

マウスにおける心筋梗塞モデルでは5型阻害薬の投与によって生存率の顕著な上昇と心機能維持および心筋細胞死の低下がみられている。

おわりに

心不全の病態生理の理解は過去数十年で飛躍的に進歩したにもかかわらず、人類の最大死因のひとつであることは変わらない。アメリカにおいてもいまだにDRGにおける最多疾患を占めている。心不全の克服はすべての循環器専門医の目標であるといっても過言ではないであろう。さまざまな心不全治療薬がこれまでに開発されてきており、新しい治療薬の使用開始と同時に心不全の病態生理の理解も進んできている。アデニル酸シクラーゼ阻害薬がどのような心不全治療薬となるのかは未知数であるが、心不全のさらなる理解と克服の一助となることを願ってやまない。

文献

- 1) Pierre, S. et al. : *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8** : 321-335, 2009.
- 2) Ishikawa, Y. et al. : *Circ. Res.*, **80** : 297-304, 1997.
- 3) Sun, B. et al. : *Cell. Signal.*, **19** : 1765-1771, 2007.
- 4) Ishikawa, Y. et al. : *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **41** : S1-S4, 2003.
- 5) Okumura, S. et al. : *Circ. Res.*, **93** : 364-371, 2003.
- 6) Okumura, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 9986-9990, 2003.
- 7) Yan, L. et al. : *Cell*, **130** : 247-258, 2007.
- 8) Toya, Y. et al. : *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **30** : 97-108, 1997.
- 9) Eguchi, H. et al. : *Lett. Drug Des. Discov.*, **4** : 434-441, 2007.
- 10) Iwatsubo, K. et al. : *J. Biol. Chem.*, **279** : 40938-40945, 2004.
- 11) Onda, T. et al. : *J. Biol. Chem.*, **276** : 47785-47793, 2001.
- 12) Iwatsubo, K. et al. : *Expert Opin. Ther. Targets*, **7** : 441-451, 2003.

* * *

平成 2 1 年 度

厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業
医療技術実用化総合研究：基礎研究成果の臨床応用推進研究

トランスレーショナル研究成果発表会 要 旨 集

日時：平成 2 2 年 2 月 2 3 日（火） 1 3 時 3 0 分～1 7 時 0 5 分
場所：財団法人 がん研究振興財団 国際研究交流会館

主催：財団法人 医療機器センター

高齢者に向けた心不全治療薬の開発

研究代表者：横浜市立大学 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。然るにベータ遮断剤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、呼吸器抑制を起こさずにベータ遮断剤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欠損させた動物では、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むしろ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。これには市販の抗ウイルス剤の一部を含む。

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

我々の同定した心臓型サブタイプ阻害剤の個体レベルでの効果を、心臓型サブタイプ遺伝子操作動物において検討した。同阻害剤のイソプロテレノール刺激状態での心機能抑制効果は、野生種では認められないが、心臓型サブタイプ過大発現マウスでは高度であり、またPDE阻害剤に対する反応性は不変であったことから、同阻害剤の生体での作用点は、心臓型アデニル酸シクラーゼ酵素であることが確認された。さらに慢性カテコラミン負荷モデルにおいて、同阻害剤の効果を、既存の標準薬であるメトプロロール（ベータ遮断剤）と比較検討した。両薬の導入において、メトプロロールは心機能を有意に低下させたのに比較して、同阻害剤による心機能低下はみられなかった。また3週間のカテコラミン負荷によって、コントロール群では心筋肥大とともに心機能の顕著な低下がみられたが、メトプロロール群および同阻害剤群では心機能の低下はみられなかったが、心肥大は同阻害群のみでみられた。同阻害群においてはトレッドミルテストにおける運動能も維持されており、また心筋細胞レベルでの細胞死も予防され、心筋組織の繊維化も減少していた。中枢系における運動能力は不変であり、中枢アデニル酸シクラーゼに対する副作用はみられなかった。さらに冠動脈結索モデルにおいて虚血モデルを作製、同様に阻害剤の効果を検討したところ顕著な生存率の上昇が見られた。この程度はメトプロロールと同様であった。

