

氏名	おい だ ひろ じ 笈 田 浩 次
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 673 号
学位授与の日付	平 成 14 年 7 月 23 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	プ ロ ス タ グ ラ ン ジ ン 受 容 体 の 構 造 , 機 能 お よ び 分 布 — プ ロ ス タ グ ラ ン ジ ン I <sub>2</sub> と D <sub>2</sub> 受 容 体 に つ い て —
論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川 厚 教 授 佐 藤 公 道 教 授 伊 藤 信 行

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 序論

プロスタグランジン (PG) は細胞膜のリン脂質から遊離されたアラキドン酸より生ずる一群の生理活性脂質であり, 各 PG に特異的な受容体に結合し多彩な生体作用を発揮する。PGI<sub>2</sub> は PGI<sub>2</sub> 受容体 (IP 受容体) に結合するが, PGI<sub>2</sub> あるいは PGI<sub>2</sub> 誘導体の反応性が組織間あるいは異種細胞間で異なっていることが判明し, 受容体サブタイプの存在, あるいは受容体に共役する G 蛋白質が一種以上存在する等の考察がなされてきた。これらの点を明らかにするために, IP 受容体のクローン化を試み, 受容体の構造, 情報伝達系および組織, 細胞における受容体発現分布を明らかにした。また PGD<sub>2</sub> のアレルギー反応あるいは中枢における PGD<sub>2</sub> の標的細胞やその役割は解明されていない。最近, マウスの PGD<sub>2</sub> 受容体 (DP 受容体) がクローニングされ組織分布について調べられたが, ノザン解析における脳での DP 受容体 mRNA の発現はほとんどなく, これまで示されてきた脳における PGD<sub>2</sub> の作用からは乖離したものであった。よって, これらの相違点を明らかにするために, 本実験では *in situ* hybridization 法を用いてマウス脳における DP 受容体の組織分布を調べた。

#### 第一章 マウスプロスタグランジン I<sub>2</sub> 受容体 (IP 受容体) の構造と機能に関する研究

マウス IP 受容体の cDNA クローニングを行い, その cDNA は 417 個のアミノ酸より成る 7 回膜貫通型の受容体蛋白質をコードし, 推定された分子量は 44722 であった。細胞膜貫通領域でのマウス各 PGE 受容体サブタイプあるいはトロンボキサン受容体との相同性は 30~40% であった。IP 受容体を動物細胞に発現させたところ, IP 受容体アゴニストの cicaprost, iloprost および PGE<sub>1</sub> に強い結合を示した。また同細胞を用いて細胞内情報伝達系を解析した結果, iloprost 添加により濃度依存的に cAMP の生成, さらに PI 代謝亢進も示すことが明らかとなった。ノザン解析から, これまで PGI<sub>2</sub> の標的臓器と考えられていた心臓や肺以外に, 免疫系臓器である胸腺や脾臓においても, IP 受容体の発現が確認された。

#### 第二章 マウス各組織における IP 受容体 mRNA の発現分布に関する研究

IP 受容体 mRNA のマウス各臓器における発現を *in situ* hybridization 法を用いて調べた。IP 受容体 mRNA とサブスタンス P 前駆体であるプレプロタキキニン A (PPTA), PGE 受容体サブタイプ EP1, EP3, EP4 それぞれの mRNA との脊髄後根神経節における分布関係についても, double *in situ* hybridization 法を用いて調べた。また腎臓においては, IP 受容体 mRNA とレニン mRNA の分布の関係についても調べた。IP 受容体 mRNA は, 胸腺では髄質の成熟胸腺細胞に, 脾臓では白脾髄の脾リンパ球, および赤脾髄の血小板の前駆体である巨核球にそれぞれ強発現していた。IP 受容体 mRNA は大動脈, 冠動脈, 肺動脈および脳動脈の平滑筋細胞に発現していたが, 静脈系には発現していなかった。これらより, 血小板と血管平滑筋細胞の IP 受容体は同一と考えられた。腎臓では小葉間動脈, 腎動脈にその発現が認められたが, レニン cRNA プローブでラベルされた傍系球体細胞 (JG 細胞) には発現していなかった。IP 受容体 mRNA が JG 細胞に認められないことから, レニン分泌における PGI<sub>2</sub> の作用は間接的である可能性が推察された。IP 受容体 mRNA は後根神経節において, 約 40% の大小の神経細胞に発現していたが, グリア細胞にその発現は認められなかった。PPTA mRNA は全神経細胞の内, 約 30% にその発現が認められ, その内, 約 70% が IP 受容体 mRNA を発現していた。また, EP1, EP3 および

