

図4：プロスタグランジン受容体欠損マウスにおける酢酸ライジング反応（文献15）

マウスは、予め vehicle (white and dotted) もしくは LPS (10ug/mouse, black and hatched) を腹腔内に投与し、24 時間後に酢酸を投与した。用いたマウスの数を column の上に示した。(**) significantly different at $P < 0.01$, when compared with vehicle-pretreated wild-type mice; and (##) significantly different at $P < 0.01$, from the LPS-pretreated wild-type mice.

3. おわりに

プロスタノイドによる疼痛調節を理解するためには、どのプロスタノイドが、どのような侵害・非侵害性刺激に対して、末梢と脊髄側のどの線維上に発現するどの受容体とサブタイプに作用することで、痛覚過敏とアロディニアを引き起こすのか、を明らかにしていく必要がある。受容体欠損マウスは、これらを明らかにしていく上で強力なツールである。しかしながら、上述のように、プロスタノイドの痛覚調節は複雑で多彩であり、また全ての受容体に対して遮断薬や抗体などの分子ツールが揃っていないこともあり、その全貌が明らかになるにはさらなる時間を要すると思われる。

謝辞

今回のシンポジウムで用いた研究の多くは、京都大学大学院薬学研究科の市川 厚教授ならびに同大学院医学研究科の成宮 周教授の指導のもと、東京大学医科学研究所・吉田進昭先生、北里研究所・大石幸子先生、関西医大・伊藤誠二先生、富山医薬大・倉石 泰先生、小野薬品工業の方々との共同研究によって遂行されたものです。この場を借りて深甚の謝意を表します。

引用文献

- 1) Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like drugs. Nature New Biol. 231: 232-235, 1971

- 2) Coleman RA, Smith WL, Narumiya S: International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*. 46: 205-229, 1994
- 3) Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A: Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1259: 109-120, 1995
- 4) Suzawa T, Miyaura C, Inada M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Suda T: The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP₁, EP₂, EP₃ and EP₄) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* 141: 1554-1559, 2000
- 5) Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K: Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 62: 28-32, 2002
- 6) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F: Prostanoid receptors; structures, properties and functions. *Physiol Rev* 79: 1193-1226, 1999
- 7) Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A: Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Prog. Lipid Res*. 39: 289-314, 2000
- 8) 伊藤誠二、南敏明. 痛みとプロスタグランジン：アロディニアの発症機序. *LISA* 3: 1162-1177, 1996
- 9) Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA: The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol. Sci*. 19: 141-147, 1998
- 10) Malmberg AB and Yaksh TL: Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 257: 1276-1279, 1992
- 11) Sugimoto Y, Shigemoto R, Namba T, Negishi M, Mizuno N, Narumiya S, Ichikawa A: Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP₃ in the mouse nervous system. *Neuroscience* 62: 919-928, 1994
- 12) Oida H, Namba T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohishi H, Ichikawa A, Narumiya S: In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. *Br J Pharmacol* 116: 2828-2837, 1995
- 13) Nakamura K, Kaneko T, Yamashita Y, Hasegawa H, Katoh H, Negishi M: Immunohistochemical localization of prostaglandin EP₃ receptor in the rat nervous system. *J Comp Neurol*. 421: 543-69, 2000
- 14) Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S, Narumiya S: Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388: 678-682, 1997
- 15) Ueno A, matsumoto H, naraba H, Ikeda Y, Ushikubi F, Matsuoka T, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Oh-ishi S: major roles of prostanoid receptors IP and EP₃ in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochem. Pharmacol*. 62: 157-160, 2001
- 16) Matsumoto H, Naraba H, Ueno A, Fujiyoshi T, Murakami M, Kudo I, Oh-ishi S: Induction of cyclooxygenase-2 causes an enhancement of writhing response in mice. *Eur J Pharmacol*. 352: 47-52, 1998
- 17) Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson PJ, Ericsson-Dahlstrand A: Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature*. 410: 430-431, 2001

- 18) Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchome A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ: Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*. 410: 471-475, 2001

プロスタノイド受容体誘導の生理的役割

Roles of receptor gene induction in prostanoid physiology

杉本 幸彦



市川 厚



プロスタノイドは、シクロオキシゲナーゼ(COX)により合成されるプロスタグランジン類の総称であり、多彩な作用を発揮する。近年、常在型 COX-1 と誘導型 COX-2 の役割分担が注目されてきたが、プロスタノイドはその受容体発現においても、常在性のものと刺激で誘導される場合があり、病態・生理作用に重要な鍵を握ることが分かってきた。本稿では、受容体発現誘導の実際を紹介し、受容体を標的とした創薬の可能性について探る。

キーワード：プロスタグランジン、シクロオキシゲナーゼ、非ステロイド性抗炎症薬、受容体サブタイプ

はじめに

プロスタノイドは、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プロスタグランジン(PG)とトロンボキサンの総称である¹⁾。プロスタノイドが生体内で様々な生理・病態作用を有することは、アスピリン様抗炎症薬(NSAIDs)が内因性のプロスタノイド産生を抑えることで強力な解熱・鎮痛・抗炎症作用とともに胃腸管障害や生殖障害などの副作用を示すことから推察されてきた。また最近では、プロスタノイドが大腸癌をはじめとする癌病変、アルツハイマーやパーキンソンといった神経変成疾患の発症・進展にも関与することが示唆されている。従来、これらの生理・病態作用の中ではプロスタノイドの産生律速酵素の重要性が指摘され、実際、恒常的に発現する COX-1 とホルモンや病態刺激で発現誘導を受ける COX-2 の生理的な使い分けが注目されていた²⁾。一方、プロスタノイドの作用は、標的細胞の細胞膜上に存在する特異的な受容体を介して発揮される³⁾が、個々の病態作用がどの受容体を介して発揮さ

れるかについては依然不明な点が多い。

近年、筆者らは京都大学大学院医学研究科の成宮周教授と共同で、8種類存在するプロスタノイド受容体の個々について遺伝子欠損マウスを作成し、発熱や疼痛、炎症などの病態作用あるいは分娩や排卵などの生理機能に關与するプロスタノイド受容体の同定を行ってきた(これらの成果についてはほかに総説⁴⁾を参照)。一方、筆者らはこれらの解析を通して、プロスタノイドはその受容体発現においても、構成的に発現するものと種々の刺激に応じて誘導される場合があり、これがその病態・生理作用の発揮に重要な鍵となることを示した(表1)。例えば、病態刺激によりプロスタノイド受容体が発現誘導を受ける例として、マクロファージを LPS で刺激すると EP2(PGE₂の受容体には、EP1、EP2、EP3、EP4の4種類が存在)が発現誘導され、サイトカイン産生を抑制することでそのネガティブフィードバックに關与すること、一方、ホルモン刺激がプロスタノイド受容体発現を誘導する例としては、ゴナドトロピン刺激により卵丘細胞に EP2 が発現誘導を受け排卵・受精を促進すること等が

筆者紹介：すぎもと・ゆきひこ(SUGIMOTO, Yukihiro) 京都大学大学院薬学研究科生体情報制御学分野(Dept. of Physiol. Chem., Kyoto Univ.)助教授 1993年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程中途退学 薬学博士 専門：生化学、分子生物学 連絡先：〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29 E-mail ysugimot@pharm.kyoto-u.ac.jp(勤務先)

いちかわ・あつし(ICHIKAWA, Atsushi) 武庫川女子大学薬学部衛生化学教室(Sch. of Pharmaceu. Sci., Mukogawa Woman's Univ.)教授 1968年東京大学大学院薬学研究科博士課程修了 薬学博士 専門：生化学 連絡先：〒663-8179 西宮市甲子園九番町11-68 E-mail aichikaw@mwu.mukogawa-u.ac.jp(勤務先)

