

|           |                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------|
| 氏 名       | やまね はな 英                                               |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (薬 学)                                              |
| 学 位 記 番 号 | 薬 博 第 469 号                                            |
| 学位授与の日付   | 平 成 13 年 3 月 23 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    | 炎症に關与するプロスタグランジン E <sub>2</sub> 受容体サブタイプの同定とその機能に關する研究 |

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

炎症は、主に、肥満細胞から放出されるメディエーターの働きにより惹起され、血管透過性の亢進や、局所組織への好中球、好酸球などの浸潤が起こり、それら炎症性細胞の働きにより複雑に制御される生体防御反応である。プロスタグランジン (PG) は、炎症のメディエーターとして知られており、PG 合成阻害薬であるアスピリン様化合物が抗炎症剤として繁用されている。PG の中でも、PGE<sub>2</sub> は、炎症の抑制に働くのか、あるいは炎症の増悪に働くのかについては、明らかではない。その原因は、PGE<sub>2</sub> の働きが情報伝達を異にする 4 種類の受容体サブタイプ EP1, EP2, EP3, EP4 を介して行われること、また、PGE<sub>2</sub> が炎症に關与する細胞のそれぞれにおいて異なる作用動態を示すことにあると考えられている。最近、4 種類の受容体のクローニングがなされ、それぞれの遺伝子欠損マウスが作製された。そこで、炎症における PGE<sub>2</sub> の役割を受容体サブタイプのレベルで解明することを目的として、in vivo での炎症モデル、及び in vitro でのマウス好中球、骨髓由来肥満細胞 (BMMC) を用いて解析を行った。

#### 第一章 in vivo マウス炎症モデルを用いた PGE<sub>2</sub> 受容体の作用の解析

炎症の初期反応として、抗原抗体反応による肥満細胞の脱顆粒と、放出されたメディエーターによる血管透過性の亢進があげられる。この一連の過程は実験動物を用いる受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応により評価されている。そこで、PGE<sub>2</sub> 受容体欠損マウスに PCA 反応を惹起させ、その応答反応を指標に PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプの関与について検討した。その結果、EP3 欠損マウスで野生型マウスに比べて強い血管透過性の亢進のあることが見出され、PGE<sub>2</sub> は EP3 受容体を介して PCA 反応を抑制していることを示唆した。

肥満細胞の關与する反応に続いて、好中球、好酸球、リンパ球などの炎症性細胞が炎症局所の組織に浸潤する。これらの炎症性細胞から放出される活性酸素やサイトカインなどに対する組織反応の結果、いわゆる遅発性の炎症反応が進展すると考えられている。そこで、遅発性反応の代表的な実験動物モデルである卵白アルブミン誘発性喘息モデルを PGE<sub>2</sub> 受容体欠損マウスに適応して、PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプの働きを評価した。その結果、EP3 欠損マウスにおいて、肺への浸潤細胞数が多く、それら細胞は好中球、好酸球、リンパ球などの炎症性細胞であった。また、肺洗浄液中に含まれる Th2 型サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) が EP3 欠損マウスで顕著に増加し、Th1 型サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) は変化しなかった。しかし、EP3 欠損マウスの IgE 産生量や肺におけるケモカイン発現量には野生型と差は認められなかった。これらの結果から、抗原の暴露によって引き起こされる肺の炎症性細胞の浸潤に対して、PGE<sub>2</sub> は EP3 受容体を介して抑制効果を示すことが明らかになった。

#### 第二章 マウス好中球と骨髓由来肥満細胞を用いた in vitro での PGE<sub>2</sub> 受容体の作用の解析

好中球は、炎症の発症から数時間後に局所に浸潤し、非特異的な防御反応をになう細胞である。好中球は種々の刺激に应答し、活性酸素やサイトカインを細胞外に放出する。まず、活性酸素の産生に關わる細胞内シグナルを検討し、従来プロテインキナーゼ C の關与が示唆されていたが、新たにチロシンキナーゼの關与のあることを明らかにした。次いで、サイト

カインの産生・放出がPGE<sub>2</sub>で制御される可能性を示唆する報告に着目して、マウス好中球のPGE<sub>2</sub>受容体の作用を受容体欠損マウスを用いて解析した。マウス腹腔より単離した好中球はEP2とEP4受容体を発現していた。好中球をリポポリサッカライド(LPS)で処理すると、TNF- $\alpha$ とIL-6の産生が認められた。LPSと同時にPGE<sub>2</sub>を添加すると、TNF- $\alpha$ の産生は抑制されたが、IL-6の産生は逆に促進した。このサイトカイン産生制御におけるEP2とEP4の関与を明らかにするために、EP2、EP4欠損マウスから好中球を調製し、EP2、EP4選択的アゴニストの作用を検討した。その結果、TNF- $\alpha$ の産生抑制にはEP4受容体が、IL-6産生の亢進にはEP2受容体が、それぞれ関与していることが明らかとなった。

