

氏名	つちやひろよし 土屋裕義
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第650号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	Molecular Mechanisms of Prostaglandin E <sub>2</sub> Actions in the Preoptic Area (視索前野におけるプロスタグランジンE <sub>2</sub> の作用機構)
論文調査委員	(主査) 教授 中山和久 教授 伊藤信行 教授 根岸 学

### 論文内容の要旨

プロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub>は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) を律速酵素として産生される最も代表的なオータコイドである。PGE<sub>2</sub>は産生されると速やかに細胞外に放出され、産生局所に存在する特異的な受容体に結合して、多彩な作用を発揮する。例えば、PGE<sub>2</sub>は、末梢では痛覚過敏、炎症惹起、分娩誘導などを引き起こす。一方、PGE<sub>2</sub>は中枢神経系においても多彩な作用を発揮し、発熱やβアミロイド産生などの病態作用、さらには覚醒やストレス応答、オス性行動などの生理作用の発現に関わっている。PGE<sub>2</sub>の作用は、4種類の受容体サブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) を介して発揮されるが、これらPGE<sub>2</sub>の多彩な中枢神経作用の中で、関与する受容体サブタイプが同定されたものは僅かであり、またその分子メカニズムが明らかになったものはほとんどない。

このような背景のもと、著者は、中枢神経系のなかでも視床下部の視索前野に注目し、この部位に対してPGE<sub>2</sub>が示す二つの作用に焦点を絞り、PGE<sub>2</sub>とEP受容体による中枢神経調節の分子機構の同定を試みた。

第一章 プロスタグランジンE<sub>2</sub>-EP3受容体シグナルは、視索前野のGABA-A受容体の発現を減弱させ、発熱を引き起こす

視索前野には、体温中枢が存在することが知られる。PGE<sub>2</sub>は視索前野のEP3受容体に作用して発熱を引き起こすものと考えられていた。その根拠として、以下の点が示されている。①視索前野は超微量のPGE<sub>2</sub>投与に対して最も効果的に発熱応答が見られる。②PGE<sub>2</sub>受容体サブタイプのうち、EP3が最も豊富に視索前野ニューロンに発現している。③EP3欠損マウスは、末梢に発熱物質を投与しても全く発熱応答を示さない。④視索前野特異的EP3欠損マウスはPGE<sub>2</sub>による発熱を示さない。これらの知見にも関わらず、視索前野のEP3受容体発現ニューロンがどのような性質をもつのか、EP3受容体の活性化により具体的にどのような変化がニューロンに起こるのかは依然として不明であった。そこで著者は、視索前野のEP3発現ニューロンに焦点を当て、PGE<sub>2</sub>投与による遺伝子発現プロファイル変動を解析し、EP3受容体の下流で変化する標的遺伝子の同定を試みた。

その結果、cDNAマイクロアレイに搭載の8,544遺伝子のうち、PGE<sub>2</sub>投与によって1.5倍以上の発現亢進を示したものは3遺伝子であったのに対して、0.67倍以下に発現低下したものは60遺伝子であり、PGE<sub>2</sub>刺激により多くの遺伝子が顕著に発現低下することがわかった。なかでも、GABA-A受容体の複数サブユニット遺伝子の発現がともにPGE<sub>2</sub>投与で顕著に低下していた。そこでGABA-A受容体サブユニットの視索前野におけるmRNA発現パターンを調べたところ、GABA-A受容体α2、γ1、γ2の各サブユニットがEP3受容体mRNAの発現パターンに類似していた。そこで、正中視索前核 (MnPO) や内側視索前核 (MPO) の各ニューロンにおけるEP3受容体とGABA-A受容体サブユニット (α2あるいはγ2) の共発現を蛍光免疫染色により調べたところ、いずれの神経核においてもEP3発現細胞の70%以上がγ2受容体を発現し、85%以上がα2受容体を発現していた。次に視索前野全領域での、GABA-A受容体サブユニット (α2、γ1、γ2) のmRNA発現が、PGE<sub>2</sub>の脳室内投与によりどう変化するかを定量的RT-PCRを用いて経時的に調べたところ、PGE<sub>2</sub>は視索