表1 プロスタノイド受容体遺伝子の発現変化

発現細胞	受容体	発現パターン	発現制御因子	プロスタノイド作用	文献
腹腔常在性 マクロファージ	EP2 EP4	発現誘導 発現抑制	LPS? PGE ₂	マクロファージの負の制御	5)
骨芽細胞(MC3T3-E1)	IP	発現誘導	PG(TNF- α)	?	6)
子宮上皮	EP2	発現誘導	プロゲステロン	着床・脱落膜化?	7)
肺胞上皮	DP	発現誘導	抗原チャレンジ	アレルギー応答亢進	8)
腸管上皮	EP4	恒常的発現	—	粘膜保護作用	9)
腸管粘膜間質細胞	EP2	発現亢進	?	大腸ポリープの発症	10)
卵丘細胞・ 顆粒膜細胞	EP2 EP4	発現誘導 発現誘導	ゴナドトロピン ゴナドトロピン	排卵・受精促進	12)
線維芽細胞(毛乳頭)・ 外毛根鞘	EP3 EP4	発現誘導 発現誘導	毛周期依存 毛周期依存	毛伸長促進?	13)

示唆されている。このような受容体の発現誘導が、疼痛、発癌やアルツハイマーなどの発症に関与する可能性も考えられる。

本稿では、種々の生理・病態刺激によるプロスタノイド受容体の発現誘導の実際を紹介し、受容体を標的とした創薬の可能性について探りたい。

1. 腸管粘膜の病態と EP2/EP4

(1) 大腸炎の発症と EP4 の役割

大腸の粘膜上皮細胞においては、健常時には EP4 が恒常的に高レベルで発現しているが、EP2 の発現は非常に低い。しかし EP2 も、何らかの病因・病態性刺激によって発現誘導を受ける可能性も十分に考えられた。デキストラン硫酸(DSS)誘発性大腸炎モデルにおいては、DSS の濃度に依存して大腸炎の症状が激化する。通常、3% DSS ではほとんど症状を呈さないが、インドメタシンを同時投与すると腸管組織は典型的な炎症像を示すようになり、さらにジメチル PGE₂ を投与することで炎症像は抑制される。実際、COX-1 や COX-2 の遺伝子欠損マウスにおいて大腸炎の激化が報告されている。したがって、本モデルにおいては、内在性の PGE₂ が炎症惹起を抑制している可能性が考えられた。

筆者らは成宮らと共同で、EP1、EP2、EP3、EP4 の各受容体欠損マウスに本モデル系を導入したところ、EP4 欠損マウスにおいてのみ大腸炎の顕著な劇症化が起こることを見いだした(図1)⁹⁾。3% DSS を投与して1日後に FITC ラベルしたデキストランを投与

すると、野生型マウスでは腸管組織内への FITC の浸潤は全く見られないが、EP4 欠損マウスの腸管では、組織内への FITC の顕著な浸潤が認められた。したがって、EP4 欠損は少なくとも腸管上皮の integrity に障害を与えていることから、EP4 は腸管上皮の保護機能に関与していることが示唆される。

(2) 大腸ポリープの発症と EP2 受容体

従来、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の服用と大腸癌の発症率に負の相関が成立することから、プロスタノイドが大腸癌の発症に関与することが示唆されてきた。実際、家族性大腸ポリープ症(FAP)のモデルである Apc(delta)716 変異マウスでは、COX-2 が腸管ポリープに特異的に発現しており、Apc 変異マウスに COX-2 欠損を導入すると、発症率ならびに腫瘍細胞の増殖率が減少する。FAP 患者の腫瘍組織中には PGE₂ が検出されることから、COX-2 による PGE₂ が腸管ポリープ形成を促進すると考えられたが、腸管ポリープにどの EP 受容体に関与するのかわかりませんでした。京都大学大学院医学研究科の武藤 誠らは、腸管粘膜における EP 発現を調べ、正常粘膜に比べてポリープでの EP2 の発現が亢進し、これが間質細胞(COX-2 を発現)に発現することを見いだした¹⁰⁾。また EP1、EP2、EP3 欠損を Apc 変異マウスに導入したところ、EP2 欠損でポリープ数が減少し、その効果はヘテロ変異でも認められた。

一方、EP4 欠損変異は新生児死亡を示すため、EP4 ヘテロ欠損のみを Apc 変異マウスへ導入したが、ポリープ数に変化はなかった。以上の結果より、ポ

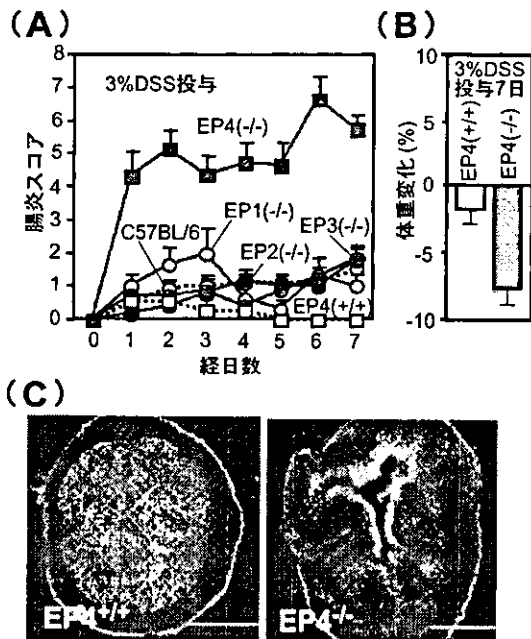


図1 デキストラン硫酸(DSS)誘発性大腸炎とEP4受容体欠損マウス

A: 3%DSSを野生型あるいは各EP欠損マウスに投与した際の、腸炎スコアの経時的变化。B: 3%DSSを野生型あるいはEP4欠損マウスに7日間投与したあとの体重減少。C: 3%DSSを前投与した野生型あるいはEP4欠損マウスにFITC-デキストランを投与し、腸を摘出して蛍光顕微鏡で観察した。

リープ形成に関与するPGE受容体はEP2であることが示された。また、Apc変異ポリープでは、正常粘膜に比べてVEGFやlaminin α 2の発現亢進が見られたが、COX-2欠損、EP2欠損ではともに消失し、EP2シグナルは血管新生や基底膜形成に寄与する可能性が考えられた。またEP2欠損体ではCOX-2の発現亢進も見られず、ポジティブフィードバック制御を介するものと考えられる。

これら大腸粘膜の二種類の病変に関与するプロスタノイド受容体が異なることが判明した。ポリープ形成に寄与するEP2と上皮保護作用を示すEP4は、ともにGs共役型受容体であり、一見すると矛盾するようにも思えるが、EP2は同種脱感作を示さずlong-actingであるのに対して、EP4は速やかに脱感作を受けshort-actingであり、PGE₂に対する経時的な応答性が異なるものと推定されている。これら2種類のEP受容体の選択的な使い分けは、腸管に限らず他の病態や生理作用においても興味深い点である。

2. 生理プロセスにおけるプロスタノイド受容体の発現誘導の解析

(1) 卵巣組織でのゴナドトロピン刺激により誘導されるPGE受容体の発現変動

筆者らは、ゴナドトロピン刺激により卵巣にEP2が発現誘導されること、またEP2欠損マウスは排卵・受精障害により産仔数が激減することを見いだした¹¹⁾。しかしながら、ゴナドトロピン刺激を受けた卵巣内組織において、COXならびにEP受容体がどのような発現パターンを示すのか、体系的に解析した例は存在しなかった。そこで、さらに卵巣組織におけるPGE産生系とEP受容体の発現分布を検討した¹²⁾。