一方、PCA反応の結果から、肥満細胞の活性化にEP3受容体の調節作用が示唆されたので、その事実を証明するためにマウスの骨髓由来肥満細胞(BMMC)を用いてin vitroでの解析を行った。BMMCは野生型マウスとEP3欠損マウスの骨髓細胞を培養して作製した。その結果、野生型マウス由来のBMMCは、EP3とEP4受容体を発現していた。野生型マウスとEP3欠損マウスのBMMCをIgE-特異抗原で刺激し、放出されたヒスタミン量を測定したところ、EP3欠損マウス由来BMMCは野生型に比して大量のヒスタミンを分泌した。このことから、BMMCでのEP3受容体は抗原抗体反応によるヒスタミン分泌を負に制御していることがわかった。

以上、本論文は炎症におけるPGE<sub>2</sub>受容体サブタイプの関与について、in vivoにおける炎症モデルとin vitroにおける好中球および骨髓由来肥満細胞を用いた検討から、1) 肥満細胞の関与する炎症反応に対して、EP3受容体は負の制御因子として機能していること、2) 好中球において、EP4を介したTNF- $\alpha$ 産生の抑制と、EP2を介したIL-6産生の亢進という、異なるサイトカイン産生の制御をしていることを初めて明らかにした。これらの知見は、炎症反応に特異的な薬剤の開発研究に貢献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E2(PGE<sub>2</sub>)は、炎症反応の進展を制御することが知られている。一方、PGE<sub>2</sub>受容体には、情報伝達の仕組みが異なる4種類のサブタイプ受容体(EP1, EP2, EP3, EP4)が存在する。このことから、PGE<sub>2</sub>の関与する炎症反応を受容体レベルで調節する医薬品の開発には、PGE<sub>2</sub>が炎症反応のどの段階で、どの細胞において、どのサブタイプ受容体に働くかを明らかにする必要がある。本論文は、各サブタイプ受容体欠損マウスを用いて、in vivo実験により炎症反応に関与するサブタイプ受容体の同定を行い、次いでin vitro実験により炎症細胞でのサブタイプ受容体の働きを検討したものである。

著者は、まず、即時性炎症モデルである受動皮膚アナフィラキシー(PCA)と遅発性炎症モデルである卵白アルブミン誘発性喘息を各サブタイプ受容体欠損マウスに惹起させ、反応を媒介するサブタイプ受容体の同定を行った。その結果、PCA反応では、EP3欠損マウスが野生型マウスに比べて強い血管透過性亢進を起こすこと、また、卵白アルブミン誘発性喘息では、EP3欠損マウスにおいて、好中球、好酸球、リンパ球の肺への浸潤数の増加が認められた。さらに、EP3欠損マウスは肺洗浄液中のTh2型サイトカイン量(IL-4, IL-5, IL-13)が高く、Th1型サイトカインやケモカイン量は変化しなかった。これらの結果から、著者は、PGE<sub>2</sub>がEP3受容体を介してPCA反応および卵白アルブミン誘発喘息を負に制御することを明らかにした。

PCA反応は、抗原-抗体刺激による肥満細胞からのヒスタミン分泌により起こることから、著者は、PGE<sub>2</sub>が肥満細胞にあるEP3受容体に結合してヒスタミン分泌を抑制すると仮説し、マウス肥満細胞(BMMC株)を用いてそれを実証した。すなわち、BMMCはEP3を発現していること、また、EP3欠損マウス由来BMMCは、野生型マウス由来BMMCに比べて抗原-抗体刺激によるヒスタミン分泌を強く起こすことから、PGE<sub>2</sub>は肥満細胞のEP3と反応してヒスタミン分泌を負に制御することを明らかにした。

炎症細胞の中で、好中球は非特異的な刺激に対する防御反応に働く細胞であるが、これまでPGE<sub>2</sub>の作用の有無に関しては報告がなかった。そこで、著者は、受容体欠損マウスの腹腔性細胞から好中球を調製し、LPS刺激による好中球からのサイトカイン分泌に対するサブタイプ受容体の関与の有無を検討した。その結果、好中球はEP2とEP4受容体を発現していること、また、LPS刺激によるサイトカイン産生反応において、EP2受容体はIL-6の産生を正に、EP4受容体はTNF- $\alpha$ の産生を負に、それぞれ制御することを明らかにした。

以上、著者は、炎症における  $\text{PGE}_2$  受容体サブタイプの働きについて、PCA 反応と卵白アルブミン誘発性喘息モデルでは EP3 受容体により、また、好中球のサイトカイン産生では EP2 と EP4 受容体により調節されていることを明らかにした。これらの内容は、炎症の制御において、 $\text{PGE}_2$  サブタイプ受容体特異的な薬物を適用する際に役立つ基礎的知見である。

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13年2月15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。