

原 著

mPGES-1 ノックアウトマウスを用いた鉄代謝蛋白 hepcidin の調節機能の検討

¹東京女子医科大学医学部第四内科学（主任：新田孝作教授）²東京女子医科大学総合研究所³東京都神経科学総合研究所神経薬理ヤブキ ヤスコ ツチヤ ケン タケミヤ タカコ ヤマガタ カナト ニッタ コウサク
矢吹 恭子¹・土谷 健¹・竹宮 孝子²・山形 要人³・新田 孝作¹

（受理 平成21年10月6日）

Analysis of the Regulatory Mechanism of the Iron Regulating Protein Hpcidin in mPGES-1 Knockout Mouse

Yasuko YABUKI¹, Ken TSUCHIYA¹, Takako TAKEMIYA²,
Kanato YAMAGATA³ and Kosaku NITTA¹¹Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University School of Medicine²Medical Research Institute, Tokyo Women's Medical University³Department of Neuropharmacology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

Hepcidin negatively modulates iron absorption in the small intestine and iron release by macrophages in the process of iron homeostasis. Recent studies have suggested that hepcidin is also the key mediator of the anemia in chronic kidney disease (CKD) and in inflammation. We investigated hepcidin expression under several stress conditions and the role of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1), which catalyzes the synthesis of one of the key modulators of inflammation, prostaglandin E₂ (PGE₂), in regulating hepcidin expression. We measured hepcidin mRNA expression in the liver and kidney by real-time PCR. Hepcidin expression was confirmed in the kidney as well as the liver, but the ratio of the mRNA level in the kidney to liver was almost 1:4,000. Exogenous stimulation (lipopolysaccharide injection) increased hepcidin expression in the liver and kidney, but endogenous stimulation (renal ischemia/reperfusion injury) caused it to increase only in the liver. We also examined hepcidin expression in mPGES-1 knockout mice, whose inflammation process is impaired, and the response of both mRNA levels to stress was attenuated. The serum creatinine elevation in the KO mice was mild. The results of this study suggested that hepcidin can be induced by endogenous and exogenous stress in the liver and to some extent in the kidney, and that its expression may be partially mediated by the prostaglandin synthase pathway.

Key words: hepcidin, ischemia reperfusion injury, knockout mouse, lipopolysaccharide, prostaglandin E₂

緒 言

ヘプシジンは25個アミノ酸からなる内因性抗菌ペプチドで、鉄代謝とも深い関わりがあり、主に肝で生成され、ヒトの血漿および尿中から分離・精製される¹⁾²⁾。鉄負荷およびlipopolysaccharide (LPS), Interleukine (IL)-6など炎症性刺激によりその発現が誘導されることも明らかとなった³⁾⁴⁾。ヘプシジン遺伝子ノックアウトマウスでは、消化管からの鉄吸収が亢進し、網内系細胞からの鉄遊離が促進し、肝臓での鉄沈着が引き起こされ、全身にヘモクロマ

トーシス様の鉄蓄積が見られる⁵⁾。一方、ヘプシジン遺伝子トランスジェニックマウスは生下直後、重篤な鉄欠乏性貧血のため死亡することが知られている⁶⁾。こうした実験的事実からヘプシジンが生体の鉄代謝を調節する役割を持つペプチドの一つとして注目されるようになってきた⁷⁾⁸⁾。ヘプシジン遺伝子の発現はほぼ肝臓に限局しているが、胃、大腸、肺、心臓、腎などにも発現を認める¹⁾。またヘプシジンの主たる作用が消化管からの鉄吸収と網内系からの鉄遊離の抑制であることから、感染、癌などの慢性炎

症状態にしばしば合併する貧血(慢性炎症性貧血)におけるヘプシジンの関与が想定されるようになり、ヘプシジンは鉄代謝を介した炎症と貧血の関係を説明するペプチドとしても注目されてきた⁹⁾。