考察：

心臓型サブタイプは、遺伝子欠損によっても心機能が低下しない。その阻害剤では急性の心不全が起こらず心臓保護効果を示すと考えられ、本年度の研究で、薬理学的効果として動物実験で証明された。そのような薬剤は既に抗ウイルス剤として長年にわたって市販されており、安全性も確認されているため、早急な臨床応用が可能であり、医師主導型臨床試験の適応とも考えられる。細胞内酵素サブタイプの選択的抑制剤は、バイアグラに代表されるように次世代創薬の標的である。アデニル酸シクラーゼは9つのサブタイプを持った

め、それぞれのサブタイプが創薬の対象となり、既に世界各国で薬剤開発が行われ、英国では睡眠障害を対象として脳型サブタイプの阻害剤開発が進んでいる。心臓型サブタイプ抑制剤の開発は、高齢者に向けた副作用の少ない薬としてだけでなく、我々の長年の研究成果に裏づけされたコンピュータによる予測技術を含めて、次世代の創薬手法の代表例となることが考えられ、わが国に普及を目指していきたい。

平成21年度
厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業
医療機器開発推進研究
ナノメディシン研究成果発表会
要 旨 集

日時：平成22年2月24日（水）9時30分～18時20分
場所：財団法人 がん研究振興財団 国際研究交流会館

主催：財団法人 医療機器センター

新規磁性薬剤化合物の画像診断への応用

研究代表者：横浜市立大学 石川 義弘

研究目的：

エレクトロニクス材料分野を中心として、有機磁性体の研究開発が進んでいる。かつて磁性体は無機化合物のみであると考えられていたが、80年代より多数の有機磁性体化合物の発見や合成が進んでおり、実用化に向けた検討が進められている。我々は材料分野の研究に用いられてきた、物理学的な計算手法である第一原理解析法を駆使することにより、有機化合物に磁性を予測する方法を開発した。本手法を用いることにより、医療、とりわけMRIを中心とした画像解析に有用であると考えられる有機化合物を中心に、磁性予測を行い、MR画像診断における「機能を有する造影剤」として開発し、新規画像診断技術として開発していくことが目的である。

方法および結果：

第一原理解析法はこれまで超伝導材料やエレクトロニクス材料の開発に用いられてきた手法であり、この手法の応用により、有機化合物に磁性を予測することが可能となった。この磁性予測技術を用いて、医薬材料化合物の磁性予測を行った。さらに解析精度を上げるために様々な計算手法を導入すると共に、実際の化合物合成を行い、その磁性を測定することにより、我々の磁性解析法を改善していった。これまで3年間の試行錯誤の結果から、単に磁性を予測するだけでなく、磁性を設計し、既存の非磁性体化合物を磁性化する手法を開発することが出来た。このことは既存の薬理化合物に対して磁性化設計を行い、新規磁性薬理化合物として再開発できることを意味する。

我々の同定した磁性有機化合物のひとつに、抗がん作用を有するものがある(EI236)。我々はこの化合物の抗がん剤としての薬理作用を検討すると共に、磁性特性を用いた磁場による誘導作用、交流磁場賦課による発熱作用を検討すると共に、磁性特性によるMRIにおける造影効果を検討した。

EI236はマグネタイトに匹敵する磁性を有することが磁場磁化曲線から明らかとなった。極低温から37度にいたるまで、幅広い温度帯において強磁性を示すことがわかった。またEI236は薬理効果としての抗腫瘍作用を持つことがわかった。悪性黒色腫細胞をはじめとして、様々ながん細胞に対して腫瘍増殖を抑制することが判明した。抗腫瘍効果はDNAに直接作用し、がん細胞の細胞死を誘導するメカニズムが示唆されている。

