

氏 名	にし がき のぶ ひろ 西 垣 信 裕
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 388 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 薬 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 及び EP4 の機能 特性に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川 厚	教 授 川 寄 敏 祐	教 授 伊 藤 信 行
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) E_2 は生体内で細胞膜リン脂質から遊離したアラキドン酸より生ずる生理活性脂質の一種で、全身の多様な組織で多彩な生理・薬理作用を示すが、それらの作用は細胞膜上に存在する特異的な受容体を介して惹起される。PGE 受容体は近年まで数種のアゴニスト、アンタゴニストの特異性を基に、EP1, EP2, EP3 の 3 種のサブタイプに分類され、それぞれ細胞内カルシウム濃度の上昇、アデニル酸シクラーゼの促進あるいは抑制という異なる細胞内情報伝達系に共役すると考えられてきた。このうちのアデニル酸シクラーゼを促進する PGE 受容体は、脈管、消化管、気管気管支、生殖器、腎臓、免疫細胞などに存在し機能することは知られていたが、サブタイプ EP2 の 1 種類では説明できない現象も多く、1994年にはサブタイプ EP2 とは別のアデニル酸シクラーゼを促進する受容体としてサブタイプ EP4 の存在が薬理学的に示唆された。しかし、それぞれのサブタイプ受容体の性質は十分明らかにはなっていない。そこで著者は、まず癌化肥満細胞から単離されていた PGE 受容体がサブタイプ EP4 であることを同定し、別に単離された EP2 受容体と比較することにより両受容体の機能的相違について解析し、2 種の PGE 受容体の存在意義について考察した。

第一章 癌化肥満細胞株より単離したプロスタグランジン E 受容体サブタイプ EP4 の同定に関する研究

まだ EP4 受容体の存在が確認されていない当時、マウス癌化肥満細胞から単離した受容体は、数種のリガンドの選択性及び共役する情報伝達系から、サブタイプ EP2 であると考えられたが、唯一 EP2 選択的アゴニストの一種である butaprost に反応を示さないという矛盾も示していた。しかしその後、アンタゴニスト AH23848B の選択性を基に、butaprost に反応しない PGE 受容体としてサブタイプ EP4 が定義されたことから、著者は癌化肥満細胞から単離した受容体 cDNA が EP4 サブタイプをコードする可能性について検討した。その結果、受容体を安定に発現させた CHO 細胞において、PGE₂ による cAMP 生成反応は、EP4 特異的アンタゴニスト AH23848B により競合阻害を受け、しかもその阻害の程度は EP4

受容体に関して報告されている値によく一致した。また、butaprostに加えて別のEP2特異的アゴニスト19(R)OH-PGE₂も本受容体に対して親和性を示さずcAMPの生成も引き起こさなかった。以上の結果より、マウス癌化肥満細胞から単離した受容体cDNAはEP2受容体ではなくEP4受容体であることがわかった。

第二章 プロスタグランジンE受容体サブタイプEP2とEP4の機能的相違に関する研究

(1) 脱感作及びアゴニスト代謝に対する感受性における相違

サブタイプEP2とEP4は近年まで両受容体を介する反応の分離評価が不可能であったため、機能的相違も不明であった。そこで著者は、まずEP4受容体と著者の所属する研究室において新たに単離されたEP2受容体の推定される1次構造を比較して、両受容体間の受容体キナーゼあるいはcAMP依存性プロテインキナーゼに対する感受性の違いを予想し、EP2あるいはEP4受容体を安定に発現するCHO細胞を用いてアゴニスト依存性の脱感作について検討した。その結果、短時間のPGE₂刺激によりEP4受容体は脱感作を受け最大反応が減弱したのに対してEP2は脱感作を受けなかった。しかし、長時間のPGE₂刺激によっては両受容体とも同様のダウンレギュレーションを受けた。ところで、PGE₂は代謝により15-keto-PGE₂、続いて13,14-dihydro-15-keto-PGE₂へと急速に変換され、この代謝がPGE₂の作用の持続性に重要な役割を果たすと考えられている。そこで、EP2あるいはEP4受容体に対する代謝体の効力を比較した結果、EP4受容体を介した反応はPGE₂から15-keto-PGE₂への代謝で著しく反応が減弱するが、EP2受容体を介した反応は代謝に従い段階的に反応が低下することがわかった。以上の結果より、EP2、EP4受容体はアゴニスト依存性の脱感作感受性及びアゴニストの代謝不活性化において相違を示し、EP4受容体がより一過性の反応に関わり、EP2受容体がより持続的な反応に関わるという可能性が示唆された。

