

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 HAS2 mRNA 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, 10 ng/ml, 10 ng/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

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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3, 4, 5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。

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<sup>8)</sup>、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<sup>9)</sup>、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<sup>10)</sup>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<sup>7)</sup>、Epacの発現は心臓と中枢とともに高度にみられる

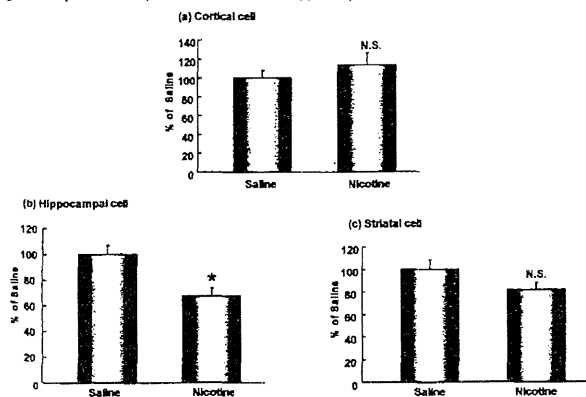
ことがわかっている。そこでE p a c 選択的なc AMPアナログを用いて、皮質および心筋培養細胞に対して刺激実験をおこなった。この結果から、E p a c 刺激は培養皮質細胞では細胞死を亢進させるが、培養心筋細胞では亢進させない。逆にP K A 選択的なc AMPアナログを用いた場合は、心筋細胞で細胞死を亢進させるが、皮質細胞ではそのような効果がないことがわかった。そこでアデノウイルスにE p a c およびP K A を組み込み、同じく培養細胞においてE p a c およびP K A を過大発現させたところ、c AMPアナログを用いた薬物的な刺激効果と同様の結果が得られた。このことから、E 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P K A 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<sup>10)</sup>。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 自体の発現が無いので、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.



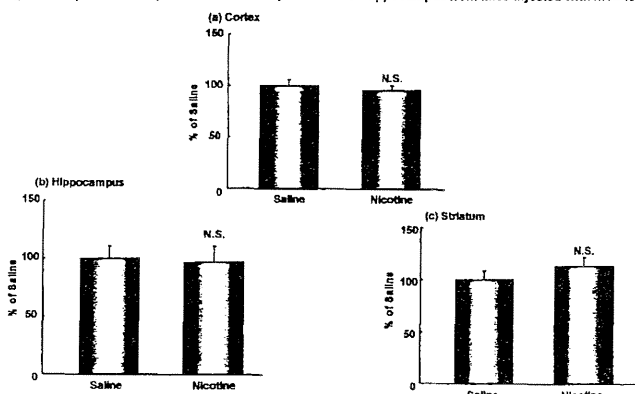
Method) 胎生16-18日のマウスの大脳皮質、脳脊髄、海馬の脊状地帯細胞を培養7日目に100nMのニコチンで4日間刺激し、Epac1のmRNAをリアルタイムPCRにて測定した。N=4, \*p<0.01, N.S. vs. Saline

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E p a c 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、E p a c 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用いて、2.5mg/kg/日、ニコチンを4週間投与(慢性投与)し、大脳皮質、海馬、基底核線維中の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著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, Hirotani 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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup> 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.

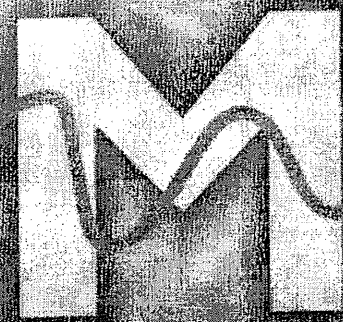


会報23号

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 格 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)IHI  
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、生体内で薬剤が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<sup>1)</sup>。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<sup>2,3)</sup>。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<sup>4)</sup>、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エマルション、⑦マイクロスフェア<sup>5)</sup>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的特異的薬剤送達法が注目されている<sup>6,7)</sup>。

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]<sup>10,13)</sup>。

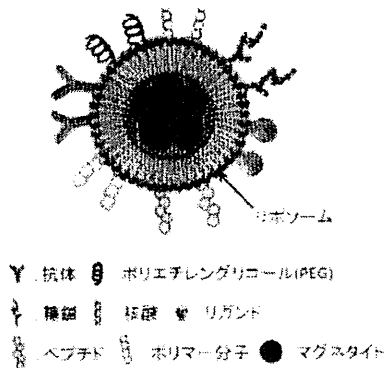
また、アルブミンに抗がん剤パクリタセル(微小管重合を促進することにより複製を抑制する薬剤)を結合させ、ナノ粒子化させたアブラキサンという薬剤は、水溶性を持ち、パクリタセル単体よりも高い抗腫瘍効果を示したことで、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration, FDA)で、はじめての化学療法用のナノ粒子として認可された<sup>11)</sup>。