未成熟マウスの卵巣を妊馬血清ゴナドトロピン(PMSG)処理し、48時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)で処理したところ、EP1、EP3の発現はいずれの時間においても認めないが、hCG刺激後3時間においては、EP2、EP4、COX-2の発現が卵丘細胞と顆粒膜細胞の双方で認められた(図2)。ところが、hCG投与後9時間ではEP2とCOX-2の発現が卵丘細胞に特異的に見られたのに対し、EP4は顆粒膜細胞に特異的に見られた。またこれに対応するように、3時間では見られなかったCOX-1の発現が顆粒膜細胞に特異的に誘導された。これらのことから、その遺伝子欠損が排卵・受精障害を示すEP2とCOX-2は当初ともに顆粒膜細胞全体に発現誘導を受けるが排卵直前期には卵丘細胞に濃縮されること、一方、排卵直前期には顆粒膜細胞にはCOX-1とEP4が存在するものと考えられる。COX-1やEP4の遺伝子欠損は排卵に直接影響がなかったものの、排卵後の黄体細胞への分化に関与する可能性も考えられる。

(2) 皮膚組織において毛周期とともに変動するPGE受容体発現

皮膚は外界から生体を保護する機能を持つとともに、炎症やアレルギー応答の場として、あるいは触覚や温覚などの体性感覚受容の場として重要な組織であるが、皮膚組織におけるEPサブタイプの発現分布は全く不明であった。そこで、皮膚組織におけるEPならびにCOXのmRNA発現を*in situ* hybridizationにより検討したところ、EP1、EP2の発現はいずれの毛周期においても認めないが、EP3が毛包周囲の繊維芽細胞(毛乳頭を含む)に、またEP4が外毛根鞘に、いずれも毛周期の中で毛包成長期特異的に発現すること

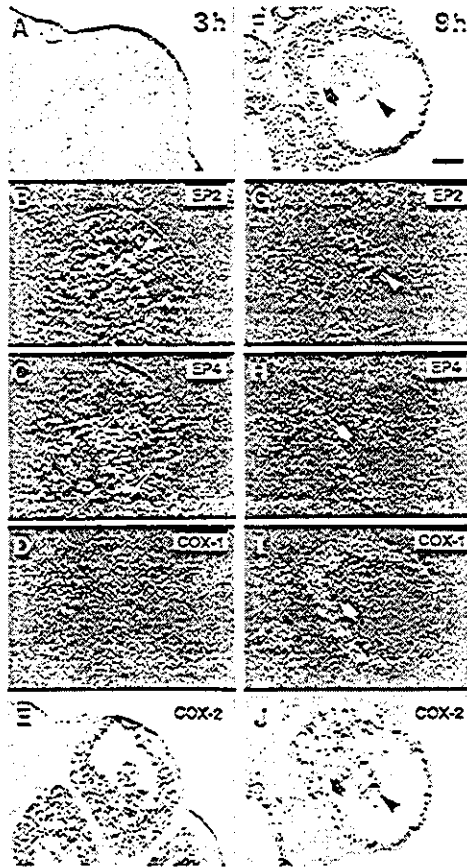


図2 排卵前期の卵巣組織におけるEP受容体ならびにCOXのmRNA発現

マウスにhCG投与後、3時間(A~E)ないしは9時間(F~J)後の卵巣組織におけるEP2(B, G)、EP4(C, H)、COX-1(D, I)、COX-2(E, J)のmRNA発現を示す。9時間後では、EP2とCOX-2は卵丘細胞(矢頭)に局限するのに対して、EP4とCOX-1は顆粒膜細胞(矢印)に局限する。

を発見した(図3)¹³⁾。また、毛乳頭におけるEP3ならびに外毛根鞘におけるEP4発現は、脱毛処理により毛周期を同調させた際にも毛包成長期特異的に見られた。一方、COXに関しては、COX-1が表皮角化細胞に発現しその発現様式は毛周期に依存しなかったが、COX-2は脱毛処理により毛周期を同調させると毛包成長期特異的に、しかも外毛根鞘のごく一部に発現することを見いだした。これらの結果から、毛包成長期に特異的に誘導されるCOX-2の働きによりPGE₂が産生され、これが同じく毛周期依存的に発現するEP受容体を介して毛成長を調節している可能性が考えられた。ミノキシジルは、Kチャネルオプナーとして血管拡張効果を示し多毛効果を発揮すると考えられているが、他の類似化合物が同様の作用を示さないこ

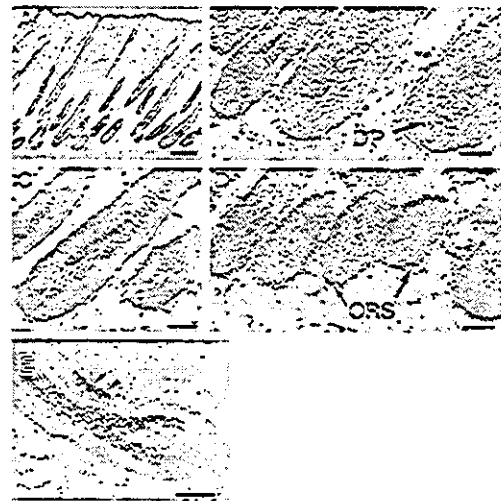


図3 皮膚組織におけるEP受容体ならびにCOX-2のmRNA発現

3週齢マウス皮膚組織におけるEP3(A, B)、EP4(C, D)転写産物の発現分布。EP3は毛乳頭(DP)を主体とする線維芽細胞に、EP4は外毛根鞘(ORS)にシグナルが見られる。これらEP3、EP4発現は、脱毛処理を行った皮膚組織においても毛包成長期特異的に認められ、さらにこの時期には、COX-2の転写産物が外毛根鞘の一部の細胞に発現していた(E)。

バーは200 μm (A, C)、50 μm (B, D)、150 μm (E)。

とから、その作用点は不明な点が多い。最近、皮膚で産生されるPGE₂が毛周期を調節することで毛伸長を促進する可能性が指摘されている。ヒト毛乳頭培養細胞を用いた解析から、ミノキシジルがCOX-1を介してPGE₂産生を亢進すること、また毛乳頭細胞では成長期特異的にCOX-2にスイッチされること、また*in vitro*における毛代謝がPGE投与により促進されること等である。今回、COX-2の周期特異的な発現誘導とEP3、EP4両受容体の発現様式は、PGE₂と毛成長との関係を考察する上で興味深い。

3. プロゲステロンによるマウスEP2遺伝子発現の調節機構

前述のように、ホルモンや病態性の刺激によりプロスタノイド受容体遺伝子の発現レベルが変化することが明らかとなった。筆者らはEP2のマウス遺伝子に関して構造解析を行い、マクロファージをLPSで刺激した場合と子宮上皮をプロゲステロン(P₄)で刺激した場合とで、その転写開始点が異なるという結果を得た¹⁴⁾。この際、5'-上流域に典型的なTATA-boxやGC-boxを含まないことから、EP2遺伝子の発現

制御には、特有の転写活性化機構が存在する可能性が考えられた。筆者らは、この子宮上皮における EP2 遺伝子の発現誘導をモデルとしてプロスタノイド受容体転写誘導の解析を行った¹⁵⁾。