またEI236を培養がん細胞に添加し、磁石で誘導することによって、抗がん作用自体が誘導されることがわかった。このことは、EI236自身が磁場誘導され、抗がん作用が同時に誘導されたことを示す。同様の実験を、マウス尾部に発生させた悪性黒色腫において検討した。EI236を全身投与し、尾部に永久磁石を当てることによって、EI236を悪性黒色腫局所に誘導した。コントロール群、EI236全身投与群、EI236全身投与+磁場誘導群の3群において治療効果の比較を行ったところ、磁場誘導群において顕著な腫瘍の縮小および退縮が認められた。

以上の性質を持つEI236がMR造影剤として機能するかを検証するために、ファントム実験および動物モデルにおいて造影効果を検討した。ファントム実験においては様々な環境設定を行い、同化合物のMRシグナルが濃度依存的に上昇することを確認した。さらにT1およびT2などの測定の諸条件の検討を行った。これにより単なるファントムのみならず組織中においても濃度依存的にMRシグナルが上昇することがわかった。これらの検討結果を元に、前述の尾部腫瘍モデルにおいて、マウスに同化合物を経静脈的に全身投与した後に、永久磁石を尾部腫瘍に作用させたと、マウス尾部に同化合物が集積し、MRシグナルの増強として造影できることを証明した。これらの結果から、EI236は磁場によって誘導可能な抗がん剤であり、MRの造影剤として機能することがわかった。

考察：

本研究プロジェクトの目的である有機磁性体のMR造影剤の開発に際して、E I 2 3 6がファントム実験および動物実験によってMR造影剤として作用することが実証された。このことは、薬理学的な機能(抗がん効果)をもつ有機磁性体化合物が、薬理学的効果を発揮すると同時に、MRにおける造影機能を示すことを証明したことになる。ファントム実験等から、濃度測定が可能であることがわかっており、これは抗がん剤の局所集積量を定量出来ることを意味する。抗がん剤の局所における定量は、これまで実現されたことは無く、MR画像診断としての応用のみならず、抗がん剤治療の開発にも大きな進歩をもたらす可能性がある。さらに、同様の薬剤開発によって今後の薬物治療と画像診断にも大きな影響を及ぼす可能性がある。

cAMPシグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究
Regulation of hyaluronic acid production via cAMP signal

石川義弘、横山詩子
Yoshihiro Ishikawa and Utako Yokoyama

Synopsis)

Hyaluronic acid is a kind of mucopolysaccharide and exists abundantly as extracellular matrix in skin, article, lens and other organs. Skin folding as seen with aging is shown to be related to a decrease in the content of hyaluronic acid in skin. Supplemental uptake of hyaluronic acid and addition to cosmetic ointment as well as direct skin injection of hyaluronic acid itself have been commonly employed. Further, in the treatment of article inflammation or lens injury, hyaluronic acid has been used widely in medicine. It has been known that stimulation of G protein-coupled receptors is necessary to produce hyaluronic acid, leading to increased cell migration or proliferation. However, the exact molecular mechanism of this signal transduction in cells has remained undetermined. We have investigated the molecular mechanisms of hyaluronic acid production through cAMP signal in our laboratory. We have demonstrated that the activation of cAMP signal is essential and resulting increase in hyaluronic acid synthase enzyme expression follows. Because cAMP is produced by adenylyl cyclase, a membrane-bound enzyme that is activated by Gs protein, leading to the conversion of ATP to cAMP, it is necessary to investigate the molecular mechanisms of adenylyl cyclase activation that leads to increased hyaluronic acid production. Adenylyl cyclase enzyme has many isoforms, from type I to IX, which show distinct tissue distribution and biochemical properties. Because the hyaluronic acid production has been best demonstrated in vascular smooth muscle cells in our laboratory, we examined adenylyl cyclase isoforms that are responsible for hyaluronic acid production. We also examined the effect of stimulating these adenylyl cyclase isoforms in an isoform-specific manner using forskolin derivatives that have increased specificity to these isoforms. We also examined the effect of overexpressing adenylyl cyclase isoforms in these cells to explore changes in intracellular cell signaling as well as changes in hyaluronic acid production. Accordingly, we found that specific isoforms of adenylyl cyclase are more responsible for hyaluronic acid production and thus cell migration thereafter, and that these isoforms play an important role in not only hyaluronic acid production, but regulating vascular function such as vasodilatation or endothelial thickening. Our results have indicated that it is important to understand the role of each adenylyl cyclase to regulate hyaluronic acid production. Pharmacological stimulation of a specific