EP4 の各 mRNA は後根神経節細胞において、それぞれ約30%、50%および20%の発現が認められ、さらに、各 EP 受容体 mRNA および IP 受容体 mRNA が共に発現している神経細胞も存在した。

### 第三章 マウスプロスタグランジン D<sub>2</sub> 受容体 (DP 受容体) mRNA のマウス脳における発現分布に関する研究

PGD<sub>2</sub> は神経細胞が多く存在する脳の灰白質に見出され、特に嗅球、視索前野および視床下部などにその存在が確認されている。また、PGD<sub>2</sub> をラットあるいはサルの視索前野に注入すると睡眠が誘発される。マウス脳内における DP 受容体発現部位を特定するために、マウス DP 受容体の cDNA をもとに *in situ* hybridization を行った。DP 受容体 mRNA は脳実質の神経細胞およびグリア細胞には存在せず、脳の実質を取り囲む leptomeninges (クモ膜および軟膜の総称) を構成する細胞に局在していた。また、DP 受容体 mRNA の局在を示すシグナルは、前脳の基底部および左右嗅球が重なる部位の leptomeninges に強く観察された。Leptomeninges における DP 受容体 mRNA の局在は、ノザン解析からも明らかにできた。

以上、著者はマウス IP 受容体の cDNA クローニングに成功し、細胞内情報伝達系として cAMP 上昇のみならず PI 代謝回転も惹起することを見出した。また、これまで PGI<sub>2</sub> の感受性臓器あるいは組織として知られていた心血管系以外に、胸腺、脾臓などの免疫系臓器および後根神経節においても IP 受容体の発現を確認した。また、睡眠誘発作用のある PGD<sub>2</sub> の脳中枢系における作用点のひとつとして、leptomeninges における DP 受容体の発現を見出した。本研究は、IP および DP 受容体の作働薬ならびに拮抗薬の臨床応用を提起するものとする。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、分子生物学的手法を用いてプロスタグランジン (PG) I<sub>2</sub> 受容体と PGD<sub>2</sub> 受容体の構造と機能、および細胞における発現分布を明らかにしたものである。

PGI<sub>2</sub> (IP) 受容体の研究において、著者は、まずマウス IP 受容体の遺伝子 cDNA のクローニングを世界に先駆けて単離し、アミノ酸の一次配列情報から IP 受容体は分子量44,722の7回膜貫通型 GPCR であることを明らかにした。次いで、cDNA を動物細胞に発現させ、IP 受容体の情報伝達系には G<sub>s</sub> と共役してアデニル酸シクラーゼを活性化させる系、および G<sub>q</sub> と共役してホスファチジルイノシトール (PI) 代謝を亢進させる系の2つがあることを解明した。次いで、IP 受容体はノザン解析により、従来から知られていた心臓や肺以外に、免疫系臓器である胸腺や脾臓に強く発現していることを発見した。さらに、*in situ* hybridization 法により、胸腺では髄質の成熟胸腺細胞に、脾臓では白脾髄の脾リンパ球および赤脾髄の巨核球に、血管系では大動脈、肺動脈、冠動脈等の平滑筋細胞に、また腎臓では小葉間動脈、腎動脈に発現していることを見出した。腎臓においては、従来から IP 受容体の発現が想定されていたレニンの分泌細胞である傍糸球体細胞には受容体が全く発現していないことを証明した。さらに著者は、脊髄後根神経節の神経細胞に IP 受容体が発現していることを見出し、同時に、IP 受容体発現細胞は PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプ (EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub>) およびプロタキニン受容体を高頻度で共発現していることを発見した。これらの成果は、神経細胞の機能や形態を制御する PG の働きを解明する際の貴重な基礎知見となる。

PGD<sub>2</sub> (DP) 受容体の研究においては、PGD<sub>2</sub> の自然睡眠との関係が薬理学的研究により証明されていることから、著者は、マウス脳における DP 受容体 mRNA の発現部位の確認を *in situ* hybridization 法およびノザン解析により行った。その結果、DP 受容体 mRNA は脳実質を取り囲む leptomeninges を構成する細胞に発現していることを明らかにした。この発見は DP 受容体アゴニストの開発に際して有益な知見となる。

以上、著者は、マウス IP 受容体の cDNA クローニングに成功し、細胞内情報伝達系を解明するとともに IP 受容体の発現細胞を同定し、その存在が従来ほとんど明らかでなかった免疫系臓器や脊髄後根神経節において IP 受容体が発現していること、さらに、DP 受容体に関しては leptomeninges において特異的に発現していることを初めて証明し、睡眠作用のある PGD<sub>2</sub> の作用点を解明した。これらの研究成果は IP および DP 受容体のアゴニスト、アンタゴニストの臨床応用を検討する際の有益な基礎知見となる。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14年5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。