まずマウス EP2 遺伝子の 5'-上流域が P₄ とプロゲステロン受容体 (PR) の両方に依存した転写活性を示すかどうか検討するため、マウス EP2 遺伝子の 5'-上流域約 3.2 kb とルシフェラーゼをつないだ cDNA を HeLa 細胞に導入してレポーター解析を行った (図 4)。その結果、P₄ と PR 発現に依存してルシフェラーゼ活性の亢進が認められ、P₄ による EP2 遺伝子の発現亢進は転写活性化によるものであることが示された。興味深いことに、基本プロモーター活性もまた PR の導入依存的に亢進していた。段階的な欠失変異体を用いた検討により、マウス EP2 遺伝子の 5'-上流配列は大きく 6 領域に分類され、A, B, D の 3 カ所の配列は P₄ によるエンハンサー活性に、C, E, F の 3 カ所は基本プロモーター活性に重要であることが示されたが、これらのいずれの領域にも既知のプロゲステロン応答配列 (PRE) は含まれていなかった。

これらの 6 領域に PR が実際に結合するかどうかゲルシフト解析を行ったところ、エンハンサー活性を持つ 3 領域には P₄ と PR に依存したバンドが検出されたが、PR 抗体でシフトせず、実際には PR 以外の転写因子が結合してエンハンサー活性を示すものと考えられた。逆に、基本プロモーター活性を示す領域 C, E に PR が結合し、これには (5'-GG/ACCGGA-3') という配列が重要であることが分かった。この結果は、P₄ を投与しなくとも PR の発現部位に EP2 受容体が発現している可能性を示唆するものであり、実際、排卵期に EP2 が誘導される顆粒膜細胞も P₄ 応答性の細胞であることなどを考えると、PR の新たな転写調節機構として興味深い。一方、基本プロモーター活性を示す領域 F では、Sp1, Sp3 の抗体によってシフトするバンドがそれぞれ検出され、シチジンリッチな配列 (5'-CCCTCCCC-3') が Sp1/3 結合に重要であることが示された。この配列はヒト EP2 遺伝子上流にも完全に保存されていること、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調節因子である可能性が考えられる。実際、マクロファージや卵丘細胞、子宮上皮などでは、同一刺激により EP2 と COX-2 両方の遺

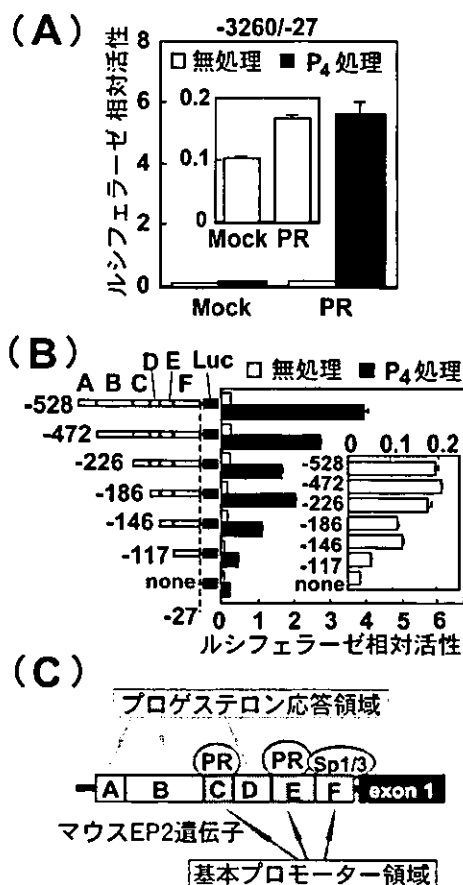


図 4 マウス EP2 受容体遺伝子の発現制御の解析

A: PR cDNA を導入した HeLa 細胞において、プロゲステロンによるマウス EP2 遺伝子 (-3260/-27) の転写活性応答を、レポーターのルシフェラーゼ活性として検出した。B: 段階的な 5' 欠失変異体を作製し、HeLa 細胞に PR-cDNA とともに導入し、プロゲステロン刺激 24 時間後のルシフェラーゼ活性を解析した。C: EP2 遺伝子の発現調節領域と転写因子結合部位の模式図。

伝子発現が誘導されることが知られるが、これらの転写機構によって、両遺伝子が同様の発現亢進を示すのかもしれない。

一般に、プロスタノイド受容体遺伝子の発現レベルは非常に低いものであるが、これらの解析から、PR という強力な転写因子が直接作用するだけではなく、いくつかの条件が揃ってはじめて活性化されるというユニークな調節機構がその一因となっているのかもしれない。こうした意味で、プロスタノイド受容体遺伝子を転写活性化させる条件のひとつとして COX と共通した転写活性化機構を共有することは、生理的にも非常に意義深いものと考えられる。

おわりに

アスピリンの薬理作用がPG生合成阻害によるものであると分かって以来、プロスタノイドの生理・病態作用の発現には、その産生酵素の変動が重要であると考えられ、恒常発現するCOX-1と刺激誘導型COX-2の役割分担が注目を集めた。また最近、COX-1の選択的スプライシングにより生成するバリエーションがアセトアミノフェンに感受性を示すことから、COX-3として脚光を浴びている。しかしながら、その解析が進むにつれ、受容体もまた自らの発現レベルを変化させ、生殖系などの生理プロセス、アレルギーや大腸癌などの病態プロセスに関与することが分かってきた。COXなど産生酵素遺伝子の解析に比して、発現レベルの低い受容体遺伝子の発現制御を解析するには、ときに個体レベルの解析をも必要とし時間と労力を要するが、受容体の発現制御もまた病態発症の一因であることを考えれば、今後よりいっそうの解析・研究がなされるべきである。このような受容体の時空間的な発現機構の解析が、プロスタノイド受容体を標的とする医薬品開発を考える上での有用な基礎知見となるであろう。

○参考文献

- 1) Narumiya, S. *et al.*: Prostanoid receptors: structures, properties and functions, *Physiol. Rev.*, 79, 1193~1226(1999)
- 2) Vane, J. R. *et al.*: Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 97~120(1998)
- 3) Coleman, R. A. *et al.*: International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes, *Pharmacol. Rev.*, 46, 205~229(1994)
- 4) Sugimoto, Y. *et al.*: Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice, *Prog. Lipid Res.*, 39, 289~314(2000)
- 5) Ikegami, R. *et al.*: The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages, *J. Immunol.*, 166, 4689~4696(2001)
- 6) Wang, J. *et al.*: Induction of prostaglandin I2 receptor by tumor necrosis factor alpha in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1441, 69~76(1999)
- 7) Katsuyama, M. *et al.*: Distinct cellular localization of the mRNAs for prostaglandin E receptor subtypes in the mouse uterus during pseudopregnancy, *Endocrinology*, 138, 344~350(1997)
- 8) Matsuoka, T. *et al.*: Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma, *Science*, 287, 2013~2017(2000)
- 9) Kabashima, K. *et al.*: The prostaglandin E receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut, *J. Clin. Invest.*, 109, 883~893(2002)
- 10) Sonoshita, M. *et al.*: Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in *Apcd716* knockout mice, *Nat. Med.*, 7, 1048~1051(2001)
- 11) Hizaki, H. *et al.*: Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10501~10506(1999)
- 12) Segi, E. *et al.*: Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation, *Biol. Reprod.*, 68, 804~811(2003)
- 13) Torii, E. *et al.*: Expression of prostaglandin E(2) receptor subtypes in mouse hair follicles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290, 696~700(2002)
- 14) Katsuyama, M. *et al.*: Characterization of the gene for the mouse prostaglandin E receptor subtype EP2: tissue specific alternative transcripts in the macrophage and the uterus, *Biochem. J.*, 330, 1115~1121(1998)
- 15) Tsuchiya, S. *et al.*: Identification and characterization of a novel progesterone receptor-binding element in the mouse prostaglandin E receptor subtype EP2 gene, *Genes to Cells*, 8, 747~758(2003)