isoform of adenylyl cyclase may enable us to enhance the production of hyaluronic acid specifically. Development of such specific stimulator of adenylyl cyclase may be used in the treatment of conditions where decrease in hyaluronic content is involved. Indeed, our results have suggested that such strategy is pharmacologically feasible.

概要

ヒアルロン酸はムコ多糖の一種であり、皮膚をはじめとして関節や硝子体などにおける細胞外器質として豊富に存在する。ヒアルロン酸の産生に G 蛋白共役型のホルモン刺激が関与することは以前より知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。G 蛋白共役型のホルモン刺激によってヒアルロン酸産生の亢進とともに、細胞増殖や遊走が亢進することが報告されてきたが、これらの細胞機能を特異的に制御することが可能なのか、あるいはその細胞内シグナルの制御は独立して行われているのかは不明であった。我々の研究室では、G 蛋白共役型ホルモンによる cAMP シグナルの分子メカニズムを長年にわたって研究してきたが、最近の成果によればヒアルロン酸の産生制御には cAMP シグナルの活性化が必要であり、平滑筋細胞や繊維芽細胞においてヒアルロン酸産生酵素の一つである Has2 の転写レベルでの亢進が重要な役割を果たしていることがわかった。さらにこれらの作用は cAMP 産生酵素であるアデニル酸シクラーゼサブタイプ依存性に起こることがわかり、特定のサブタイプを対象とした制御剤の開発が可能であることを示唆した。

1. 緒言

ヒアルロン酸はムコ多糖の一種であり、皮膚をはじめとして関節や硝子体などにおける細胞外器質として豊富に存在する。加齢に伴う皮膚のたるみやシワではヒアルロン酸含有量の低下が関与しており、近年では健康補助食品としての摂取や、化粧品の添加物としての使用、さらには美顔術としてのアルロン酸注入が行われている。これ以外にも関節炎や角結膜上皮障害における治療など、幅広く医療に利用されている。ヒアルロン酸の産生に G 蛋白共役型のホルモン刺激が関与することは以前より知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。G 蛋白共役型のホルモン刺激によってヒアルロン酸産生の亢進とともに、細胞増殖や遊走が亢進することが報告されてきたが、これらの細胞機能を特異的に制御することが可能なのか、あるいはその細胞内シグナルの制御は独立して行われているのかは不明であった。

我々の研究室では、G 蛋白共役型ホルモンによる cAMP シグナルの分子メカニズムを長年にわたって研究してきたが、最近の成果によればヒアルロン酸の産生制御には cAMP シグナルの活性化が必要であり、平滑筋細胞や繊維芽細胞においてヒアルロン酸産生酵素の一つである Has2 の転写レベルでの亢進が重要な役割を果たしていることがわかった (1)。さらに cAMP シグナルの標的酵素として、従来考えられていたプロテインキナーゼ A 以外に、Epac と呼ばれる G 蛋白質調節因子が細胞遊走の調節に重要な役割を果たしており、プロテインキナーゼ A と Epac に機能分担が存在することがわかってきた (2, 3)。このことは、ヒアルロン酸産生と細胞遊走の制御メカニズムが異なる可能性を示唆する。