前野における GABA-A 受容体の発現を低下させ、これは体温上昇と良い相関を示した。一方、EP3 受容体欠損マウスを用いて同様の解析を行ったところ、視索前野 GABA-A 発現と体温はいずれも変化しなかった。さらに視索前野全域での GABA-A 受容体  $\alpha 2$  サブユニットタンパク質発現レベルを調べたところ、 $PGE_2$  は  $\alpha 2$  サブユニットのタンパク質レベルを低下させたが、これは EP3 受容体欠損マウスでは見られなかった。

以上の結果から、視索前野の EP3 受容体発現ニューロンには GABA-A 受容体が共発現すること、 $PGE_2$  がこの EP3 受容体に作用すると GABA-A 受容体サブユニットの発現を低下させ、ニューロンの GABA 感受性を変化させる可能性が考えられた。このような  $PGE_2$ -EP3 シグナルによる視索前野ニューロンの質的な変化が  $PGE_2$  による発熱作用の分子機構となっているのかもしれない。

## 第二章 プロスタグランジン $E_2$ -EP4 受容体シグナルは、視索前野におけるオス特異的性ステロイド芳香化酵素発現とオス性行動の性的二型性発現に必須である

視索前野は、体温中枢が存在することに加えて、脳の性分化を担う領域である。視床下部の神経ネットワーク形成期、すなわち新生仔期にオス性腺に由来するテストステロンに暴露されることにより、メス型脳がオス型脳へと変換される。実際、メス新生仔ラットにテストステロンを投与すると成熟後の視索前野で性的二型核 (SDN) のオス特異的な発達とオス性行動が出現し、逆にオス新生仔を去勢すると SDN の退行とオス性行動の消失が見られる。ところが最近、メス新生仔に  $PGE_2$  を投与するとオス性行動が出現し、オス新生仔にインドメサシンを投与するとオス性行動が消失することが示され、性ステロイドによる脳のオス化に  $PGE_2$  が関与することが薬理的に示唆された。しかしながらこのような  $PGE_2$  によるオス性行動誘起作用が実際にオス新生仔で生理的に働いているのか、遺伝学的な証拠は存在せず、またどの EP 受容体によりどのような分子機構を介するのかは不明であった。このような視索前野での PG 作用の生理的意義ならびに関与する受容体を同定するため、著者は、EP 受容体欠損マウスのオス性行動を解析し、 $PGE_2$  によるオス性行動発現の分子機構の解析を試みた。

8 種類のプロスタノイド受容体欠損マウスのオス個体におけるオス性行動の発現を観察した。その結果、オス性行動の減弱を示したのは EP4 受容体欠損マウスのみであり、EP4 受容体欠損オスはオス性行動をほとんど示さなかった。これら EP4 欠損オスマウスの血中テストステロン濃度は、胎生期から成熟期まで野生型とほぼ同じレベルであったことから、オス性行動の消失は性腺異常に起因するものではないと考えられた。ところで、野生型の新生仔期には、視索前野に性ステロイド芳香化酵素がオス特異的にニューロンに発現し、この酵素の働きでテストステロンがエストラジオールに変換され、生成したエストラジオールが脳のオス化を引き起こすと考えられている。実際、野生型マウス新生仔の視索前野全領域で性ステロイド芳香化酵素の遺伝子発現量を比較したところ、オスはメスより有意に高値を示した。しかしながら、EP4 欠損マウスでは、オスでの発現はメスと同レベルであり、野生型メスとほぼ同じであった。性ステロイド芳香化酵素はニューロン特異的に発現することから、 $PGE_2$ -EP4 シグナルは、オス性行動の出現に必須の生理因子であり、これは新生仔期の視索前野でオス特異的に見られる芳香化酵素遺伝子の発現誘導を介して発揮されることが明らかとなった。

以上、著者は、視索前野における  $PGE_2$  の二つの神経作用、発熱とオス性行動発現について、その生理的意義と分子機構を明らかにした。これらの結果は、いずれも  $PGE_2$  がその受容体を介してニューロンの鍵遺伝子発現を調節し、発熱や性行動を規定する可能性を強く示唆するものであり、まだ明らかになっていない PG による中枢作用の分子機構を理解するための端緒になると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン (PG)  $E_2$  は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) を律速酵素として産生される最も代表的な脂質メディエーターである。 $PGE_2$  の作用は、4 種類の受容体サブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) を介して発揮されるが、これら  $PGE_2$  の多彩な中枢神経作用の中で、関与する受容体サブタイプが同定されたものは僅かであり、またその分子メカニズムが明らかになったものはほとんどない。このような背景のもと、著者は、中枢神経系のなかでも視床下部の視索前野に注目し、この部位に対して  $PGE_2$  が示す二つの作用に焦点を絞り、 $PGE_2$  と EP 受容体による中枢神経調節の分子機構の同定を試みた。

はじめに、著者は視索前野を中枢とする発熱についての解析を行った。これまでの研究から  $PGE_2$  は視索前野の EP3 受容

体に作用して発熱を引き起こすことがわかっているが、視索前野のEP3受容体発現ニューロンの特質やEP3受容体の活性化によって起こるニューロンの変化については依然として不明であった。そこで著者は、視索前野のEP3発現ニューロンに焦点を当て、PGE<sub>2</sub>投与による遺伝子発現プロファイル変動を解析したところ、PGE<sub>2</sub>刺激により多くの遺伝子が発現低下し、なかでもGABA-A受容体サブユニットの顕著な発現低下を見出した。そこでGABA-A受容体サブユニットの視索前野における発現パターンを調べたところ、GABA-A受容体 $\alpha 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ の各サブユニットはEP3遺伝子の発現パターンに類似し、実際にEP3発現細胞には $\gamma 2$ 、 $\alpha 2$ 受容体が共存していることを蛍光免疫染色により見出した。次に視索前野のGABA-A受容体サブユニット遺伝子のPGE<sub>2</sub>脳室内投与による発現変導を定量的RT-PCRを用いて経時的に調べたところ、PGE<sub>2</sub>は視索前野のGABA-A受容体の発現を低下させ、体温上昇と良い相関を示した。一方、EP3欠損マウスではGABA-A発現と体温はいずれも変化しなかった。

以上より、視索前野のEP3発現ニューロンにはGABA-A受容体が共発現していて、PGE<sub>2</sub>がこのEP3受容体に作用するとGABA-A受容体サブユニットの発現を低下させ、ニューロンのGABA感受性を変化させる可能性が考えられた。今回の結果はPGE<sub>2</sub>-EP3シグナルによる視索前野の神経の質的な変化がPGE<sub>2</sub>による発熱作用の分子機構である可能性を示唆するものである。

次に筆者は発熱と同様に視索前野を中枢とするオス性行動についての解析を行った。脳のオス化は新生仔期にテストステロンから変換されたエストロゲンに暴露することによって引き起こされることが知られている。最近メス新生仔にPGE<sub>2</sub>を投与するとオス性行動が出現し、オス新生仔にインドメタシンを投与するとオス性行動が消失することが報告され、性ステロイドによる脳のオス化にPGE<sub>2</sub>が関与することが示唆された。しかしながら、どのEP受容体によりどのような分子機構を介するのかは不明であった。そこで著者はオス性行動獲得に関与する受容体を同定するため、EP受容体欠損マウスのオス性行動を解析し、PGE<sub>2</sub>によるオス性行動発現の分子機構の解析を試みた。

その結果、EP4受容体欠損オスマウスでオス性行動が顕著に減弱していた。EP4欠損マウスの血中テストステロン濃度は、胎児期から成熟期まで野生型と同レベルであったことから、オス性行動の消失は性腺異常に起因するものではないと考えられた。一方で、新生仔期の視索前野ではテストステロンをエストロゲンに変換するアロマターゼ遺伝子の発現はEP4欠損オスマウスでは野生型に比べ発現が低く、メスの発現量と同レベルであった。このことから、EP4欠損マウスでみられたオス性行動の減弱は新生仔期のアロマターゼ発現低下によることが示唆された。つまり、PGE<sub>2</sub>-EP4シグナルは、オス性行動の出現に必須の生理因子であり、これは新生仔期の視索前野でオス特異的に見られるアロマターゼの発現誘導を介して起こることが明らかとなった。

これらの結果は、いずれもPGE<sub>2</sub>がその受容体を介してニューロンの鍵遺伝子発現を調節し、発熱や性行動を規定する可能性を強く示唆するものであり、まだ明らかになっていないPGによる中枢作用の分子機構を理解するための端緒になると考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。