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<sup>15)</sup>、酸化鉄(マグネタイト, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)とドキシソルピシンという薬剤を含有したアルブミン粒子を水久磁石で肉腫(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(磁性化マグネタイト)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する報告されるようになった<sup>17)</sup>。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<sup>17,18)</sup>、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考える者もいる。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。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。

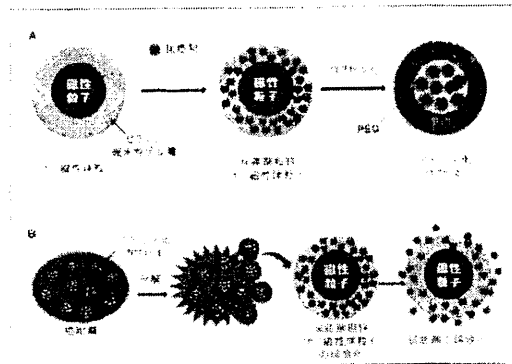
さらに、最近の報告では、薬剤とナノ磁性体粒子を含有した新しいステルス化カプセルが開発されている。これは、ナノ磁性体粒子表面を親水性のゲル層(ハイドロゲル層)で覆い、ゲル層に抗癌剤を含有させた抗癌剤担持ナノ磁性粒子を作成後、この抗癌剤担持ナノ磁性粒子を多数含ませ、最終的に表面にポリエチレングリコール(PEG)を付加したカプセルである。このカプセル化によって抗癌剤を磁石で標的部位に送達可能にする新たな材料となった。このカプセルは、ナノ磁性体粒子表面をゼラチンによって親水性ゲル層を作成すること、PEGをカプセル表面に付加することで、ステルス化されているが[図2]、ゼラチンやPEGは、既に臨床応用され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<sup>19)</sup>。

【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、核酸など多様なプローブを修飾可能である。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で覆われた生体吸取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<sup>20,21)</sup>。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<sup>22,24)</sup>。

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<sup>25)</sup>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<sup>26)</sup>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応答した膨潤-収縮変化に伴う薬物放出を可能にしている<sup>(27)</sup>。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応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<sup>(28)</sup>。

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<sup>(29,30)</sup>。

### 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、生体膜に類似のリポソームなどは、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瘍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, Lubbe 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 C, 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, Abad 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 I, 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

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、レニンアンジ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。



# Inhibition of EP4 Signaling Attenuates Aortic Aneurysm Formation

Utako Yokoyama<sup>1\*</sup>, Ryo Ishiwata<sup>1,5</sup>, Mei-Hua Jin<sup>1</sup>, Yuko Kato<sup>1</sup>, Orié Suzuki<sup>1</sup>, Huiling Jin<sup>1</sup>, Yasuhiro Ichikawa<sup>1</sup>, Syun Kumagaya<sup>1,5</sup>, Yuzo Katayama<sup>2</sup>, Takayuki Fujita<sup>1</sup>, Satoshi Okumura<sup>1</sup>, Motohiko Sato<sup>1</sup>, Yukihiko Sugimoto<sup>3</sup>, Hiroki Aoki<sup>4</sup>, Shinichi Suzuki<sup>2</sup>, Munetaka Masuda<sup>2</sup>, Susumu Minamisawa<sup>5</sup>, Yoshihiro Ishikawa<sup>1\*</sup>

**1** Cardiovascular Research Institute, Yokohama City University, Yokohama, Japan, **2** Department of Surgery, Yokohama City University, Yokohama, Japan, **3** Department of Pharmaceutical Biochemistry, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, **4** Cardiovascular Research Institute, Kurume University, Kurume, Japan, **5** Department of Life Science and Medical Bio-Science, Waseda University Graduate School of Advanced Science and Engineering, Tokyo, Japan

## Abstract

**Background:** Aortic aneurysm is a common but life-threatening disease among the elderly, for which no effective medical therapy is currently available. Activation of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is known to increase the expression of matrix metalloproteinase (MMP) and the release of inflammatory cytokines, and may thus exacerbate abdominal aortic aneurysm (AAA) formation. We hypothesized that selective blocking of PGE<sub>2</sub>, in particular, EP4 prostanoid receptor signaling, would attenuate the development of AAA.