特集 プロスタグランジン

受容体ノックアウトマウスを用いた プロスタノイド研究

杉本 幸彦/市川 厚

プロスタノイドは、シクロオキシゲナーゼ (COX) により産生されるプロスタグランジン (PG) とトロンボキサンの総称であり、特異受容体を介して多くの生理・病態プロセスに関与する。しかし個々のプロセスに関与する受容体や作用機序については不明点が多い。近年、COX やプロスタノイド受容体の各遺伝子ノックアウトマウスが作製され、その生理的意義が明らかとなってきた。本稿では、受容体欠損マウスが呈する表現型のなかから、婦人科領域に関連する動脈管・分娩・初期生殖の異常を紹介し、COX との対応やその受容体を介する分子機作について考察する。

動脈管●分娩●黄体退縮

卵丘細胞●プロスタグランジン

Yukihiko Sugimoto

京都大学大学院薬学研究科生体情報制御学分野
助教授

Atsushi Ichikawa

武庫川女子大学薬学部衛生化学教授

はじめに

プロスタノイドは、アラキドン酸を基質としてシクロオキシゲナーゼ (COX) を律速酵素として産生される4種類のプロスタグランジン (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂) とトロンボキサン (TXA₂) の総称である。5種類のプロスタノイドは、互いに近い構造を有するが、それぞれ特異的な受容体によって認識され、全く異なる生物活性を発揮する。特に、最も代表的な PG である PGE₂ の受容体については4種類のサブタイプ (EP1-4) が存在し、それぞれ異なる情報伝達系に共役し、組織・細胞に応じて異なるサブタイプを使い分けて多彩な生理作用を発揮する¹⁾²⁾ (図1)。アスピリンが COX 活性の阻害により強力な解熱・鎮痛作用を発揮し、優れた医薬品としてすでに広く使用されていたことから、逆に各受容体に特異性の高い遮断薬などの分子ツールが存在せず、結果的にプロスタノイド受容体の解析を立ち後れさせる原因となっていた。しかし受容体の cDNA クローニングを契機として、各受容体の分子特性や、組織における発現解析が行われ、機能面との対応が図られた。またプロスタノイド受容体を個々に欠損したマウスが作出され、上述の組織分布の情報を基盤として、各受容体を介したプロスタノイドの生理・病態作用の解析が可能となり、多くの知見が得られつつある³⁾⁴⁾ (表1)。

本稿では、このようなプロスタノイド受容体欠損マウスの表現型のなかから、婦人科領域に関連

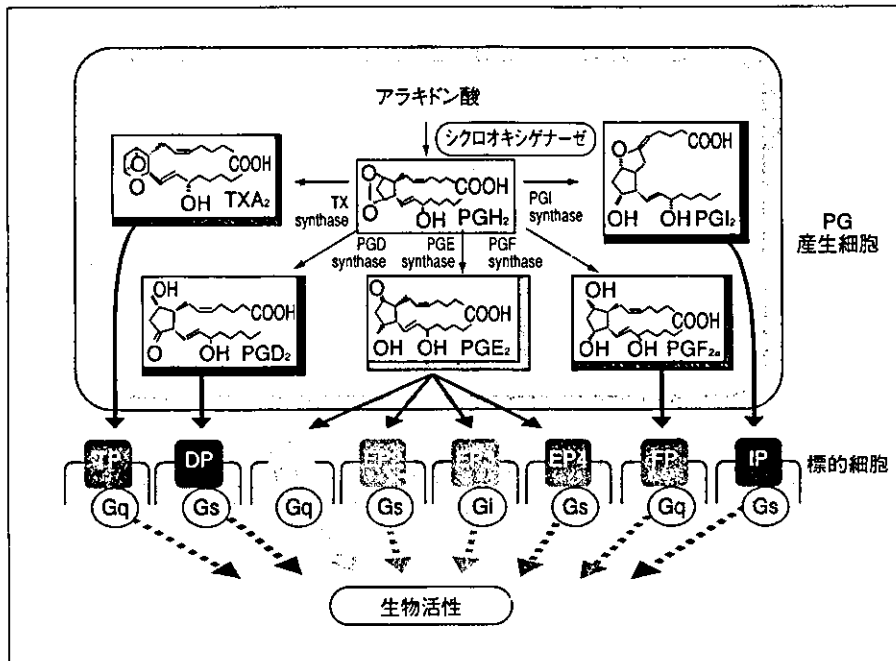


図1 シクロオキシゲナーゼ経路とプロスタノイド受容体

表1 プロスタノイド受容体欠損マウスの主な表現型

標的遺伝子	表現型	同様の表現型を示す遺伝子変異
DP	卵白アルブミン誘発性気管支喘息におけるアレルギー応答の減弱 PGD ₂ 投与によるノンレム睡眠の消失	
EP1	アゾキシメタンによる腸管 aberrant crypt foci 形成の減少	COX-2(-/-)
EP2	排卵・受精障害 Apc ⁴⁷¹⁶ マウスにおける腸管ポリープ形成の減少 高塩負荷による高血圧 <i>in vitro</i> における破骨細胞形成異常	COX-2(-/-), COX-2(-/-), cPLA ₂ (-/-)
EP3	バイロジェンに対する発熱応答の消失 十二指腸における重炭酸分泌異常 出血性の充進と血栓塞栓性の減少	COX-2(-/-)
EP4	動脈管の開存 大腸炎における粘膜保護機能の低下と免疫応答の充進 炎症性骨吸収の低下 PGE ₂ 投与による骨形成の消失	COX-2(-/-), COX-1(-/-), COX-2(-/-) COX-2(-/-), COX-1(-/-)
FP	分娩消失	COX-1(-/-), cPLA ₂ (-/-)
IP	血栓塞栓傾向 炎症浮腫の減少 酢酸ライジング応答の減少	
TP	出血傾向と血栓抵抗性	

文献については、3), 4)を参照

し、筆者が解析を行ったいくつかのトピックスを取り上げ、COX のアイソザイム (COX-1, COX-2) との対応、各受容体による作用発現の分子機作を交えて紹介したい。

EP4受容体と動脈管リモデリング

EP4受容体は、薬理的には最後に同定されたPGE₂受容体サブタイプであるが、実際は、古典的なcAMP作動性PGE₂作用の多くに関わる受容体である⁶⁾。EP4受容体の欠損マウスは、プロスタノイド受容体欠損マウスのなかで最も重篤な表現型を呈し、すなわち動脈管の異常により新生仔死亡を示す⁵⁾⁶⁾。このマウスは、胎仔発育には異常を認めず健常に出生するが、95%以上の個体は、動脈管が開存することにより心不全を起し、生後72時間以内に死亡する。実際、EP4-mRNAは、動脈管平滑筋に強く発現しており、この発現は胎生15.5日の時点ですでに認められ、出生時まで高いレベルに維持されていた⁶⁾。動脈管は、肺動脈と下行大動脈をつなぐ胎児期に特有な血管であり、抵抗の高い肺循環を大動脈にシャントする役割をもつが、出生後、動脈管は速やかに閉鎖し肺循環が開始される⁷⁾。インドメタシンなどの非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)は、妊娠末期に投与すると胎児動脈管の収縮をひき起こし肺高血圧症に陥るケースが知られていた。胎児の体内ではPGE₂は胎盤などで産生され、その血中濃度は通常の20~30倍に高く保たれているが、インドメタシンがこのPGE₂産生を阻害すると動脈管が収縮することになる。また、ヒツジ胎仔の摘出動脈管に対してPGE₂を加えると弛緩作用を示すことも報告されている⁸⁾。したがって、胎生期の動脈管が開存しているのは、PGE₂が動脈管平滑筋を能動的に拡張しているためであり、出生後にはPGE₂の血中濃度が急速に低下して、動脈管の収縮・閉鎖が生じるものと考