今回、我々は炎症時におけるヘプシジンの調節機構を検討するため、LPS投与による敗血症モデル、腎動脈虚血後再灌流障害(ischemic re-perfusion injury; IRI)モデルを作製し、コントロールおよび誘導型プロスタグランジン E₂ (PGE₂) 合成酵素である microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1 ノックアウトマウス¹⁰⁾で、肝臓、腎臓におけるヘプシジン遺伝子発現の変化を検討し、PGE₂の関与に検討を加えた。

対象および方法

1. 実験動物とモデル動物の作製

PGE₂合成酵素である mPGES-1 ノックアウトマウス(mPGES-1 (-/-))を対象とし、コントロールには同マウスの野生型(mPGES-1 (+/+))を用いた¹⁰⁾。野生型マウスで腎臓および肝臓でのヘプシジン mRNA の基礎発現量を比較した。またそれぞれのマウスで以下の病態モデルを作製し、PG合成酵素欠損のヘプシジン発現への影響を検討した。

すべての実験動物は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て、NIHの実験動物の使用ガイドラインに準拠して施行した。

1) 敗血症(LPS)モデルの作製

体重約20~23g、8週齢雄の野生型および mPGES-1 (-/-) マウスを用いて、LPS 20 μ g/g 体重を腹腔内に投与した群を LPS 投与群 (n=9) とし、腹腔内に生食投与を施行した群をコントロール (n=9) とした。24時間後に採血を行い、血清クレアチニン(Cr)を測定、肝臓、腎臓を摘出して急速凍結し、-80 $^{\circ}$ C で保存後、以下に述べる方法で total RNA を抽出した。事前に投与する LPS は用量を検討し、致死率がコントロールできる最大用量を用いた。

2) 腎虚血再灌流障害(IRI)モデルの作製

同等のマウスを用いた。ペントバルビタール(大日本製薬(株)、東京)麻酔下で開腹し、両腎門部を剝離、両側腎動脈を30分間完全閉塞させた後開放し、腎臓を再灌流した群を IRI 群 (n=12) とし、開腹のみ行った群を Sham 群 (n=11) とした。再灌流後、24時間後に1)と同様の sampling を行った。

2. RNA の調整と Real-time PCR 法

ヘプシジン mRNA 発現の評価のため、マウスの塩基配列から primer を以下のように設計した。

ヘプシジン mRNA primer, forward (Fw); 5'-CCT GAG CAG CAC CAC CTA TC-3', reverse (Rv); 5'-ATG TCT GCC CTG CTT TCT TC-3'

ラットの腎臓および肝臓は、TRIzol (Invitrogen, CA, USA) を用いて total RNA の抽出を行い、-80 $^{\circ}$ C で保存した。それぞれ腎臓および肝臓の total RNA (2 μ g) を鋳型とし、oligo (dT) を使用して、TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (PE Applied Biosystems) を用いて逆転写酵素反応(RT)を行い、cDNA を合成した。

Real time PCR はそれぞれの cDNA を鋳型とし、SYBR green PCR 反応液(PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて PRISM 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystem, Foster City, CA) を用いて施行した。ヘプシジン mRNA の発現レベルは GAPDH を用いて標準化した。

3. 生化学のパラメータの測定

血液サンプルは、5,000rpm で10分間遠心し、血清を分離採取した。血清 Cr 濃度は、自動分析器(SRL, 東京)にて測定した。

4. 統計学的処理

測定値はすべて平均 \pm 標準誤差で示した。群間の変化は、unpaired Student's t-test で検討し、Bonferroni の補正を行って、p<0.05 を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 肝臓と腎臓でのヘプシジン mRNA の基礎発現の比較(図1)

mPGES-1 (+/+) マウスを用いて肝臓と腎臓のヘプシジン mRNA 発現を比較した。腎臓においても mRNA の発現は確認されたが、発現比率では、腎臓でのヘプシジン遺伝子発現レベルは肝臓とで1:4,000程度であり、mRNA 発現量には格差が認められた。