**Methods and Findings:** Immunohistochemical analysis of human AAA tissues demonstrated that EP4 expression was greater in AAA areas than that in non-diseased areas. Interestingly, EP4 expression was proportional to the degree of elastic fiber degradation. In cultured human aortic smooth muscle cells (ASMCs), PGE<sub>2</sub> stimulation increased EP4 protein expression (1.4±0.08-fold), and EP4 stimulation with ONO-AE1-329 increased MMP-2 activity and interleukin-6 (IL-6) production (1.4±0.03- and 1.7±0.14-fold, respectively, *P*<0.05). Accordingly, we examined the effect of EP4 inhibition in an ApoE<sup>-/-</sup> mouse model of AAA infused with angiotensin II. Oral administration of ONO-AE3-208 (0.01–0.5 mg/kg/day), an EP4 antagonist, for 4 weeks significantly decreased the formation of AAA (45–87% reduction, *P*<0.05). Similarly, EP4<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice exhibited significantly less AAA formation than EP4<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice (76% reduction, *P*<0.01). AAA formation induced by periaortic CaCl<sub>2</sub> application was also reduced in EP4<sup>+/-</sup> mice compared with wild-type mice (73% reduction, *P*<0.001). Furthermore, in human AAA tissue organ cultures containing SMCs and macrophages, doses of the EP4 antagonist at 10–100 nM decreased MMP-2 activation and IL-6 production (0.6±0.06- and 0.7±0.06-fold, respectively, *P*<0.05) without increasing MMP-9 activity or MCP-1 secretion. Thus, either pharmacological or genetic EP4 inhibition attenuated AAA formation in multiple mouse and human models by lowering MMP activity and cytokine release.

**Conclusion:** An EP4 antagonist that prevents the activation of MMP and thereby inhibits the degradation of aortic elastic fiber may serve as a new strategy for medical treatment of AAA.

**Citation:** Yokoyama U, Ishiwata R, Jin M-H, Kato Y, Suzuki O, et al. (2012) Inhibition of EP4 Signaling Attenuates Aortic Aneurysm Formation. PLoS ONE 7(5): e36724. doi:10.1371/journal.pone.0036724

**Editor:** Mitsunobu R. Kano, University of Tokyo, Japan

**Received:** March 24, 2012; **Accepted:** April 6, 2012; **Published:** May 3, 2012

**Copyright:** © 2012 Yokoyama et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (UY, SS, MM, SM, YI), Adaptable and Seamless Technology transfer Program through target-driven R & D (UY, AS231Z00231G), Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (UY, 1123116514; YI, 22136009), the Yokohama Foundation for Advanced Medical Science (UY, SM), the Takeda Science Foundation (UY, SM, YI), the Japan Heart Foundation Research Grant (UY), the Sumitomo Foundation (UY), the Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research (UY), the Kanoe Foundation for the Promotion of Medical Science (UY) and Kitsuen Research Foundation (YI). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: utako@yokohama-cu.ac.jp (UY); yishikaw@med.yokohama-cu.ac.jp (YI)

## Introduction

Aortic aneurysm is the 13<sup>th</sup> leading cause of death in the United States, with roughly 15,000 deaths per year [1]. After rupture occurs, the probability of mortality is greater than 60% [1]. Ultrasonography screening studies of men over 60 years old have shown that a small abdominal aortic aneurysm (AAA), i.e., 3 to 5 cm in diameter, is present in 4% to 5% of patients [2,3]. When patients with a small AAA were followed for up to 6 years, AAA diameter had increased in 55% of patients. The rate of increase in

diameter was more than 1 cm per year in 23% of patients, and AAA diameter had expanded to 6 cm in 9% of patients, at which point the risk of rupture significantly increases [3]. Although AAAs typically continue to expand, increasing the likelihood of rupture and consequent mortality, no effective pharmacological therapy to prevent the progression of AAA is currently available.