本申請では、G 蛋白共役型ホルモンによるアデニル酸シクラーゼの活性化が引き起こす cAMP シグナルがヒアルロン酸産生を如何に制御するかを検討し、血管平滑筋細胞を含めて細胞外器質の産生を特異的に制御する酵素サブタイプを含めた検討をおこなった。さらに特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプの制御剤が、将来的な薬物開発の対象となりうるかについて検討した。

2. 実験

HAS 発現の定量

トータル RNA はプールされたラット組織から抽出した。cDNA の合成および RT-PCR は過去の文献に記載された方法を用いた。PCR 増幅に用いたプライマーの塩基配列はラットのものを用い、遺伝子バンクからの配列を元に合成した。定量的な RTPCR 反応においては、それぞれのテンプレートは少なくとも 3 回の定量を行い、再現性を検討した。それぞれの遺伝子の定量に当たっては GAPDH をコントロールとして用いた。GAPDH の定量に当たっては、市販のキットである TaqMan Rodent GAPDH control reagent kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いた。

細胞培養

Wister ラットの血管平滑筋細胞を初代培養して使用した。ラット胎生期 21

日を中心に採取した。組織片は切り刻まれ、800 μ l の collagenase/dispase enzyme mixture を添加し、37 度にて 15 分間の消化をおこなった。細胞浮遊液を遠心し、培養液を 4collagenase mixture II に変えてさらに 37 度において 12 分間おこなった。細胞浮遊液は growth media mixture に移され、3.5 mm の Poly-L-Lysin 皿を用いて培養を行った。培養期待は 5% CO₂ の条件であり、37 度にて施行した。細胞はそれぞれ 4-6 回の継代培養中に使用し、alpha-smooth muscle actin の発現が 99% 以上に見られることを確認して使用した。

ヒアルロン酸の定量

ヒアルロン酸は細胞培養液中に放出された量を定量した。牛軟骨から抽出されたヒアルロン酸結合蛋白をラテックスにラベルし、凝集を指標として定量することで行った (LPIA Ace, Fujirebio Inc, Tokyo)。ヒアルロン酸の定量は duplicate で製造者のプロトコールに基づいて行い、Hitachi 7070 analysis system (Hitachi, Tokyo) を用いて 800 nm における吸光度分析をおこなった。

siRNA 実験

二重鎖 siRNA をアデニル酸シクラーゼ 2、5、および 6 型の塩基配列から特定部分を選択しておこなった。コントロールには QIAGEN にて作製されたものを用いた。製造者の推奨するプロトコールに基づいて、siRNA (300 pmol)、Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen, San Diego, CA) を用いた。

アデノウイルス実験

ラット 2 型アデニル酸シクラーゼ全長 cDNA をシャトルベクターに組み込んで、同サブタイプを発現するアデノウイルスを作製した。作成に当たっては AdenoX adenovirus construction kit (Clontech, Tokyo, Japan) を用いた。6 型アデニル酸シクラーゼを発現するアデノウイルスにおいては、サイトメガロウイルスプロモーターを用いた。作成に当たっては homologous recombination method を用いた。

cAMP 産生能の検討

細胞を 24 穴プレートにおいて培養し、24 時間の血清無添加条件のあとに cAMP 産生を定量した。定量に当たっては事前に 0.2 mM IBMX を添加し 20 分間の preincubation をおこなった後に、各試薬を加えてさらに 10 分間 incubate した。産生反応は培養液を除去し、400 μ l の ice-cold trichloroacetic acid (7.5%) を各穴に加えて終了させた。サンプルは 10 μ l acetyl anhydride, 20 μ l triethylamine (Sigma) を加えてアセチル化させた。これらのサンプルを 50 μ l 取り出し、12,000cpm ¹²⁵I-cAMP (Perkin Elmer, Waltham, MA) 50 μ l ウサギ血清 anti-cAMP 抗体 (diluted 1:3000, Millipore, Billerica, MA) と 4 度の条件で一晩 incubation をおこなった。50 μ l ヤギ抗ウサギ抗体 (magnetic bead coated, QIAGEN, Tokyo) を加えて室温条件化で揺らしながら 1 時間 incubate した。Bound from free の分離においては、Millipore フィルターを用いておこなった。残存した放射能活性を測定し、標準曲線と対比することにより cAMP 産生量の定量をおこなった。cAMP 産生量は蛋白濃度で補正した。

