

氏 名	つちやそうけん 土屋創健
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博第543号
学位授与の日付	平成16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	プロスタグランジンE受容体サブタイプEP2の遺伝子発現機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 中山和久 教授 川寄敏祐 教授 伊藤信行

論文内容の要旨

プロスタグランジンE₂ (PGE₂) 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る代表的なプロスタノイドであり、近隣の標的細胞上の特異受容体に作用して、多彩な生物活性を示す。COXには、2種類のアイソザイムが存在し、COX-1は恒常的に発現するのに対して、COX-2はホルモンや炎症性刺激により発現誘導され病態機能に関与すると考えられている。一方、PGE₂受容体には、EP1からEP4まで4種類のサブタイプが存在し、異なる情報伝達系に共役して多彩な生理作用の一端を担うものと考えられている。しかしEP2からEP4はともにE型PGに高い特異性を示し、cAMP産生系に共役することから、両受容体がどのように使い分けられるのか興味深い点であった。著者の所属する研究室では、EP4が様々な臓器で発現するがEP2は健常なマウスの臓器ではほとんど発現が見られないこと、またEP2は子宮上皮では着床期待特異的に、腹腔マクロファージではリポ多糖 (LPS) の添加によりそれぞれ発現が誘導されることを見出し、EP2はCOX-2のように誘導型の受容体である可能性が想定された。そこで、著者はEP2の発現ならびに発現誘導を遺伝子レベルで捉え、その転写活性化の調節機構を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

第一章 プロゲステロン受容体を介するプロスタグランジンE受容体EP2の転写誘導機構の解析

EP2は、子宮内膜上皮に着床期待特異的に発現誘導を受けることから、マウスEP2遺伝子が子宮では着床期に亢進する黄体ホルモン、プロゲステロンにより転写活性化を受けるのではないかと仮説を立てた。まず卵巣切除した雌マウスにプロゲステロンを投与して、24時間後の子宮におけるEP2 mRNAの発現を観察したところ、その発現レベルは4倍に亢進していた。そこで、このプロゲステロン応答性が、プロゲステロン受容体 (PR) を介するかどうかを検討するため、マウスEP2遺伝子5'-上流3,200塩基対 (bp) をレポーター遺伝子に繋いだものをHeLa細胞に導入し、PR発現の有無によるレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、PR導入に依存して、プロゲステロンによる転写亢進が認められ、PRによりEP2の転写活性が亢進されることを示した。また興味深いことに、基本転写活性もまたPRの導入依存的に亢進することを見出した。次に、プロゲステロンに応答する領域と基本プロモーター領域を同定するために、欠失変異体を作成して転写活性を調べた。その結果、マウスEP2遺伝子の5'-上流528bp領域中に、プロゲステロンによるエンハンサー領域3カ所 (A, B, D) と、基本プロモーター領域3カ所 (C, E, F) が存在することを示した。これら6領域には既知のプロゲステロン応答配列が見られないことからPRが実際に結合するかどうか、ゲルシフトアッセイを用いて検討した。その結果、PRは基本プロモーター領域C, Eへ結合すること、またC, Eの配列比較と変異導入の結果から新たなPR結合配列5'-G(G/A)CCGGA-3'を見出した。一方、PRはエンハンサー領域を含む他の4カ所には直接結合せず、プロゲステロンによる転写活性の亢進には他の転写因子を介する可能性を見出した。さらに著者は、マウスEP2遺伝子の基本プロモーター領域Fの配列がヒト遺伝子にも完全に保存されること、またこれがGC-box様の配列を含むことから、Sp1, Sp3の結合について検討し、両転写因子がともに領域Fに結合することを見出した。ヒトCOX-2遺伝子のプロモーター領域においてもSp1の結合サイトが存在することから、Sp1/Sp3の結合がEP2とCOX-2両遺伝子発現誘導に共通した重要な調節因子であるのかもしれない。

れない。

第二章 マクロファージにおけるプロスタグランジンE受容体EP2の発現誘導の解析

従来、単球細胞株や腹腔マクロファージではCOX-1が恒常的に発現し、LPSで刺激するとCOX-2が顕著に誘導されてPGE₂を産生し、TNF- α などのサイトカイン産生を抑制することが知られている。一方、著者が所属する研究室では腹腔マクロファージが主にEP4を発現するが、LPS刺激によりEP2が誘導されることが示され、COX-2誘導性の刺激にEP2遺伝子も応答する可能性が示唆されていた。最近、マクロファージ細胞株において糖尿病性の血管障害に関与する終末糖化産物がある特異的受容体であるRAGEの活性化を介してCOX-2発現を誘導し、PGE₂の産生を亢進することが報告された。そこで著者は、RAGE活性化シグナルがEP2発現を誘導する可能性を検討した。

マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞をRAGE特異的アゴニストS100bで刺激すると、刺激後3時間をピークとするCOX-2ならびにEP2 mRNAの発現亢進が検出され、RAGE活性化シグナルがCOX-2のみならずEP2遺伝子の発現亢進を引き起こすことを明らかにした。

マクロファージにおけるLPSとS100bによるEP2-mRNAの発現亢進が、遺伝子レベルの転写活性化を介するかどうか検討するため、マウスEP2遺伝子の5'-上流528bpを用いたレポータージーンアッセイを行った。まず基本プロモーター活性は-388~-267の領域を欠失させると約2倍に上昇し、この領域が転写活性に対して抑制的に機能することが示唆された。さらに、第一章で同定したD、Eを欠失させると、段階的な転写活性減少を認め、これらの領域をマクロファージでもEP2遺伝子の5'-上流500bpだけでは不十分であり、他の領域が重要な役割を担うものと考えられた。

以上、著者は、マウスEP2が子宮上皮ではプロゲステロンにより、マクロファージではLPSやRAGEシグナルによりそれぞれ転写レベルの調節を受けること、またその転写調節にはEP2遺伝子の異なる領域が関与することを明らかにした。EP2がCOX-2誘導性の刺激の多くで発現誘導を受けることは、プロスタノイドによる生体調節にはその産生系のみならず受容体レベルの誘導が鍵を握る可能性を示唆するものであり、アスピリン様薬物の作用機序やPG受容体を標的とした創薬を考える上で、重要な基礎的知見と考えられる。

論文審査の結果の要旨

プロスタノイド受容体の分子生物学を理解することは、これを標的とした薬剤開発に必須な基本事項であり、重要な課題である。これまでプロスタノイドはホルモンや炎症性の刺激に応じて産生され、標的細胞上で待ち受ける受容体に作用すると考えられていたが、最近、プロスタノイド受容体もまたアレルギーや癌に伴う組織病変や、生殖ホルモンの支配によってその遺伝子発現を変化させることが指摘されてきた。しかし、これまでにプロスタノイド受容体が、その遺伝子転写のレベルで調節を受けることを直接示した例は存在しなかった。そこで著者は、誘導性のプロスタノイド受容体として、プロスタグランジンE₂受容体サブタイプEP2を題材にして、ホルモンや炎症性のいずれの刺激でも発現制御を受けるか検討し、以下の成果を挙げた。

著者はまず、EP2受容体の転写産物が着床期の子宮上皮に強く発現誘導されることに着目し、マウスEP2受容体遺伝子がプロゲステロンとその受容体により転写活性化を受けると仮説を立て、これを検証した。著者は、①子宮でのEP2転写産物が外因性に投与したプロゲステロンで誘導されること、②EP2受容体遺伝子5'-上流域の転写活性が、プロゲステロンならびにプロゲステロン受容体の双方に依存して起こること、③EP2遺伝子は、その上流域内の配列を介してプロゲステロン受容体やSp1、Sp3などによる調節を受けることを示した。これらの成果は、プロスタノイド受容体とその転写活性化レベルで調節を受けることを初めて明らかにしたものであり、受容体を標的とした創薬に貢献する貴重な発現である。

次いで、著者はEP2受容体の遺伝子発現に影響しうる病態刺激を検索するため、糖尿病性の血管障害への関与が示唆される終末糖化産物が単球・マクロファージにおいてEP2発現を誘導する可能性について、マウス・マクロファージ様細胞株RAW264.7を用いて検討した。その結果、①終末糖化産物受容体(RAGE)アゴニストは、シクロオキシゲナーゼ(COX)-2とEP2受容体とともに発現誘導すること、②RAGEアゴニストによるCOX-2とEP2の発現誘導は、種々の細胞内シグナル伝達分子阻害剤に感受性を示すが、EP2受容体の発現のみがチロシキナーゼ阻害剤に感受性を示すこと、③RAGEアゴニストによるEP2遺伝子の転写活性化は、5'-上流500塩基対以外の配列が必要とされることなどの成果を得た。

これらの成果は、炎症性病態刺激によって、PG合成酵素の誘導のみならず、PG受容体が発現制御を受けて働きうることを示したものであり、PGの炎症惹起作用や病態作用を受容体の側面から捉えたものとして評価できる。

以上の成果は、プロスタノイドによる生理・病態作用の発現には、その産生系のみならず受容体レベルの誘導が鍵を握る可能性を示唆するものであり、新規アスピリン製剤の開発やPGの作用を標的とした薬剤開発を考える上で、重要な基礎的知見となるものである。

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。

更に、平成16年3月1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。