2. LPS モデルにおける腎機能およびヘプシジン mRNA 発現

1) 腎機能への影響

図2にLPS投与の mPGES-1 (+/+) マウスおよび mPGES-1 (-/-) マウスにおける血清 Cr 値を示した。両者で基礎値の Cr レベルには差がなかった。mPGES-1 (+/+) マウスの血清 Cr 値は 0.1 \pm 0.03 mg/dl から 0.35 \pm 0.09mg/dl まで上昇したが、mPGES-1 (-/-) マウスでは 0.12 \pm 0.05mg/dl から 0.22 \pm 0.11mg/dl で、その上昇が mPGES-1 (+/+) マウスに比較して軽度であった。それぞれの Cr 上昇

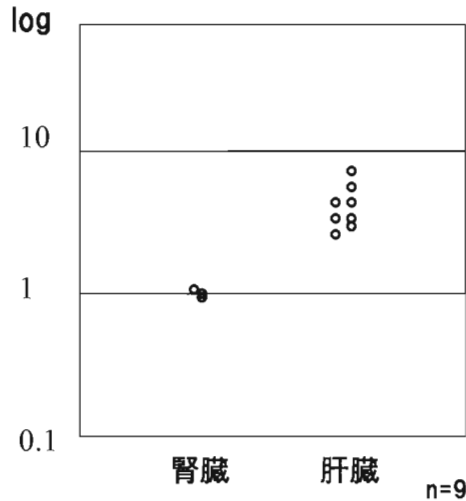


図1 腎臓および肝臓でのヘプシジン mRNA の発現
ヘプシジン mRNA の相対的発現を log 対数で示した。

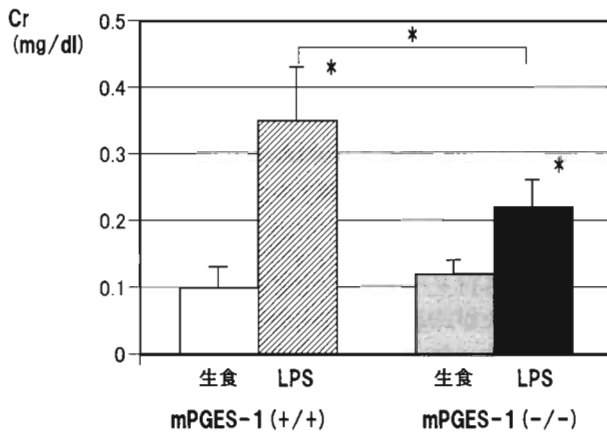


図2 LPS 投与による腎機能への影響

LPS 投与により、血清クレアチン(Cr)値は上昇したが、MPGES-1 (+/+) マウスに比して、MPGES-1 (-/-) マウスでの Cr 上昇は有意に軽度であった。

* $p < 0.05$

率には有意差が認められた (3.5 vs. 2.1 fold)。

2) 腎・肝でのヘプシジン mRNA 発現 (図3)

mPGES-1 (+/+) マウス, mPGES-1 (-/-) マウス各々の腎臓および肝臓のヘプシジン mRNA 発現を real-time PCR 法により検討した。腎臓での mRNA の発現は対象とした mPGES-1 (+/+) マウスでは有意に上昇したが, mPGES-1 (-/-) マウスでは上昇傾向がみられたものの, 有意差は認められなかった(図3a)。一方, 肝臓では3.5倍の発現誘導が観察され, mPGES-1 (-/-) マウスでも有意に上昇したが, その上昇率は mPGES-1 (+/+) マウスに比較して軽度であった(図3b)。