PKA 活性

PKA 活性はアッセイキットを用いて測定した (StressGen Biotechnologies, Ann Arbor, MI)。測定法の詳細は製造者のプロトコールに従った。

3. 結果

PGE-EP4 シグナルによるヒアルロン酸産生の制御

我々はヒアルロン酸の産生能力を、これまでに検討してきた血管平滑筋細胞を用いて調べた。これまでの研究結果から、動脈管などから採取された血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸産生能力が高いことがわかっている。プロスタグランジン刺激によって、ヒアルロン酸産生が亢進することは従来の結果からも示唆されているが、はたしてどのようなサブタイプによる産生が最も強いのかを検討した。PGE1, PGE2, および EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 を用いて刺激したところ、容量依存性にヒアルロン酸産生が増加した。最終的な増加は 48 時間後の定量において判断した。PGE1 刺激によるヒアルロン酸の産生は EP4 アンタゴニストである ONO-AE3-208 によって阻害された。一方で EP1 および EP3 に対する拮抗剤を使用しても抑制は見られていなかった。これらの結果から EP4 による刺激がヒアルロン酸の産生を引き起こすことが推測された。

cAMP 産生を介したヒアルロン酸産生の制御

上記の結果から、ヒアルロン酸産生において EP4 の刺激が重要であることが推測された。そこで、EP4 の選択的な刺激剤である ONO-AE1-329 を用いて、血管平滑筋を刺激し、用量依存性と時間依存性を検討することにより、ONO-AE1-329 によるヒアルロン酸産生効果を確認することとした(図 1)。容量依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生の検討として、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ことがわかった。さらに、時間依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生を検討した。上記と同様に 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ところ、時間依存性にヒアルロン酸産生が増加することがわかった。さらに EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生は、PKA の選択的阻害によって抑制されたことから、EP4 刺激が cAMP の産生を上昇させ、PKA シグナルを賦活化することによってヒアルロン酸産生を上昇されるメカニズムが確認された。

ヒアルロン酸産生の分子メカニズム

ヒアルロン酸の産生に当たっては、これまでに 3 種類のヒアルロン酸産生酵素の存在が知られている。そこで、EP4 を介したシグナル系において、どのサブタイプが関与しているのかを検討した。検討に当たっては、制御メカニズムとしてもっとも基本的な転写調節レベルでの制御が想定されたため、まずは RT-PCR を用いて、mRNA の定量をおこなった。HAS1, HAS2, HAS3 の三つのサブタイプに特異的なプライマーを用いて RT-PCR による、それぞれの定量をおこなった。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ところ、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(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、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 HAS2 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 PGE1 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, Hirotsani 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

