

氏名	なかむらかずひろ 中村和弘
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第494号
学位授与の日付	平成14年3月25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	神経系におけるプロスタグランジン EP3 受容体の生理的役割及び分子機能に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 根岸 学 教授 市川 厚 教授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) E_2 は種々の刺激によって全身の組織で産生され、周辺の組織に作用し、様々な生理作用を示す。神経系においても、 PGE_2 が発熱、痛覚過敏、覚醒誘導などの多彩な作用を起こすことは薬理学的現象として有名である。しかし、これらの薬理作用の発現メカニズムについては未だに解明されていない。 PGE_2 の薬理作用は細胞膜表面に存在する G 蛋白質共役型の PGE 受容体を介して引き起こされるものと考えられている。近年、PGE 受容体として EP1 から EP4 の 4 つのサブタイプが cDNA クローニングされ、これらのなかでも EP3 受容体が神経系に最も多く発現している主要な PGE 受容体サブタイプであることが分かった。そこで著者は、 PGE_2 の多彩な生理作用機構を理解するには EP3 受容体の神経系における分布及び機能を調べるのが重要であると考え、以下の研究を行った。

第一章 プロスタグランジン EP3 受容体による百日咳毒素感受性及び非感受性経路を介したドーパミン遊離の抑制

これまでに、EP3 受容体は神経終末からの神経伝達物質遊離の抑制を引き起こすことが知られていたが、その作用に関与する細胞内分子機構に関しては全く明らかにされていなかった。そこで著者は、EP3 受容体を安定に発現する神経分泌細胞株である EP3B-PC12 細胞を用いて、この受容体を介したドーパミン遊離抑制に関与する細胞内情報伝達機構を解析した。この細胞株を刺激するとドーパミンが細胞から遊離され、これは EP3 受容体を特異的アゴニストである M & B28767 で活性化しておくことにより抑制された。細胞を予め百日咳毒素 (PT) で処理しておくこと、EP3 受容体による遊離抑制作用が大きく減弱した。しかしそれでも有意な抑制は観察された。EP3 受容体の活性化は遊離刺激によって生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制せず、また、 Ca^{2+} チャネルを介さずに細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることによって起こるドーパミン遊離を抑制した。以上の結果、EP3 受容体は PT 感受性及び非感受性の G 蛋白質経路を活性化し、 Ca^{2+} の細胞内流入以後のエキソサイトーシスの過程を遮断することによって神経伝達物質遊離の抑制を引き起こすことが示唆された。

第二章 ラット神経系におけるプロスタグランジン EP3 受容体の免疫組織化学的分布

EP3 受容体蛋白質の神経系における局在部位に関する情報は皆無に等しく、このことが神経系における PG 研究の大きな障壁となっていた。そこで著者は、脳・神経系における EP3 受容体の分布を明らかにする目的で、EP3 受容体を特異的に認識する抗体の作製を行った。イムノプロット法を用いて確認した結果、得られた抗体は EP3 受容体蛋白質に対し特異性及び反応性の高いものであった。この抗体を用いてラット脳・脊髄・末梢神経節における免疫組織染色を行った。EP3 受容体に対する免疫活性は脳・神経系の広い領域に渡って存在し、この受容体が様々な神経活動に関与していることが示唆された。特に自律神経の節前神経の存在する迷走神経背側核や脊髄中間質外側核などでは EP3 受容体免疫陽性の細胞が確認され、この受容体の自律神経調節への関与が示唆された。また、脊髄後角、後根神経節などが強く染色されたことから、EP3 受容体はこれらの部位において疼痛制御に関与する可能性が考えられた。さらに、孤束核及び迷走神経下神経節において免疫活性が観察され、内臓感覚の中枢への伝達を EP3 受容体が調節していることが示唆された。

これらの免疫組織染色実験において、脳幹の青斑核や縫線核群といったモノアミン神経核に分布する細胞体に EP3 受容

体免疫活性が見られた。そこで、抗 EP3 受容体抗体とモノアミン神経を特異的に染色する抗体を用いて、免疫蛍光二重染色を行った。その結果、大縫線核などの延髄の縫線核群では、ほぼ全てのセロトニン陽性細胞に EP3 受容体免疫活性が見られた。中脳の縫線背側核でも 6 割程度のセロトニン神経が染色された。ノルアドレナリン神経細胞群では、青斑下核のドーパミン- β -ヒドロキシラーゼ陽性細胞の約 7 割が EP3 受容体免疫活性を示した。青斑核にはノルアドレナリン神経細胞が高密度に集まっており、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、調べたノルアドレナリン神経細胞の全てが EP3 受容体免疫活性を示した。延髄縫線核のセロトニン神経は下向性に投射して脊髄における自律神経出力や痛覚伝達を調節しており、これらの神経のほぼ全ての細胞体に EP3 受容体が局在していたことから、PGE₂ はこの EP3 受容体を介してセロトニン神経系を調節することにより、自律神経機能制御や疼痛増強などの生理作用を引き起こしている可能性が示唆された。