The hallmarks of AAA are the presence of an inflammatory infiltrate within the vascular wall, which is followed by proteolytic degradation of extracellular matrixes (ECM) [4]. Proinflammatory cytokines play an important role, particularly in the initiation of

aneurysms [1]. Inflammatory mediators such as interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) are released in the AAA wall [5,6]. In an experimental AAA model of ApoE<sup>-/-</sup> mice infused with angiotensin II (AngII), IL-6 and MCP-1 production were both increased [7]. In contrast, the incidence of AAA was decreased after AngII infusion in mice lacking either the IL-6 or MCP-1 receptor CCR2 [7]. Proteolytic enzymes, together with inflammatory mediators, promote extensive structural remodeling of the arterial wall, characterized by the degradation of ECM such as elastic fibers [8]. Activation of proteolytic enzymes, particularly matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and MMP-9 in the tunica media, is considered to be an important cause. These MMPs exacerbate aortic dilatation, as demonstrated in studies using human patients or genetically engineered mice [8,9].

Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis is induced during the development of aneurysms [5,10]. PGE<sub>2</sub> synthesized by macrophages and smooth muscle cells (SMCs) increases the production of MMPs [11,12] and stimulates the production of cytokines [5]. Selective COX-2 inhibition, as induced by celecoxib or genetic disruption of COX-2, decreased AngII-induced AAA formation in mice [13,14]. Despite these positive findings, however, administration of selective COX-2 inhibitors has increased the frequency of adverse cardiovascular events, as reported in clinical studies [15,16]. Nonetheless, inhibition of pathophysiologic COX-2-dependent PGE<sub>2</sub> signaling may still remain an attractive therapeutic strategy.

The present study was designed to examine the hypothesis that the prostanoid receptor, which is downstream of COX-2-dependent PGE<sub>2</sub> signaling, plays a critical role in the formation of AAA. We demonstrate that prostanoid receptor EP4 expression was increased in SMCs from human AAA tissue, and that EP4 stimulation enhanced MMP-2 activation and IL-6 production. Further, pharmacological inhibition or genetic disruption of EP4 signaling successfully attenuated AAA formation in mice. We also demonstrate that an EP4 antagonist attenuated MMP-2 activation and IL-6 production in the explants of human AAA.

## Materials and Methods

### Reagents

Antibody for EP4 was obtained from Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA). Antibodies for  $\alpha$ -smooth muscle actin and CD68 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Dako Cytomation (Glostrup, Denmark), respectively. ONO-AE1-329 and ONO-AE3-208 were kindly provided by the ONO pharmaceutical company (Osaka, Japan).

### Human Aortic Samples

We obtained surgical specimens from individuals with AAA. We performed *ex vivo* culture using fresh AAA samples during surgery as described previously [17]. Briefly, tissues were minced to approximately 1 mm thickness, and plated on 24-well plates with 10% FBS/DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Media was changed 24 h after plating. We collected some conditioned media after 48 h of incubation as a control for each well. Each well was then treated with ONO-AE1-329 or ONO-AE3-208. Conditioned media 48 h after treatment was obtained and subjected to gelatin zymography and ELISA. To compare the effect of drugs among samples, values for each well obtained from stimulated conditioned media were normalized to values from control conditioned media.

To obtain the primary culture of human aneurysm aortic smooth muscle cells (hAASMCs) from AAA tissue, the medial layer of the AAA was cut into 1- to 2-mm<sup>3</sup> pieces which were

placed in the explant culture on uncoated dishes in 10% FBS/DMEM (Invitrogen). Culture medium was changed after 7 days and thereafter every 3 days during a 3- to 4-week period until the specimens became confluent. The purity of the hAASMCs was confirmed by staining with  $\alpha$ -smooth muscle actin. When confluent, SMCs were transferred (at passage 2 or 3) onto uncoated 6-well or 96-well plates for immunoblotting, gelatin zymography, and ELISA. Human aortic SMCs (hAASMCs) from individuals who died of unrelated causes were obtained from Lonza (Walkersville, MD, USA).

### Cell Culture

THP-1 cells were obtained from the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan). We maintained hAASMCs and hAASMCs in SmGM-2 containing 5% FBS and growth supplements (Lonza) and maintained THP-1 cells in RPMI1640 (Wako, Osaka, Japan) containing 10% FBS. For differentiation of THP-1 monocytes into adherent macrophages, cells were treated with 100 nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) for 24 h as described previously [18].

### AAA Mouse Models

The impact of genetic inhibition of EP4 on AAA formation was examined using the heterozygous EP4 knockout mouse (EP4<sup>+/-</sup>) since homozygous knockout is lethal [18]. AAA was induced by periaortic application of 0.5 M CaCl<sub>2</sub> as described previously [17]. The sham group received saline instead of CaCl<sub>2</sub>. Aortic morphometry was performed 4 weeks after CaCl<sub>2</sub> treatment.