(2) クロストーク感受性の相違

更にcDNA配列より予想される1次構造から、EP2とEP4受容体はカルシウム依存性プロテインキナーゼ(PKCと略)に対する感受性の相違も予想されたため、著者はEP2あるいはEP4受容体の*in vitro*でのPKCによるリン酸化反応を試みた。その結果、EP2受容体はリン酸化されたが、EP4受容体はリン酸化されなかった。また、EP2あるいはEP4受容体を発現するCHO細胞をホルボールエステルのTPAで処理するとEP2受容体を介する反応は最大反応及びEC₅₀の増大が見られる一方で、EP4受容体を介する反応に変化はなかった。従って、EP2受容体はカルシウム動員系あるいはイノシトールリン脂質代謝系によるクロストーク調節を受ける受容体であることが明らかになった。

以上、著者は薬理学的に提唱されたEP4受容体の存在を実質的に明らかにした上で、生理的アゴニストを共有し同一の細胞内情報伝達系に共役するEP2受容体とEP4受容体の機能的相違について解析し、脱感作現象、アゴニスト代謝に対する感受性、PKC経路とのクロストークにおける相違点から両受容体の存在意義を推測した。本研究は、PGE₂の多様な生理作用の解明のみならず、アゴニストと情報伝達系を共有する複数の受容体サブタイプの存在意義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 E_2 (PGE_2) 受容体 (EP と略) には、薬理学研究から同定される 4 種類のサブタイプ受容体がある。この中で、EP2 と EP4 の 2 種類の受容体はともにアデニル酸シクラーゼの活性化を行うことから、両者の分子構造と機能の相違を明らかにし、その存在の生物学的意義を解明することが望まれていた。そこで著者は、まず CHO 細胞に発現させた EP2 と EP4 受容体遺伝子 cDNA を用い、特異的アゴニスト、アンタゴニスト作用を動力学的に解析し、当初 EP2 サブタイプと同定された分子構造が EP4 サブタイプのそれであることを明らかにした。これにより、EP2、EP4 受容体サブタイプに関する研究評価が正しく行えるようになった業績は大きい。次いで、両受容体の機能を比較した結果、 PGE_2 刺激により EP4 受容体は脱感作を受けるが EP2 受容体は受けないこと、EP4 受容体は受容体キナーゼによるリン酸化反応で脱感作すること、さらに、 PGE_2 の代謝産物である 15-keto- PGE_2 、13, 14-dihydro-15-keto- PGE_2 に対して、EP2 受容体はアゴニスト活性を示したが EP4 受容体は示さないこと、等を明らかにした。一方、EP2 受容体はプロテインキナーゼ C によりリン酸化を受け、最大反応と EC_{50} 値の増大が起きることを明らかにした。これらの脱感作やクロストークに対する動態の違いから、EP2 受容体は持続的な反応に、EP4 受容体は一過性の反応に関わり、前者はプロテインキナーゼ C によりクロストークを受けることを示唆した。これらの基礎的研究の成果は、 PGE_2 の多様な生理作用の解明のみならず、アゴニストと情報伝達系を共有する複数の受容体サブタイプの存在意義の解明にとって非常に重要である。

よって、本研究は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 9 年 2 月 24 日論文内容とそれに関する口頭試問を行った結果、合格と認めた。