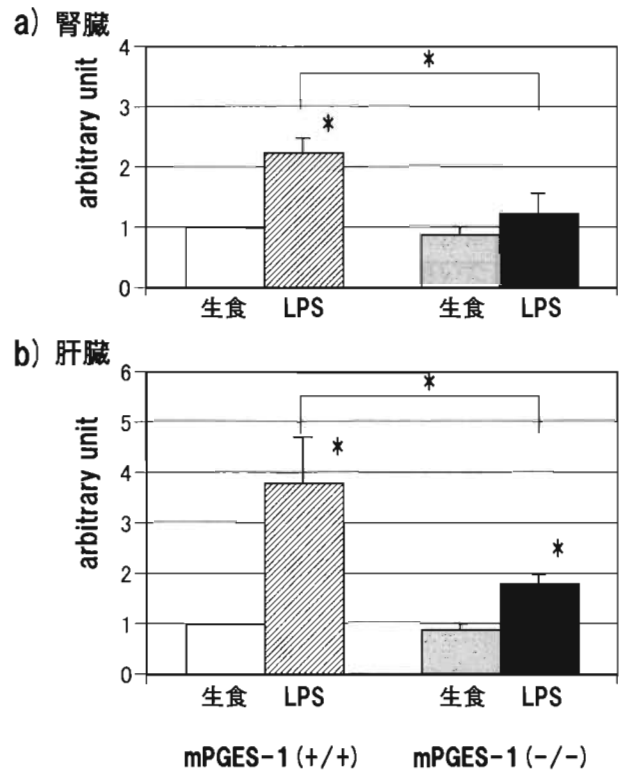


図3 LPS 投与による腎臓・肝臓でのヘプシジン mRNA 発現

a) MPGES-1 (+/+) マウスでは有意に上昇したが, MPGES-1 (-/-) マウスでは有意差はなかった。

b) MPGES-1 (+/+) , (-/-) マウスともにヘプシジン mRNA は上昇したが, MPGES-1 (-/-) マウスでの上昇は軽度であった。

* $p < 0.05$

3. IRI モデルにおける腎機能およびヘプシジン mRNA 発現

1) 腎機能への影響

図4にIRIおよびSham処置における血清Cr値を示した。mPGES-1(+/+)マウスの血清Cr値は $0.1 \pm 0.03 \text{ mg/dl}$ から $1.6 \pm 0.24 \text{ mg/dl}$ まで上昇したが, mPGES-1(-/-)マウスでは $0.12 \pm 0.08 \text{ mg/dl}$ から $1.32 \pm 0.32 \text{ mg/dl}$ で, その上昇が mPGES-1(+/+)マウスに比較して有意差はないが軽度であった。

2) 腎・肝でのヘプシジン mRNA 発現 (図5)

IRI 処置後の mPGES-1 (+/+) マウス, mPGES-1 (-/-) マウスにおけるヘプシジン mRNA 発現を図5に示した。腎臓では両者ともにヘプシジン mRNA の発現には有意な上昇がみられなかった。肝臓でのヘプシジン mRNA 発現は mPGES-1 (+/+) マウスでは, その発現の変化率が約2倍の有意な上昇を認めたが, mPGES-1 (-/-) マウスでは, 有意な上昇は認められなかった。

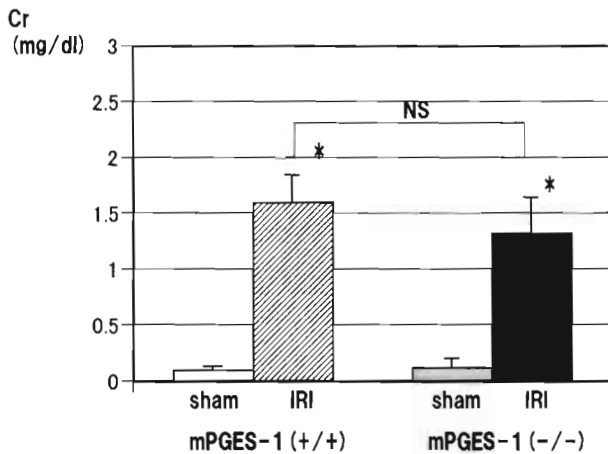


図4 IRIによる腎機能への影響

IRIにより, MPGES-1 (+/+), (-/-) マウスともに, 血清 Cr 値は上昇した.