AAA was also induced after crossing EP4<sup>+/-</sup> [18] with the apolipoprotein E knockout mouse (ApoE<sup>-/-</sup>) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Briefly, EP4<sup>+/-</sup> mice with a C57BL/6 genetic background [18] were crossed with ApoE<sup>-/-</sup> mice with the same genetic background, and the resulting mice (EP4<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>+/-</sup>) were intercrossed to generate EP4<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice and their littermate controls (EP4<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>). To induce AAA formation, male EP4<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice and littermate EP4<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice were infused with AngII (1,000 ng/min/kg; Sigma-Aldrich) via an osmotic minipump (Alzet, model 2004, Cupertino, CA, USA) for 4 weeks, as described previously [19].

The effect of pharmacological inhibition of EP4 was examined in ApoE<sup>-/-</sup> mice infused with AngII. Simultaneously, mice were orally administered ONO-AE3-208 (0.005, 0.01, 0.05, 0.5 mg/kg/day) as a bolus for 4 weeks. At the end of AngII infusion, the mice were sacrificed by an overdose of pentobarbital and were perfusion-fixed with a mixture of 3.7% formaldehyde in PBS at physiological perfusion pressure. Abdominal aorta were photographed to determine their external diameter, and also used for histological analyses. All aortic morphometries were performed by an investigator in a blinded manner. For gelatin zymography, we used freshly isolated aortic tissues at the end of AngII infusion.

### Ethics Statement

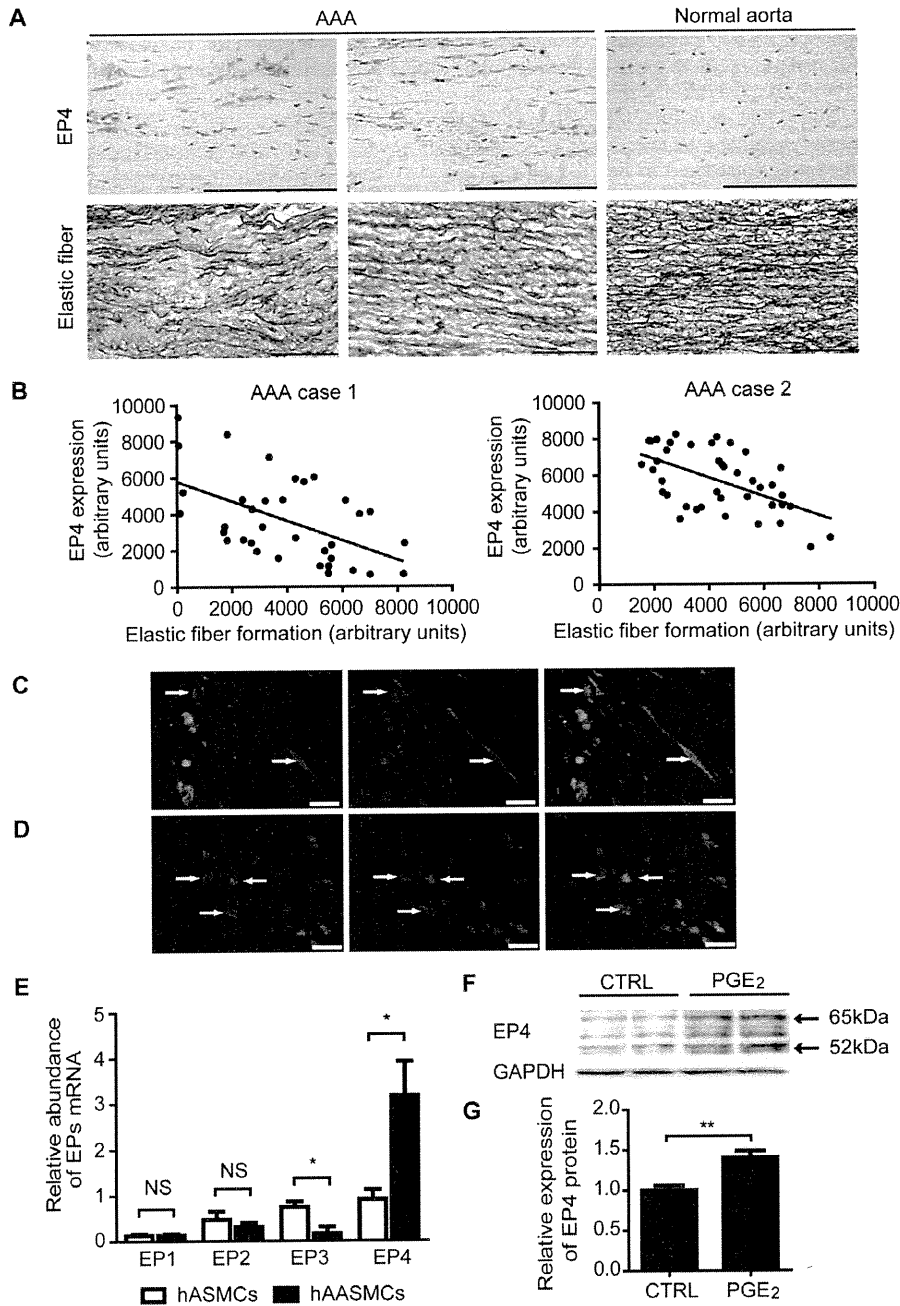
All protocols using human specimens were approved by the Institutional Review Board at Yokohama City University and all samples were obtained after receiving written informed consent. All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of Yokohama City University.

### Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Isolation of total RNA and generation of cDNA were performed and RT-PCR analysis was done as described previously [20]. The

primers were designed based on rat nucleotide sequences of human EP1(NM\_000955) (5'-GGA TGT ACA CCA AGG GTC CAG-3' and 5'-TCA TGG TGG TGT CGT GCA TG-3'),

human EP2 (NM\_000956) (5'-AGG ACT GAA CGC ATT AGT CTC AGA A-3' and 5'-CTC CTG GCT ATC ATG ACC ATC AC-3'), human EP3 variants 1-9,11(NR\_028292-4, NM\_198714-



**Figure 1. EP4 expression is increased in human AAA tissue.** A, Immunohistochemistry for EP4 in human AAA tissues and aortic tissue from individuals who died of unrelated causes (upper panels). Brown areas indicate expression of EP4. Elastica van Gieson-stained aortic tissues (lower panels). Scale bars: 100  $\mu$ m. B, Representative correlations between EP4 protein expression and elastic fiber formation in human AAA tissues. C, Immunofluorescent staining for EP4 (green, left panel) and  $\alpha$ -smooth muscle actin (red, middle panel). Merged image is shown in the right panel. Arrows indicate EP4- and  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells. D, Immunofluorescent staining for EP4 (green, left panel) and CD68 (red, middle panel). Merged image is shown in the right panel. Arrows indicate EP4- and CD68-positive cells. Scale bars: 20  $\mu$ m. E, Expression of EP1-4 using quantitative RT-PCR in hASMCs and hAASMCs. n = 5. F, Immunoblotting for EP4 and GAPDH in hASMCs incubated in the presence or absence of 1  $\mu$ M of PGE<sub>2</sub> for 72 h. G, Quantification of F. n = 4-5. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; NS, not significant. doi:10.1371/journal.pone.0036724.g001

9, NM\_001126044) (5'-GGA CTA GCT CTT CGG ATA ACT-3' and 5'-GCA GTG CTC AAC TGA TGT CT-3'), human EP4 (NM\_000958) (5'-AAC TTG ATG GCT GCG AAG ACC TAC-3' and 5'-TTC TAA TAT CTG GGC CTC TGC TGT G-3'), and mouse EP4 (5'-TTC CCG CAG TGA TGT TCA TGT-3' and 5'-CGA CTT GCA CAA TAC TAC GAT GG-3'). Each primer set was designed between multiple exons, and PCR products were confirmed by sequencing. The abundance of each gene was determined relative to the 18S transcript.

### Immunoblot Analysis

Proteins from whole cells were analyzed by immunoblotting as described previously [20].

### Tissue Staining and Immunohistochemistry

Elastic fiber formation was evaluated by elastica van Gieson staining. Immunohistochemical analysis was performed as described previously [20,21]. A color extraction method using Keyence software was performed to quantify elastic fiber formation and expression of EP4.

### Gelatin Zymography

MMP activity was examined by gelatin zymography as described previously [17].