えられてきた。しかしながら、EP4受容体欠損マウスは、胎生期の動脈管収縮を示すのではなく、出生後の動脈管開存という、一見全く逆の表現型を示した。また、EP4欠損型の胎仔にインドメタシンを投与しても収縮はみられず⁵⁾、動脈管は、その収縮性を欠失しているように見受けられた。

一方、このような動脈管の開存は、COX-1欠損マウスではみられないが、COX-2欠損マウス個体の約35%において認められ、さらに、COX-1/COX-2ダブル欠損マウスでは100%の個体が動脈管の開存ならびに新生仔死亡を示した⁹⁾。したがって、動脈管閉鎖は、基本的にCOX-2を必要とするが、COX-1により代償される。一方、インドメタシン投与による胎生動脈管の収縮は、COX-1の遺伝子型に関わらず、COX-2欠損マウスでは完全に消失していた。COX-2陽性細胞は、少なくとも出生直後の動脈管組織で平滑筋細胞に見出された。さらに、COX-1とCOX-2の個々に選択的な阻害薬を用いて、胎生のどの時期のPGが動脈管閉鎖に寄与するのかが検討されている¹⁰⁾。胎生18日にCOX-2阻害剤を投与すると胎仔動脈管の収縮がみられるが、15~18日まで連続投与した場合は、胎仔動脈管は収縮せず、さらに出生後の動脈管は開存していた。一方、COX-1選択的阻害薬は、動脈管に対する効果を示さないが、COX-2欠損マウスの胎生15~18日に連続投与すると、出生後に動脈管開存を示す個体の割合が100%となった。したがって、出生後の動脈管が閉鎖に至るか否かは、胎生15~18日の持続的なPGE₂が非常に重要であり、これによっではじめて動脈管の収縮能が獲得されるように見える(図2)。実際、胎生期では、動脈管がNSAIDs感受性を示す時期(17~19日)より以前から動脈管はEP4を発現しており、PGE₂血中濃度も高くなっていることを考えると、EP4受容体は、動脈管平滑筋の発達を促進し、血管平滑筋として収縮能の獲得そのものに影

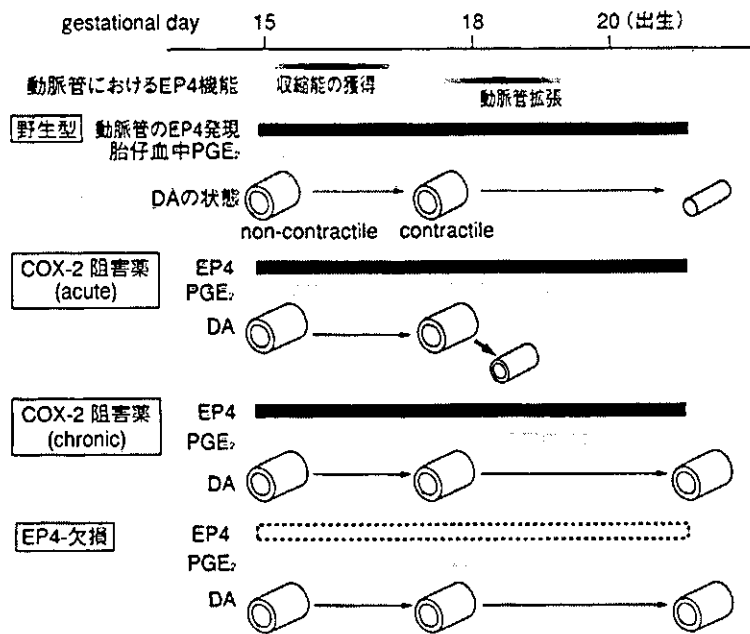


図2 動脈管のリモデリングにおいて推定される $PGE_2/EP4$ シグナリング
胎生期においては、血中 PGE_2 濃度は高く、 $EP4$ 受容体は動脈管に高発現している。ノックアウトマウスならびに COX 阻害薬を用いた結果から、胎生15~18日にかけて PGE_2 が持続的に $EP4$ に作用することが、出生後の動脈管収縮に必須であると考えられる。 $COX-2$ 阻害薬やインドメタシンを18日に一過性に作用すると動脈管は収縮するが、 $COX-2$ 阻害薬を15~18日に連続投与しても動脈管の収縮はみられず、さらに出生後の動脈管閉鎖も起こらない。 $EP4$ 欠損マウスでも、収縮能の獲得がなされていないため、18日にインドメタシンを投与しても収縮はみられず、出生後の動脈管閉鎖もみられない。

響を与えている可能性が考えられる。

PGF_{2α} 受容体 (FP) と 分娩・黄体退縮

PGF_{2α} は、強力な子宮収縮作用をもち、ヒトを含むさまざまな動物の生理的な分娩誘導因子 (uterotonin) ではないかといった議論がなされてきたが、同時に、黄体退縮作用をもち、家畜動物では生理的な黄体退縮因子 (lutelysin) であることが知られている。マウスにおいては、PGF_{2α} の受容体、FP は、子宮よりも黄体に高いレベルで発

現することを見出していた¹¹⁾が、PGF_{2α} 作用の欠乏が、マウスの黄体機能の異常をきたすのか、分娩異常をきたすのか、興味深い点であった。FP 欠損マウスは、発情周期、排卵、着床など雌性初期生殖過程には異常を認めなかったが、重篤な分娩遅延をきたし、胎児はすべて子宮内死亡を示した¹²⁾。マウスの場合、妊娠の維持に必要なプロゲステロンは、妊娠期間中を通じて黄体に依存するため、黄体退縮の異常が分娩遅延をひき起こす可能性が考えられた。実際、FP 欠損マウスでは、血清プロゲステロン濃度が20日を過ぎても高値を示すこと、卵巣切除により分娩の回復がみられた

ことから、FP欠損マウスの分娩異常は、黄体の機能亢進に起因することが示された。PGF_{2α}による黄体退縮が、ヒトの月経周期にも関与している可能性は十分に考えられる。

このような分娩遅延は、アラキドン酸を産生する酵素である細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cPLA₂)欠損マウスにおいても見出されており、これはプロゲステロン遮断薬の投与により改善された¹³⁾。また COX-1欠損マウスも分娩遅延を示し、この場合も血中プロゲステロンの亢進が認められることから¹⁰⁾、cPLA₂と COX-1が黄体退縮をひき起こす PGF_{2α}の産生に関与している。一方、COX-2の欠損マウスは妊娠不可能であり、分娩における COX-2の意義が評価できないものの、COX-1阻害薬をマウスに投与すると分娩を遅延させ、COX-2阻害薬は分娩時期に影響しなかった¹⁰⁾¹⁵⁾。したがって、COX-2に由来する PG は分娩に必須ではないようである。しかしごく最近、筆者らは、FP欠損体の妊娠末期マウスを卵巣切除すると、ほぼ20時間後に分娩がみられる

が、インドメタシンならびに COX-2阻害薬を処理すると、分娩が40時間後に遅延することを見出した¹⁶⁾。このことは、PGF_{2α}による黄体退縮作用とは別に、COX-2由来のプロスタノイドが子宮収縮活性を発揮して分娩に関与することを示している(図3)。現在のところ、分娩異常を示す表現型はFP受容体の欠損マウス以外にはみられないが、相互の機能を補償する複数のプロスタノイド受容体が分娩時の子宮収縮に寄与しているのかもしれない。

EP2受容体と排卵・受精

EP2とEP4は、どちらも PGE₂をリガンドとし cAMP 産生系に共役する受容体であるが、両受容体はちょうど COX アイソザイムの COX-1と COX-2に対応するように、遺伝子発現様式の点で異なる。すなわち EP4は恒常的に発現がみられるのに対して、EP2はホルモンや病態刺激により発現誘導を受けて機能する⁹⁾。たとえば、マク