* $p < 0.05$

考 察

ヘプシジンは炎症時に尿中に同定される抗菌作用を持つペプチドとして知られていた¹¹⁾. さらに血中にも存在し, 肝臓で作られ分泌されることがわかっていた⁷⁾. また, 鉄の過剰状態を呈するヘモクロマトーシスの病態の原因遺伝子となっているのがヘプシジンであることが明らかにされた⁵⁾. 別のグループはマウスに鉄負荷を行い肝臓で発現する遺伝子群の subtraction から鉄を調節する遺伝子としてヘプシジンを同定し¹²⁾, こうしてほぼ同時期にヘプシジンの存在が確立し, 遺伝子構造が4つのグループにより報告された¹¹⁾²⁵⁾¹²⁾. ヘプシジンは抗菌作用など炎症とリンクした鉄代謝に関わるホルモンとして注目され, その遺伝子, 蛋白構造が決定された. ヒトヘプシジンはアミノ酸84個(マウスは83個)からなるプレヘプシジンとして合成され, 25アミノ酸の活性型となる.

ヘプシジン mRNA の発現は主に肝臓に局限しているが, 腎臓での発現も報告されており, ヒト, マウス, ラット腎において皮質のヘンレのループの太い上行脚から接合尿細管, 髄質の太い上行脚と集合尿細管に染色性が報告されている¹³⁾. 今回 mPGES-1 (+/+) マウスで腎臓と肝臓でのヘプシジン mRNA の発現を比較し, 腎臓での発現は肝臓の約 1/4,000 倍であることを示した. 外因性の LPS 投与により, 誘導されるが, 腎でのヘプシジン発現が極端に少ないことで, その生理的意義は明らかではない. 尿路感染症のときに尿中の排泄が亢進するとされており, 局所での抗菌作用を発揮している可能性

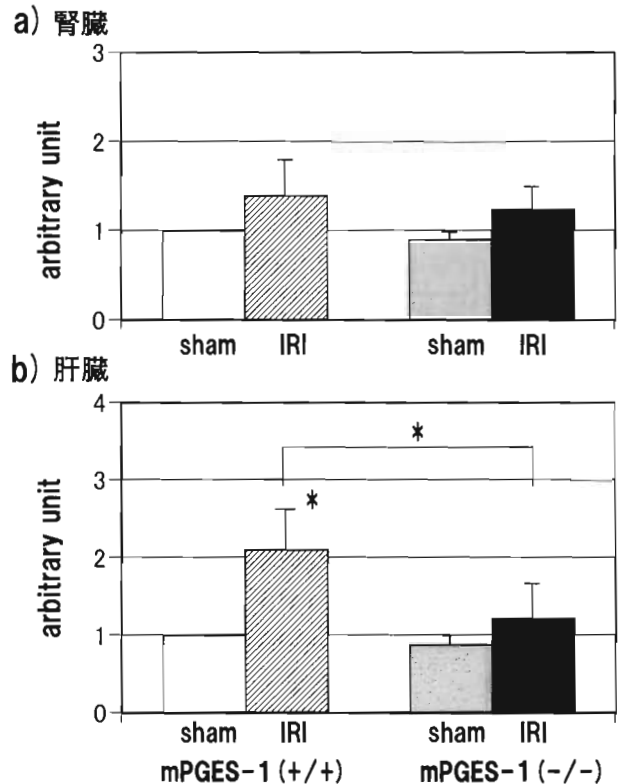


図5 IRIによる腎臓・肝臓でのヘプシジン mRNA 発現
a) MPGES-1 (+/+), (-/-) マウスともに, ヘプシジン mRNA の上昇は認められなかった.

b) MPGES-1 (+/+) マウスで有意にヘプシジン mRNA が上昇したが, MPGES-1 (-/-) マウスでは上昇が認められなかった.

* $p < 0.05$

はある¹⁴⁾.

ヘプシジン発現の誘導のために, 外因性 LPS 投与と, 内因性のストレスとして腎臓の虚血再還流を行った. LPS は既にヘプシジンの発現誘導の因子であることは明らかにされており, 肝でのヘプシジン mRNA の発現が上昇することは, 培養肝細胞¹⁵⁾およびマウスを用いた in vivo の実験において示されており, またこの発現は IL-6 に対する抗体で抑制されることから, IL-6 を介しての反応と考えられている⁴⁾. 実際, 今回の実験でも mPGES-1 (+/+) マウスの肝臓で著明な誘導作用が確認された. 同マウスの腎臓でも有意に mRNA は上昇しており, 腎発現のヘプシジンも同様の誘導反応を示すことが示された. IRI モデルでは, 酸化的ストレスによるアポトーシスを含んだ細胞死とその修復・増殖の過程, 炎症機転の大きな2つが腎障害の進行に関与するとされている¹⁶⁾¹⁷⁾. IRI 処置で, 腎での発現量には有意な変化がなく heat shock protein のような誘導性の蛋白ではなかったが, 肝臓では発現が惹起され, 腎