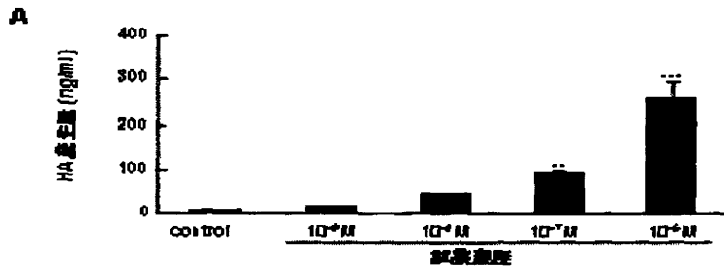


図1. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生制御

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。

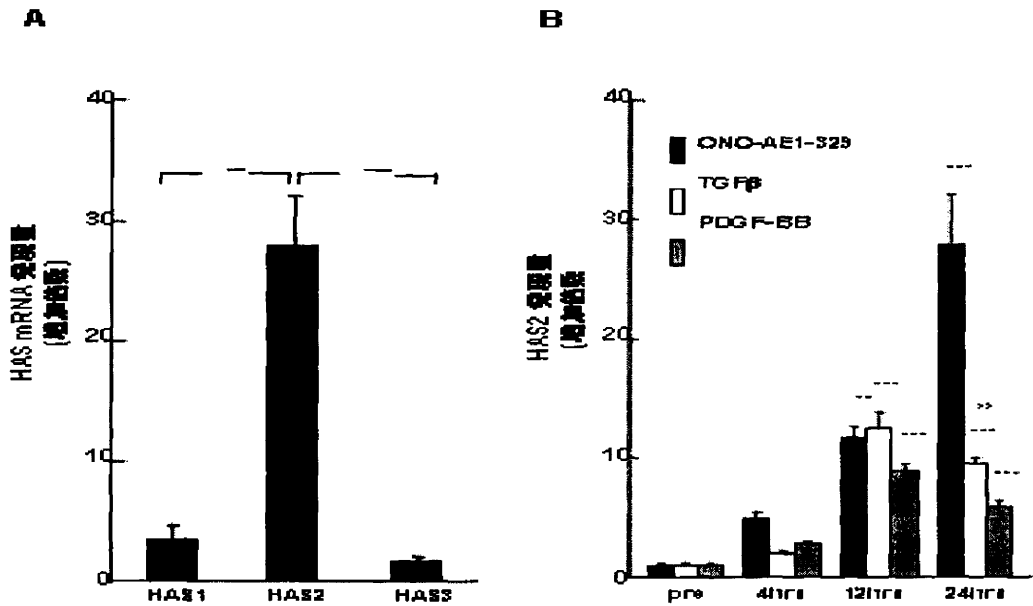


図2. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生酵素発現の変化

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、HAS 2 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, TGFb、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

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 Bcl-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関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与するかを、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^{3,4,9)}。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⁹⁾。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とともに高度にみられる

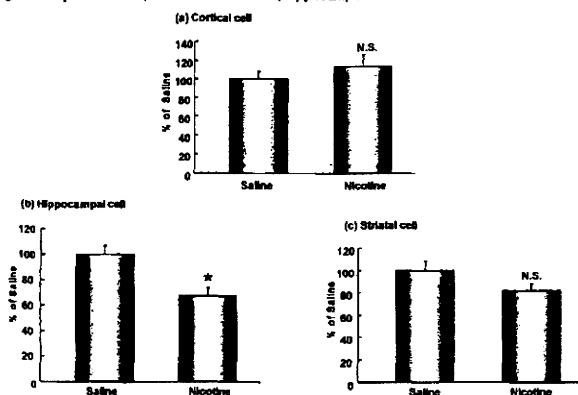
ことがわかっている。そこでE p a c選択的なc AMPアナログを用いて、皮質および心筋培養細胞に対して刺激実験をおこなった。この結果から、E p a c刺激は培養皮質細胞では細胞死を亢進させるが、培養心筋細胞では亢進させない。逆にPKA選択的なc AMPアナログを用いた場合は、心筋細胞で細胞死を亢進させるが、皮質細胞ではそのような効果がないことがわかった。そこでアデノウイルスにE p a cおよびPKAを組み込み、同じく培養細胞においてE p a cおよびPKAを過大発現させたところ、c AMPアナログを用いた薬物的な刺激効果と同様の結果が得られた。このことから、E p a cは神経細胞に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E p a c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を過大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自体の発現が無い場合、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) 齢生16-18日のマウスの大脳皮質、海馬体、海馬の切片組織を採取し7日に10μMのニコチンで4日間処理し、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) 海馬組織においてのみニコチン刺激によりEpac1 mRNAの発現が増加した。

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)、