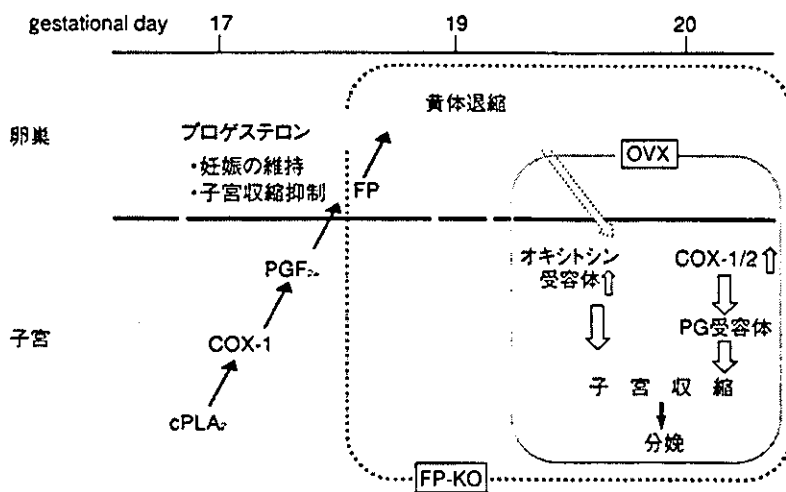


図3 マウスの分娩誘導におけるプロスタノイドの2つの役割
ノックアウトマウスの解析結果から推定されるプロスタノイドの2つの役割を模式的に示した。FP欠損マウスでは、黄体退縮がひき起こされず、点線内の現象がみられないが、卵巣切除によりプロゲステロン濃度を下げると赤線内の現象が回復する。FP欠損マウスを卵巣切除した場合においても、インドメタシンが分娩を遅延したことから、プロスタノイドによる子宮収縮作用も分娩に寄与していると考えられる。

ロファージは、通常 EP4 受容体を発現しているが、LPS で処理すると EP2 受容体を発現誘導する¹⁷⁾。このような発現制御の相違が、各受容体の生理機能にどう反映されるか興味深い点であった。

プロスタノイドが、初期生殖プロセスに関与することは、たとえばインドメタシンが排卵や受精に影響する実験結果から推察されていたが、COX-2 欠損マウスが、排卵・受精・着床・脱着膜化の各プロセスすべてに異常を示すことが報告された¹⁸⁾。同様の異常は、cPLA₂ 欠損マウスにおいても観察されている¹⁹⁾。一方、プロスタノイド受容体欠損マウスのなかで、着床や脱着膜化に障害を示すものは認められず、核内受容体の関与²⁰⁾

もしくは複数受容体による機能補償の可能性が考えられる。これに対して、EP2 受容体欠損マウスは、Litter size の減少を呈し、これは排卵と受精の障害に起因した²¹⁾²²⁾。ゴナドトロピン処理を行った卵巣では、hCG 投与後 3 時間でほぼすべての細胞で COX-2 の遺伝子発現が誘導され、8 時間では、卵を取り巻く卵丘細胞に発現が限局する。一方、EP2 受容体は hCG 投与後 3 時間に卵丘細胞に発現誘導され、その後、排卵後の卵管内に至るまで、卵丘での発現が維持される²¹⁾。卵丘細胞機能としてヒアルロン酸などの細胞外基質を分泌して細胞間隙を大きくする現象、cumulus expansion が知られる²³⁾。そこで *in vitro* における cumulus expansion を調べたところ、EP2 欠損マ

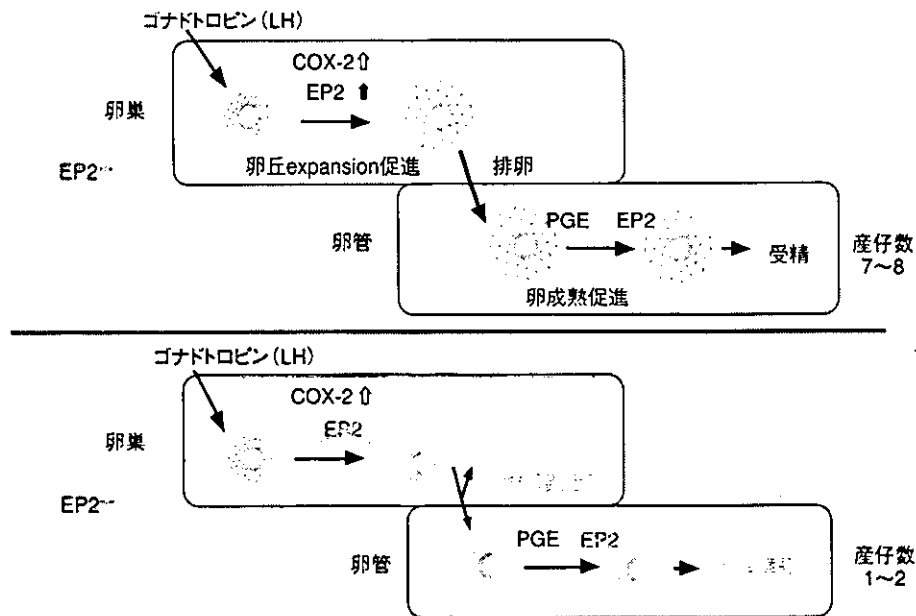


図4 EP2欠損マウスにおける排卵と受精の障害

野生型では、ゴナドトロピン刺激により卵胞内で COX-2 と EP2 受容体が発現誘導を受け、cumulus expansion を促進して排卵促進する。排卵された後も COX-2 ならびに EP2 は卵丘細胞に発現し、受精に至るまでの卵丘機能を介して卵の最終成熟を促進する。EP2 欠損マウスでは、卵丘機能の不全により、排卵数で 80%、受精率で 20% 程度に減少し、結果的に Litter size が減少する。

ウスの卵・卵丘複合体を用いた場合は、PGE₂による expansion が消失しており、また実際、卵管における cumulus の形態を調べたところ、*in vivo* における expansion に異常を有すると考えられた²¹⁾。野生型、EP2欠損マウスからの卵を用いて人工授精を試みたところ、卵・卵丘複合体を用いた場合には、EP2欠損体が野生型に比べて低い受精率を示したが、卵細胞のみを用いた場合には、遺伝子型による差はみられなかった。したがって、EP2欠損マウスにみられた受精率の低下は、卵丘細胞の機能不全に起因するものと考えられた()。

ゴナドトロピン処理により卵胞内には種々の遺伝子発現が誘導されるが、このなかに、分泌性蛋白質をコードする遺伝子、TNF- α -stimulated gene6(TSG-6)が含まれる。TSG-6は、ヒアルロン酸結合能をもち、細胞外基質の安定化と会合に重要な役割を果たすと考えられており、ゴナドトロピンにより顆粒膜細胞ならびに卵丘細胞に誘導される。興味深いことに、この発現誘導は、インドメタシン処理により抑制された²⁴⁾ことから、本遺伝子誘導にプロスタノイドの関与が考えられた。Ochsnerらは、COX-2欠損ならびにEP2欠損マウスの卵巣内におけるTSG-6の発現を解析したところ、いずれの欠損マウスにおいても、卵丘細胞におけるTSG-6の遺伝子発現が顕著に減弱していた²⁵⁾。ごく最近、TSG-6の欠損マウスが作製され、本マウスの卵丘細胞では、cumulus expansion が全くみられず、受精が成立しないことが報告されている²⁶⁾。したがって、PGE₂によるEP2を介した卵丘細胞機能の促進は、TSG-6の発現亢進を介するのかもしれない。