組織の障害に起因する炎症性の mediator がヘプシジン発現を誘導した可能性がある」と推測された。また最近の見解では、腎臓の虚血時にリポカリン family に属する neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) が腎組織で誘導され、鉄、ジデロフォアと結合して、組織保護作用を示すとする報告もあるが、その際に鉄の動態にも影響し、ヘプシジン発現にも作用する可能性が推測される¹⁸⁾。

さらに、本研究では炎症の mediator である PGE₂ 産生酵素の遺伝子改変マウスで、ヘプシジン発現の変化を観察した。LPS 投与における敗血症モデルでのヘプシジン mRNA 発現上昇は、肝ではプラセボ投与に比べ軽度で、腎臓でのヘプシジン発現に関しては、有意な変化はなかった。LPS による PGE₂ の産生促進や¹⁹⁾、また PG による IL-6 などの炎症性サイトカインの誘導²⁰⁾といった cross-talk が成立していることが知られているが、今回そのカスケードの一部である mPGES-1 が欠損するマウスでは、IL-6 を中心とした炎症性サイトカインのヘプシジン産生刺激効果が減弱していたものと推測された。腎臓において、mPGES-1 は COX-1, COX-2 と共発現し²¹⁾、定常時の PGE₂ 産生に関わっていることが知られている²²⁾。一方で、LPS 腹腔内投与後における腎臓内の mPGES-1 発現変化や尿中 PGE₂ 濃度変化を調べた報告はないが、LPS 投与は脳内で mPGES-1 の発現を誘導し、PGE₂ 産生を増強することが知られている²³⁾。本研究では、LPS 投与の mPGES-1 ノックアウトマウスでヘプシジン産生増強が野生型マウスに比べて少なかったことから、腎臓内にも脳同様のメカニズムが存在し、mPGES-1 由来の PGE₂ がヘプシジン産生増強に関与した可能性がある。一方、腎虚血による内因性のストレスも肝でのヘプシジン産生を誘導することを示したが、やはり mPGES-1 (-/-) マウスでは誘導が低下していた。虚血処理は COX-2 などを介して PGE₂ の産生を刺激するが、COX の阻害剤などの PG 産生阻害が、組織や機能障害を軽減することが報告されている²⁴⁾²⁵⁾。すなわち、PGE₂ は vascular endothelial growth factor (VEGF)、IL-6, macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 産生促進など炎症反応に関わる主要なメディエータであり²⁶⁾²⁷⁾、その代謝酵素である mPGES-1 を阻害することにより、PGE₂, IL-6 の産生を抑制、炎症を制御したことが推察され、このマウスでは同様なストレスの減弱作用が報告されている²⁸⁾。

今回、LPS 投与、IRI による急性腎障害モデルマウ

スにおいて、肝臓でのヘプシジン mRNA 発現の増加を示した。さらに mPGES-1 (-/-) マウスの実験から、PGE₂ の阻害が肝ヘプシジン mRNA 発現の抑制に関与している可能性が示唆された。ヘプシジンの発現が mRNA レベルのみで、蛋白発現や、血中レベルの測定がなされなかったことは、今回の検討の限界であるが、最近、proteinchip を用いた血中の測定が確立されたこともあり、今後データの裏打ちが可能となると考えられる。また、PGE₂ 合成の阻害がヘプシジン発現に影響を与えることは、その阻害薬の応用が臨床的利用に用いられる可能性がある。今後、高サイトカイン血症などに伴う慢性炎症性貧血などにおける、ヘプシジン調節機構の役割の解明やそれに基づく適切な治療法の確立が期待される。

