)
- ・ VDCC: 膜電位依存性カルシウムイオンチャネル (α1C, α1Gはそのアイソフォーム)
- ・ SOC: store-operated Ca²⁺ channel
- ・ IP3: イノシトール3リン酸
- ・ IP3R: IP3受容体
- ・ PLC: ホスホリパーゼC
- ・ MLCK: ミオシン軽鎖キナーゼ
- ・ ROCK: Rho関連キナーゼ
- ・ MYPT: ミオシンホスファターゼ調節サブユニット
- ・ MLCP: ミオシン軽鎖ホスファターゼ
- ・ MLC: ミオシン軽鎖

動脈管の出生後における収縮

胎生後期に血管構築の変化を促した動脈管は、後に速やかに閉鎖に向かう。血管収縮(機能的閉鎖)の機序は、①酸素分圧の上昇、②胎盤由来のPGE₂、PGE₁の減少と胎での分解促進、③PGE₂受容体の減少、④動脈管内の血圧低下が主な要素と考えられる。その後さらに血管組織のリモデリングが生じて、血管内腔面が閉塞し、血流が遮断され、最終的には索状の線維性組織へと変化する(解剖学的閉鎖)。酸素によりミトコンドリアでのH₂O₂産生が増加し、膜電位依存性カリウムイオンチャネル(VDKC)が不活化し膜電位が上昇(脱分極)する。引き続き膜電位依存性L型、T型カルシウムチャネルが開閉し、細胞内カルシウム濃度が上昇し、ミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化を介して血管収縮が起こる。ATP依存性カリウムチャネル(K_{ATP})も酸素により抑制され、膜電位上昇に寄与するとの報告や、酸素により小胞体IP₃-sensitive storeから放出されたカルシウムがトリガーとなり、store-operated Ca²⁺ channel(SOC)を介するカルシウム流入が増加し、動脈管が収縮することも報告されている。また酸素はRho関連キナーゼ(ROCK)を介してミオシンホスファターゼ調節サブユニット(MYPT)のリン酸化を亢進させることで最終的にMLCのリン酸化を増強させ血管収縮に導くことも知られている。

文献

- 1) Yokoyama U, Minamisawa S, Quana H, et al: Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 116: 3026-3034, 2006
- 2) Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y: Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res* 46: 77-87, 2010
- 3) Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, et al: Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res* 106: 1882-1892, 2010
- 4) Akaike T, Jia MH, Yokoyama U, et al: Type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J Biol Chem* 284: 24025-24034, 2009
- 5) Kajimoto H, Hashimoto K, Bennett SN, et al: Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoG and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing metalloproteinase-derived reactive oxygen species: a newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. *Circulation* 115: 1777-1788, 2007