### ELISA

IL-6 and MCP-1 in conditioned media were measured using ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Statistical Analysis

Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of independent experiments. Unpaired Student's *t*-test, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test, and Pearson's Correlation Coefficient were used to determine the statistical significance of the data. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### Prostaglandin E Receptor EP4 Was Up-regulated in Aneurysmal Areas of Human Abdominal Aortas

In human tissue samples obtained from AAA surgeries, we found that EP4 expression and elastic fiber degradation were both enhanced in aneurysmal areas relative to that in normal areas. Indeed, statistical analysis revealed that the correlation was significant between the amount of EP4 expression and the degree of elastic fiber degradation ( $p < 0.0001$  to  $0.0168$ ) (**Figures 1A and B, and Table 1**).

Previous studies have demonstrated that EP4 is abundantly expressed as primary PGE<sub>2</sub> receptors in macrophages in aneurysmal areas [22]. However, whether or not other cell types such as ASMCs also express EP4 and other subtypes was not determined. We found, by immunohistochemistry of tissue samples, that EP4 was abundantly expressed in both  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells, i.e., ASMCs, (**Figure 1C**) and in CD68-positive cells, i.e., macrophages (**Figure 1D**). EP subtype expression was further characterized in cultured hAASMCs isolated from AAA tissue (**Figure 1E**). We found that EP4 mRNA expression was much greater than that of other EP subtypes such as EP1, EP2, and EP3. In contrast, when hAASMCs isolated from normal aorta were examined, EP4 mRNA expression was not increased, suggesting that EP4 was increased only in

**Table 1.** Correlation between elastic fiber formation and EP4 expression in AAA tissues.

	age	gender	r	number of sampling point	P value
1	76	M	-0.5386	35	0.0008***
2	63	M	-0.5645	41	0.0001***
3	76	M	-0.8000	25	<0.0001***
4	80	M	-0.4607	29	0.011*
5	70	M	-0.5454	39	0.0003***
6	76	M	-0.7571	60	<0.0001***
7	70	M	-0.4333	30	0.0168*
8	89	F	-0.5200	44	0.0003***

r: correlation coefficient; n: number of sampling points.

\*,  $P < 0.05$ ;

\*\*,  $P < 0.01$ ;

\*\*\*,  $P < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0036724.t001

aneurysmal ASMCs. When normal hASMCs were stimulated with PGE<sub>2</sub>, however, EP4 protein expression was significantly increased (**Figures 1F and G**). Thus, we can tentatively speculate that local production of PGE<sub>2</sub> increased EP4 in the ASMCs in aneurysmal areas, which might play a role in AAA exacerbation.

### EP4 Stimulation Increased MMP-2 Activity and IL-6 Production in hAASMCs and Human AAA Tissue Organ Cultures

Previous reports have demonstrated that MMP-2 and MMP-9, which are respectively derived from SMCs and macrophages, play important roles in the progression of aortic aneurysms [9]. We also found that MMP-2 and MMP-9 were both abundant in the supernatants of human AAA tissue organ cultures (**Figure 2A**). We also confirmed that MMP-2 was produced exclusively by hASMCs, and MMP-9 by THP-1 macrophage cells [9]. When hAASMCs or human AAA tissue organ cultures were stimulated with the EP4 agonist ONO-AE1-329, we found that MMP-2 activity was significantly increased in both preparations (**Figure 2B and C**). In contrast, EP4 stimulation did not alter MMP-9 activation in organ cultures (**Figure 2D**). We also examined the effect of EP4 stimulation on cytokines and chemokine because vascular inflammation is another prominent feature of atherosclerotic AAA [1]. We found that EP4 stimulation increased IL-6 production but decreased MCP-1 production in both hASMCs (**Figures 2E and G**) and human AAA tissue organ cultures (**Figures 2F and H**). These findings suggest that enhanced EP4 signaling may increase MMP activity and inflammatory response in AAA.

### Genetic Deletion of EP4 Reduced AAA Formation in vivo

Since the above experiments implied that EP4 stimulation has an exacerbating effect on AAA formation, we hypothesized that inhibition of EP4 signaling might have a salutary effect. We therefore examined the effect of genetic disruption of EP4 signaling by using EP4<sup>+/-</sup> mice, because the total knockout of EP4 is lethal during the neonatal period [18]. EP4 expression in EP4<sup>+/-</sup> mice was decreased to  $43 \pm 6\%$  (aorta) and  $63 \pm 10\%$  (heart), relative to that of wild-type mice ( $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ).