

氏名	はたえのりゆき 波多江 典之
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第 686 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	複数のプロスタグランジン E ₂ 受容体サブタイプを介する相乗的な cAMP 産生効果
論文調査委員	(主査) 教授 市川 厚 教授 川 寄 敏 祐 教授 佐 藤 公 道

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG)E₂ はアラキドン酸から生成する生理活性脂質である。PGE₂ は産生細胞自身やその周辺細胞の細胞膜上に存在する、4 種類 (EP1, EP2, EP3, EP4) のサブタイプ受容体と結合して多彩な生体作用を発揮する。発現細胞系を用いた解析により、EP1 は細胞内 Ca²⁺ レベルの上昇、EP2 と EP4 は G_s 蛋白質と共役して細胞内 cAMP レベルの上昇、EP3 は G_i 蛋白質と共役して細胞内 cAMP レベルの減少、それぞれを惹起することが明らかにされている。サブタイプ受容体は生体の様々な細胞に発現しているが、中でも肥満細胞をはじめとする多くの血球系細胞では複数の EP サブタイプを発現していることが知られている。ところで、これまでの PGE₂-EP サブタイプの情報伝達の解析は、発現細胞での単一の EP サブタイプの解析から得られた知見を基にしており、複数の EP サブタイプが発現している細胞の情報伝達についてはわかっていない。そこで、複数の EP サブタイプ間での相互作用の解明を目的として、EP サブタイプの中でも、cAMP 産生において、上昇系受容体である EP2 または EP4 と、減少系受容体である EP3 との間に起こるであろうクロストークについて、COS-7 発現細胞系、および内在的に EP3 と EP4 を発現している癌化肥満細胞株 P-815 細胞を用いて解析した。

第一章 COS-7 発現細胞系における EP3 による EP2 の cAMP 産生の増強

COS-7 細胞に EP3β と EP2 を共発現させると、EP3β は EP2 による cAMP 産生を抑制するのではなく、逆に EP2 による cAMP 産生を増強することが明らかとなった。また、EP3β の代わりに EP3 の C 末端鎖を欠失させた変異体 T-335 を用いた場合にも、EP3 の選択的アゴニストである sulprostone 依存的に、cAMP 産生の増強が認められた。EP3 による cAMP 産生の増強は、G_{i/o} の阻害剤、および G 蛋白質の βγ サブユニットの捕捉剤では抑制されず、細胞内 Ca²⁺ のキレーターである BAPTA/AM 処理、およびカルモジュリン阻害剤である W-7 処理により抑制されたことより、本増強機構として G_i 非依存的な Ca²⁺/カルモジュリン経路に依存することが示唆された。

第二章 癌化肥満細胞株 P-815 細胞における EP3 による EP4 の cAMP 産生の増強

第一章において明らかとなった、COS-7 発現細胞系における EP3 による相乗的な cAMP 産生の効果が、マウスの細胞で起きているのかについて検討するため、癌化肥満細胞株 P-815 細胞を用いて、EP3 と EP4 の共刺激時における cAMP 産生の相乗性とその情報伝達機構について解析した。P-815 細胞における EP サブタイプの発現は、RT-PCR 法および [³H]PGE₂ 結合実験により、EP3 と EP4 であった。そこで、P-815 細胞における EP3 と EP4 の相乗的な cAMP 産生活性について検討したところ、EP3 は EP4 の cAMP 産生を増強することが明らかとなった。EP3 による cAMP 産生の増強は、EP4 による cAMP 産生効果における EC₅₀ 値には変化を与えなかったことより、EP3 は EP4 の感受性を亢進するのではなく、EP4 による cAMP の最大産生量を増強していることが示唆された。また、P-815 細胞における EP3 による増強作用は、W-7 により阻害されず、PT により阻害されたことより、COS-7 細胞の場合とは異なり、G_i 蛋白質の活性化に依存することが明らかとなった。

第三章 EP3 と EP4 の相乗作用による癌化肥満細胞株 P-815 細胞の細胞外基質への接着

癌化肥満細胞株 P-815 細胞において、EP3 と EP4 は相乗的に cAMP を産生することが示唆されたため、両受容体の相乗作用による細胞のフェノタイプ発現について、P-815 細胞と細胞外基質との接着活性を指標として解析した。細胞外基質としては、線維芽細胞への接着において主要な、フィブロネクチンの接着活性部位である RGD 配列への接着活性が最も高く、次いでラミニンの接着活性部位である IKVAV 配列、コラーゲン I の順であった。PGE₂ によるフィブロネクチンへの接着活性の誘導は cAMP-プロテインキナーゼ A (PKA) 依存的であることが示唆された。cAMP の産生同様、PGE₂ による接着が EP3 と EP4 の相乗的な作用によるかについて検討したところ、EP3 により EP4 を介した接着活性が約 1.5 倍に増強され、これは EP3 による cAMP 産生の増強と同程度であることが明らかとなった。これらの結果より、P-815 細胞での PGE₂ による cAMP 産生が、EP4 に機能的に拮抗すると考えられる EP3 を介して相乗的に増強され、その結果、細胞内に増大した cAMP は PKA の活性化の増強を介して、細胞と細胞外基質との接着増大に寄与することを明らかとした。

以上、本研究は、細胞上に Gs 共役型と Gi 共役型の PGE₂ 受容体サブタイプを発現した細胞における EP サブタイプ間の細胞内情報伝達のクロストークの実態を明らかにしたものであり、その成果は他の Gs 共役型受容体と Gi/Go/Gq 共役型受容体間における新たな情報伝達の解明に寄与するものである。さらに、医薬品の作用機構において複数の受容体間での相互作用を解析することの重要性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン E2 (PGE₂) 受容体には、異なる細胞内情報伝達系と共役する 4 種類のサブタイプ受容体 (EP1-EP4) が存在する。単一サブタイプを発現させた細胞を用いての解析により、EP2 と EP4 は Gs 蛋白と共役しアデニル酸シクラーゼ活性を促進する受容体として、また、EP3 は Gi 蛋白と共役し同活性を抑制する受容体として知られている。しかし、生体内の多くの細胞では同一細胞上に複数の EP サブタイプが発現していることが報告されているが、これら複数の受容体を介した細胞内情報伝達経路の制御については殆どわかっていない。本論文は、これまで不明であった EP サブタイプ間のクロストークが、EP2 と EP3 を共発現させた COS-7 発現細胞、および内在的に EP3 と EP4 を発現している癌化肥満細胞株 P-815 細胞において機能していることを明らかにしたものである。

著者は、まず EP2 と EP3 を共発現させた COS-7 発現細胞系において、EP3 が EP2 のアデニル酸シクラーゼ活性を抑制するのではなく、逆に増強することを見出した。また、この増強反応は Gi 蛋白の阻害剤や G 蛋白の $\beta\gamma$ サブユニットの捕捉剤の処理では抑制されず、細胞内の Ca²⁺ のキレーターである BAPTA/AM 処理、およびカルモジュリン阻害剤の処理により完全に抑制されることから、この増強反応が Gi 蛋白の活性化に非依存的な Ca²⁺/カルモジュリン経路を介することを証明した。

次いで、P-815 細胞が EP3 と EP4 を発現していることに着目し、アデニル酸シクラーゼ活性の増強反応が生体細胞でも起きるかどうかを検証した。その結果、P-815 細胞において EP3 は EP4 によるアデニル酸シクラーゼ活性を増強すること、さらに、この増強反応において EP3 は EP4 のアゴニスト親和性を変化することなく最大活性を増大させることを明らかにした。また、この増強反応は COS-7 の場合とは異なり、Gi 蛋白の活性化に依存するが Ca²⁺/カルモジュリンに依存しない経路で起きることを実験的に証明した。

P-815 細胞において EP3 と EP4 は相乗的にアデニル酸シクラーゼを活性化することが明らかにされたことから、著者は、両サブタイプ受容体の相乗作用による細胞のフェノタイプ発現について、P-815 細胞と細胞外基質との接着活性を指標として解析を行った。その結果、P-815 細胞は PGE₂ 依存的に細胞外基質であるフィブロネクチン、およびその接着活性部位である RGD 配列に強く接着することを見出した。このフィブロネクチンへの接着において、PGE₂ による接着活性の誘導は H-89 処理により抑制されることからプロテインキナーゼ A (PKA) 依存的であること、また、PGE₂ 処理は EP3 と EP4 に見られたアデニル酸シクラーゼ活性の増強反応と同様に接着活性を増大させることなどを明らかにした。これらのことから、著者は、P-815 細胞での PGE₂ によるアデニル酸シクラーゼ活性は EP4 に機能的に拮抗すると考えられる EP3 を介して相乗的に増強され、その結果、細胞内に増大した cAMP は PKA の活性化の増強を介して細胞と細胞外基質との接着活性の増大に機能するとの結論を導き出した。

以上、これらの研究成果は、EP サブタイプ間あるいは P-815 細胞だけでなく、他の Gs 共役型受容体と Gi 共役型受容

体間における新たな情報伝達の解明にも寄与するとともに、医薬品の作用機構において複数の受容体間での相互作用を解析することの重要性を示唆するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月18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。