第三章 プロスタグランジン E₂ による発熱誘発機構に關与する中枢神経経路

上記の免疫組織化学的解析の過程で、視索前野に強い EP3 受容体免疫活性を示す細胞群が観察された。視索前野は PGE₂ の発熱誘発作用における作用点であることが以前より知られており、また、PGE 受容体欠損マウスを用いた研究から、PGE 受容体サブタイプのなかでも EP3 受容体が発熱に必須であることが報告された。これらのことから、感染症などの時に脳内で産生される PGE₂ は視索前野の EP3 受容体発現神経細胞に作用し、これが引き金となって交感神経系の賦活化を引き起こし、発熱を誘発するという機構が考えられた。しかし、視索前野から交感神経系への神経伝達経路は不明のままであった。そこで著者は、このような神経伝達を中継する神経核の同定を試みた。PGE₂ をラット側脳室あるいは視索前野に投与すると、興奮した神経細胞のマーカーである Fos の発現が延髄淡蒼縫線核吻側部 (rRPa) の非セロトニン神経細胞群で上昇した。これらの神経細胞群の興奮を抑えるために GABA_A 受容体アゴニストであるムシモールを rRPa に注入すると、側脳室あるいは視索前野への PGE₂ 投与による発熱 (直腸温上昇) 及び褐色脂肪組織熱産生が遮断された。さらに、順行性の神経投射トレーサーである PHA-L を視索前野に注入すると rRPa に PHA-L 陽性の神経線維が観察され、また、逆行性の神経投射トレーサーである Fluoro-Gold を rRPa に注入すると視索前野の EP3 受容体発現神経細胞群の一部が標識された。これらの結果から、視索前野の PGE₂ シグナルは rRPa を介して交感神経系へと伝達され、発熱誘発を引き起こすものと考えられる。また、視索前野の EP3 受容体発現神経細胞から rRPa への直接の投射がこの発熱機構における神経伝達に關与する可能性が示唆された。

以上本研究は、神経系における EP3 受容体の分子機能及び組織内分布を解析し、さらに発熱という PGE₂ の代表的な生理作用の中枢神経機構を示したものであり、PGE₂ の多彩な神経機能のメカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン (PG) E₂ は様々な刺激に応じて全身の組織で産生され、多彩な生理作用を発揮するオートコイドである。神経系においても、PGE₂ は発熱、痛覚過敏、覚醒誘導など様々な神経作用を起こす。しかし、それらの発現メカニズムはまだ解明されていない。PGE₂ の作用は、細胞膜表面に存在する G 蛋白質共役ロドプシン型受容体の PGE 受容体を介しており、4 つのサブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) が存在する。これらのうち、脳・神経系では EP3 受容体が主要な発現サブタイプである。本論文は、脳神経系での EP3 受容体の神経機能を分子生物学的、組織化学的、また生理学的に体系的に研究したものであり、発熱という代表的な PGE₂ の中枢神経機能のメカニズムを解明したものである。

第一章では、EP3 受容体による神経伝達物質の遊離抑制作用の分子機構を PC12 細胞を用いて明らかにした。クローニングした EP3 受容体を発現させた PC12 細胞において、EP3 受容体は脱分極性、またはブラジキニンによるドーパミンの遊離を抑制した。この抑制は、細胞膜上にある Ca²⁺ チャネルに対する作用ではなく、分泌顆粒と細胞膜との融合による分泌機構そのものに対する抑制作用であった。さらに、EP3 受容体は百日咳毒素感受性、非感受性の 2 つの三量体 G 蛋白質の経路を介してこの抑制作用を発揮していた。

第二章では、EP3 受容体の N 末端のペプチドを用いて EP3 受容体特異的抗体を作成し、脳・神経系における EP3 受容体の発現部位を免疫組織化学的に解析した。その結果、EP3 受容体は脳・神経系の幅広い領域にわたって分布し、この受容体が様々な神経活動に關与していることが示唆された。特に、脳幹の青斑核や縫線核群といったモノアミン神経核に

EP3 受容体が強く発現しており，EP3 受容体はセロトニン神経系を調節することにより，自律神経機能制御や疼痛増強などの生理作用を引き起こしている可能性を示唆した。

第三章では，PGE₂ のもっとも代表的な神経機能の1つである発熱誘導作用に関わる神経経路の解析を行った。第二章の免疫組織化学的解析の過程で，視索前野に EP3 受容体が強く発現する細胞群が存在した。視索前野は PGE₂ の発熱誘導作用における作用点であることが以前より知られており，視索前野に発現している EP3 受容体発現神経細胞からの発熱に関わる神経投射を調べた。視索前野の EP3 受容体を PGE₂ で刺激すると，延髄淡蒼縫線核吻側部 (rRPa) の非セロトニン神経細胞群が活性化され，順行性・逆行性神経投射トレーサーで視索前野の EP3 受容体発現細胞から rRPa に神経投射が明らかとなった。また，視索前野の EP3 受容体の PGE₂ 刺激による発熱作用が GABA_A 受容体アゴニストのムシモールを rRPa に投与することにより抑制され，また，視索前野の EP3 受容体発現細胞の一部が GABA 作動性神経細胞であったことから，通常，視索前野から rRPa への GABA 作動性神経により rRPa の神経は常時抑制されており，感染時などで産生される PGE₂ がこの視索前野の神経を抑制性の EP3 受容体を介してこの抑制を解除し，発熱を引き起こすことが推察される。

以上本研究は，神経系における EP3 受容体の分子機能及び組織内分布を解析し，さらに発熱という PGE₂ の代表的な生理作用の中樞神経機構を示したものであり，PGE₂ の多彩な神経機能のメカニズムの解明に寄与するものと思われる。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。

更に，平成14年2月28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。