謝 辞

本稿を終えるに当たり mPGES-1 ノックアウトマウスのご提供を頂いた大阪大学微生物病研究所の審良静男教授、植松智先生に深謝いたします。また、ご助言を頂いた芳田 工先生、実験に協力頂いた坪井真由子、宗川愛、寺岡敦子実験助手に深謝いたします。

本研究の一部は、腎性貧血研究会の助成によった。なお本研究の一部は 2006 年アメリカ腎臓学会 (San Diego, USA)、2007 年日本透析医学会総会 (大阪) において発表した。

文 献

- 1) Park CH, Valore EV, Waring AJ et al: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* **276**: 7806-7810, 2001
- 2) Krause A, Neitz S, Magert HJ et al: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* **480**: 147-150, 2000
- 3) Nicolas G, Chauvet C, Viatte L et al: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* **110**: 1037-1044, 2002
- 4) Nemeth E, Rivera S, Gabayan V et al: IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* **113**: 1271-1276, 2004
- 5) Nicolas G, Bennoun M, Devaux I et al: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8780-8785, 2001
- 6) Nicolas G, Bennoun M, Porteu A et al: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4596-4601, 2002
- 7) Detivaud L, Nemeth E, Boudjema K et al: Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic

- iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood* **106**: 746–748, 2005
- 8) **Ganz T**: Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* **102**: 783–788, 2003
 - 9) **Rivera S, Liu L, Nemeth E et al**: Heparin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood* **105**: 1797–1802, 2005
 - 10) **Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K et al**: Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* **168**: 5811–5816, 2002
 - 11) **Hunter HN, Fulton DB, Ganz T et al**: The solution structure of human heparin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* **277**: 37597–37603, 2002
 - 12) **Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B et al**: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide heparin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* **276**: 7811–7819, 2001
 - 13) **Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S et al**: The iron-regulatory peptide hormone heparin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* **184**: 361–370, 2005
 - 14) **Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R et al**: Detection of serum heparin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* **108**: 1381–1387, 2006
 - 15) **Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R et al**: STAT3 mediates hepatic heparin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* **109**: 353–358, 2007
 - 16) **Noiri E, Nakao A, Uchida K et al**: Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: 948–957, 2001
 - 17) **Nony PA, Schnellmann RG**: Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 905–912, 2003
 - 18) **Mori K, Lee HT, Rapoport D et al**: Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* **115**: 610–621, 2005
 - 19) **Shoji M, Tanabe N, Mitsui N et al**: Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E2 and the receptor Ep4 in osteoblasts. *Life Sci* **78**: 2012–2018, 2006
 - 20) **Zhao Y, Usatyuk PV, Gorshkova IA et al**: Regulation of COX-2 expression and IL-6 release by particulate matter in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**: 19–30, 2009
 - 21) **Schneider A, Zhang Y, Zhang M et al**: Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney Int* **65**: 1205–1213, 2004
 - 22) **Francois H, Facemire C, Kumar A et al**: Role of microsomal prostaglandin E synthase 1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* **18**: 1466–1475, 2007
 - 23) **Yamagata K, Matsumura K, Inoue W et al**: Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* **21**: 2669–2677, 2001
 - 24) **Feitoza CQ, Camara NO, Pinheiro HS et al**: Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Int Immunopharmacol* **5**: 79–84, 2005
 - 25) **Hochehl K, Schmidt C, Bucher M**: COX-2 inhibition attenuates endotoxin-induced downregulation of organic anion transporters in the rat renal cortex. *Kidney Int* **75**: 373–380, 2009
 - 26) **Lee SH, Kim MH, Han HJ**: Arachidonic acid potentiates hypoxia-induced VEGF expression in mouse embryonic stem cells: Involvement of Notch, Wnt, and HIF-1 α . *Am J Physiol Cell Physiol* **297**: C207–C216, 2009
 - 27) **Sugimoto Y, Fukada Y, Mori D et al**: Prostaglandin E2 stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via the prostanoid EP2 receptor in mouse peritoneal neutrophils. *J Immunol* **175**: 2606–2612, 2005
 - 28) **Wang M, Lee E, Song W et al**: Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* **117**: 1302–1309, 2008