

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	稲住 知明
論文題目	Roles of Prostaglandin EP4 Receptor in Adipocytes (脂肪細胞におけるプロスタグランジンEP4受容体の機能解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<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、近傍の細胞膜表面上に存在する4種類の特異的受容体サブタイプEP1、EP2、EP3、EP4に作用して多彩な生理活性を示す。種々のプロスタグランジンは古くから脂肪細胞分化や脂肪分解を正負に調節することが示されていたが、関与する受容体やその生理的意義についてはほとんど不明であった。そこで著者は、脂肪細胞の分化や機能調節におけるEP4受容体の生理機能解析を目的として、以下の実験をおこなった。</p>			
第一章 内因性プロスタグランジンE <sub>2</sub> -EP4受容体シグナルはマウス胎児繊維芽細胞の脂肪細胞分化を抑制する			
<p>マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を分化誘導剤で2日間処理し、さらに6日間培養すると、細胞内トリグリセリド (TG) 含量ならびに分化マーカー<i>Pparg2</i> 遺伝子の発現が亢進し、脂肪細胞へと分化する。著者は本MEF脂肪細胞分化系を用いて、脂肪細胞分化に対する内因性プロスタグランジンの寄与を調べた。野生型MEFをインドメタシン存在下で分化培養すると、TG含量と<i>Pparg2</i>発現のレベルが増加した。この際、インドメタシン群では、分化した脂肪細胞数が増加し、分化細胞あたりのTG含量には差がなかった。分化誘導処理時のMEFでは、EP4受容体およびPGF<sub>2α</sub>受容体 (FP) の機能的な発現が認められ、PGE<sub>2</sub>とFPアゴニストはそれぞれインドメタシンで亢進したTG含量と<i>Pparg2</i>レベルを抑制した。FP欠損MEFでは、分化培養により野生型と同様のTG含量と<i>Pparg2</i>発現レベルを示し、インドメタシンによる両指標の亢進も野生型と同様に観察された。一方、EP4欠損MEFを分化培養した場合は、野生型MEFをインドメタシン存在下で分化培養した場合と同様、分化細胞数、TG含量、<i>Pparg2</i>発現レベルの亢進が観察され、インドメタシンはこれらの指標に影響しなかった。野生型MEFを分化誘導剤で処理する2日間だけインドメタシンを添加しても分化レベルが亢進した。そこで、野生型MEFのCOX発現量とPGE<sub>2</sub>産生量を調べたところ、分化誘導剤処理後1-3時間をピークとして、COX-2の発現およびPGE<sub>2</sub>の産生がともに亢進した。以上の結果から、MEFでは分化誘導剤の処理によって誘導されるCOX-2によってPGE<sub>2</sub>が産生され、これがオートクライン的にEP4受容体に作用し、脂肪細胞の分化を抑制すると考えられた。</p>			
第二章 プロスタグランジンE <sub>2</sub> -EP4受容体シグナルは、脂肪細胞のインスリン応答と脂肪分解を制御することで、脂質の恒常性を維持する			
脂肪細胞におけるEP4受容体の生理機能を個体レベルで解析するため、EP4欠損マ			

ウスの表現型を解析した。通常食条件下において、8週齢のEP4欠損マウスでは野生型マウスに比べ、体重および白色脂肪組織（WAT）重量が増大していた。一方、脂肪組織以外の臓器においては、重量に大きな差はみられなかった。EP4欠損WATでは、脂肪細胞径が増大し、脂肪細胞数に差を認めなかった。EP4欠損マウスでは、体脂肪量が増大しているにも関わらず、インスリン感受性は野生型マウスより亢進しており、アディポネクチンやレジスチンといったアディポサイトカインの血中濃度も野生型と同程度であった。マイクロアレイ解析により野生型とEP4欠損WATの遺伝子発現を比較したところ、EP4欠損WATではインスリン応答性遺伝子群の発現が顕著であり、インスリン作用亢進に起因する可能性が考えられた。野生型マウスにインスリンを投与するとWATでAktのリン酸化が見られるが、EP4作動薬投与はこのインスリン応答を抑制した。肝臓や骨格筋ではEP4作動薬によるインスリン応答の抑制はみられなかった。

インスリンが脂肪細胞に作用すると脂肪分解を抑制する。そこで、EP4受容体が脂肪分解のレベルでもインスリン作用に拮抗するかどうかを検討した。EP4欠損WATでは、脂肪分解に必要なリパーゼの発現や活性化レベルが低下していた。実際に、*ex vivo* 脂肪分解アッセイでも、EP4作動薬は野生型WATの脂肪分解を亢進させ、EP4欠損WATでは野生型よりも脂肪分解が低下していた。さらに、EP4欠損マウスでは、血中の遊離脂肪酸レベル、肝臓へのTG蓄積が野生型に比して低下していた。以上の結果から、 $\text{PGE}_2$ -EP4受容体シグナルは、個体レベルでのインスリン作用の抑制と脂肪分解の亢進を引き起こし、脂肪組織への脂質蓄積を負に制御しているものと考えられた。

以上、著者は、 $\text{PGE}_2$ -EP4受容体シグナルの脂肪細胞における新たな生理作用を明らかにした。これらの結果は、肥満や糖尿病などの代謝性疾患の治療や予防を考えるうえで重要な基礎的知見であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

プロスタグランジン(PG) $E_2$ 受容体を介して発揮される様々な生理病態作用の分子メカニズムを理解することは、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の副作用の回避や本受容体を標的とした薬剤開発に必須の課題である。PGE $_2$ は古くから脂肪細胞の分化を制御しうることが知られ、生理的な体脂肪量の調節に関与する可能性が示唆されてきた。それにも関わらず、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に関与するPGE受容体のサブタイプやその分子機構についてはほとんどわかっていないのが現状であった。そこで著者は、これらの点を解明するために二つのアプローチをとった。まず第一章では、生理的な脂肪細胞分化になるべく近い*in vitro*脂肪細胞分化モデルとしてマウス胎児繊維芽細胞(MEF)培養系を用いて、分化誘導剤に対する脂肪細胞分化がPG産生阻害剤や各受容体欠損でどのように変化するかを体系的に解析して、脂肪細胞分化に関与するPG受容体の同定、およびPG産生機構の解明を試みた。さらに第二章では、EP4受容体欠損マウスの白色脂肪組織重量が野生型に比して亢進する点に着目し、これがEP4受容体による脂肪細胞分化抑制の解除によるのか、それとも全く別の分子機構を介するのかについて検討した。これらの解析の結果、以下の知見を得た。

著者はまず、MEFから脂肪細胞への分化系において、EP4受容体およびPGF $_{2\alpha}$ 受容体(FP)の機能的な発現を確認した。そして、インドメタシンがトリアシルグリセロール含量と分化マーカー*Pparg2*の発現量を増大させること、この増大は分化した脂肪細胞数の増加に起因すること、PGE $_2$ およびFPアゴニストはインドメタシンの作用を打ち消すこと、EP4欠損がインドメタシン作用を模倣するがFP欠損は模倣しないことを見出し、内因性のPGE $_2$ -EP4受容体シグナルが脂肪細胞分化を負に制御することを発見した。著者はまた、インドメタシンの分化亢進作用は分化初期の二日間だけの処理でも再現できること、COX-2発現とPGE $_2$ 産生は分化処理後1-3時間をピークとして亢進することを見出し、MEFでは分化誘導処理で誘導されるCOX-2によってPGE $_2$ が産生され、これがオートクライン的にEP4受容体に作用し、脂肪細胞の分化を抑制することを示した。本成果は、生理的な脂肪細胞数の規定に内因性PGE $_2$ -EP4受容体シグナルが関与する可能性を初めて明らかにしたものであり、脂肪組織の発生や病態変化におけるPGE $_2$ の役割を理解する上で貴重な発見である。

続いて著者は、EP4受容体欠損マウスを用いて、脂肪細胞におけるEP4受容体の生理機能を個体レベルで解析した。その結果、EP4欠損は体重および白色脂肪組織(WAT)重量を増大させ、この増大は細胞数ではなく細胞の径の増大に起因すること、EP4欠損はインスリン作用を亢進させ、EP4作動薬は脂肪細胞におけるインスリン依存性のAktリン酸化を減弱させることを見出し、PGE $_2$ がEP4受容体を介して脂肪細胞のインスリンシグナルに拮抗する可能性を示した。さらに著者は、EP4作動薬が脂肪細胞の脂肪分解を亢進させること、EP4欠損が脂肪分解を低下させ、この低下は脂肪分解に必

要なリパーゼの発現や活性化のレベルの低下に起因することを見出した。これらの成果は、PGE<sub>2</sub>-EP4受容体シグナルが脂肪細胞でのインスリン作用に対して拮抗することによって、脂質蓄積を負に制御することを明らかにしたものであり、インスリン作用の局所調節機構の理解に貢献するとともに、代謝性疾患の新たな治療標的としてのPG受容体の有効性を考える上で重要な基礎知見となるものである。

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26年2月27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。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、(当分の間)当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：平成27年3月23日以降