おわりに

プロスタノイドは、ほとんどすべての臓器で産生されるが、その効果が及ぶのは産生局所に限定

されるため、その意義は部位ごとに全く異なる。アスピリンやインドメタシンは、このように個々に意義の異なるプロスタノイド産生を全身性に抑制するために、副作用を発揮することが不可避であった。本稿で紹介したようなノックアウトマウス解析により、個々の生理作用・病態作用に関わる受容体、COX が明らかになれば、個々の疾患・症状に対してのみ効果的に治療効果を発揮する優れた医薬品の創製も決して夢ではない。たとえば、本稿で紹介したように、COX-1選択的阻害薬は、胎児動脈管に対する毒性は示さない早産防止薬として有効であると期待される。

謝辞

本総説で引用した研究の多くは、京都大学大学院医学研究科の成宮 周教授をはじめ、多くの先生方との共同研究によって遂行されたものです。この場をお借りして深甚の謝意を表します。

文献

- 1) Coleman RA, Kennedy I, Humphrey PPA, et al: Prostanoids and their receptors. *in* Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol. 3, ed by Emmett JC, Oxford, UK, Pergamon Press 643-714, 1990
- 2) Coleman RA, Smith WL, Narumiya S: International union of pharmacology classification of prostanoid receptors; Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46: 205-229, 1994
- 3) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F: Prostanoid receptors; Structures, properties and functions. *Physiol Rev* 79: 1193-1226, 1999
- 4) Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A: Distribution and function of prostanoid receptors; Studies from knockout mice. *Prog Lipid Res* 39: 289-314, 2000
- 5) Nguyen MT, Camenisch T, Snouwaert JN, et al: The prostaglandin receptor EP4 triggers

- remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* **390** : 78-81, 1997
- 6) Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, et al : Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP₄-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* **246** : 7-12, 1998
 - 7) Smith GC : The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacol Rev* **50** : 35-58, 1998
 - 8) Smith GC, Coleman RA, Mcgrath JC : Characterization of dilator prostanoid receptors in the fetal rabbit ductus arteriosus. *J Phramacol Exp Ther* **271** : 390-394, 1994
 - 9) Loftin CD, Trivedi DB, Langenbach R : Cyclooxygenase-1-selective inhibition prolongs gestation in mice without adverse effects on the ductus arteriosus. *J Clin Invest* **110** : 549-557, 2002
 - 10) Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, et al : Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** : 1059-1064, 2001
 - 11) Sugimoto Y, Hasumoto K, Namba T, et al : Cloning and expression of a cDNA for mouse PGF receptor. *J Biol Chem* **269** : 1356-1360, 1994
 - 12) Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, et al : Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* **277** : 681-684, 1997
 - 13) Uozumi N, Kume K, Nagase T, et al : Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature* **390** : 618-622, 1997
 - 14) Gross GA, Imamura T, Luedke C, et al : Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 11875-11879, 1998
 - 15) Reese J, Paria BC, Brown N, et al : Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : 9759-9764, 2000
 - 16) Tsuboi K, Iwane A, Nakazawa S, et al : Role of prostaglandin H2 synthase-2 in murine parturition ; Study on ovariectomy-induced parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Biol Reprod* **69** : 195-201, 2003
 - 17) Ikegami R, Sugimoto Y, Segi E, et al : The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J Immunol* **166** : 4689-4696, 2001
 - 18) Lim H, Paria BC, Das SK, et al : Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91** : 197-208, 1997
 - 19) Song H, Lim H, Paria BC, et al : Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development* **129** : 2879-2889, 2002
 - 20) Lim H, Gupta RA, Ma WG, et al : Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR-delta. *Genes Dev* **13** : 1561-1574, 1999
 - 21) Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, et al : Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** : 10501-10506, 1999
 - 22) Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, et al : Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* **103** : 1539-1545, 1999
 - 23) Eppig JJ : Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol Reprod* **25** : 191-195, 1981
 - 24) Yoshioka S, Ochsner S, Russell DL, et al : Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Endocrinology* **141** : 4114-4119, 2000
 - 25) Ochsner SA, Russell DL, Day AJ, et al : Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. *Endocrinology* **144** : 1008-1019, 2003
 - 26) Fulop C, Szanto S, Mukhopadhyay D, et al : Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development* **130** : 2253-2261, 2003

ヒスタミン合成を介して発現する生理機能の解析

田中智之

Physiological Function Mediated by Histamine Synthesis

Satoshi TANAKA

Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received April 4, 2003)

Histamine is involved in a variety of physiologic responses, such as inflammation, type I allergy, gastric acid secretion, and neurotransmission. Previous studies have focused on specific receptors for histamine and histamine release through degranulation, and the regulation of histamine synthesis and its physiologic roles remain to be clarified. We have studied histidine decarboxylase (HDC), the rate-limiting enzyme for mammalian histamine synthesis. Immunocytochemical approaches with an anti-HDC antibody revealed that histamine synthesis occurs in two distinct compartments of mast cells, cytosol and granules, and is regulated by the posttranslational processing of HDC. We also found that histamine synthesis in mast cells is markedly induced by IgE even in the absence of antigens, which may be relevant to enhanced responses of mast cells under allergic conditions. We then developed HDC-deficient mice by gene targeting to investigate the physiologic roles of histamine. We not only confirmed that histamine is essential for type I allergy and stimulates gastric acid secretion, but also found that histamine may regulate the proliferation and differentiation of mast cells. Furthermore, in HDC-deficient mice histamine produced by infiltrated neutrophils can suppress the production of antitumoral cytokines, such as interferon- γ and tumor necrosis factor- α through H₂ receptors in the tumor tissues. In this review, we describe recent topics in histamine research, including our results focusing on histamine synthesis and its physiologic roles.

Key words—histamine; histidine decarboxylase; mast cell; allergy; intracellular localization; gastric acid secretion

1. はじめに

ヒスタミンは炎症、アレルギー、胃酸分泌、神経伝達と言った生体反応を調節する生体アミンであり、そのアンタゴニストはアレルギーや消化性潰瘍の優れた治療薬として長い歴史を有している。近年ではヒスタミンはそのような作用に加えて、腫瘍増殖や免疫応答の調節にも関与することが報告されており、生体内の広い範囲で多彩な作用を有することが明らかにされている。ヒスタミン産生細胞としてはマスト細胞や、好塩基球、ECL細胞 (enterochromaffin-like cell) などがよく知られているが、いずれの細胞においてもヒスタミンは顆粒内に貯留され、刺激に応じて細胞外へと放出される。放出さ

れたヒスタミンは標的細胞の特異的受容体を介してその作用を発揮するが、現在のところ4種のGタンパク質共役型受容体の特異的受容体として同定されている。炎症、即時型アレルギーに関与するH₁受容体、胃酸分泌反応に関与するH₂受容体は、いずれもアンタゴニストが臨床で成功を収めており、基礎的研究も比較的進展している。一方、中枢特異的に発現するH₃受容体、血球系細胞特異的に発現するH₄受容体はごく最近遺伝子がクローニングされ、新たな創薬の標的として注目を集めている。従来の研究では薬理学的手法による受容体研究とそのリガンド開発、あるいは脱顆粒機構の解析に重点が置かれてきたことから、ヒスタミン合成過程に関しては不明な点が数多く残されていた。しかしながら、合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (L-histidine decarboxylase; HDC) は誘導性の酵素であり、刺激に応じて数倍から百倍以上にも酵素活性が上昇することが様々な系において報告されてお

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: satoshit@pharm.kyoto-u.ac.jp

*本総説は、平成15年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

り、合成を介したヒスタミン作用の調節という観点に基づいた研究が必要と考えられた。

HDC に関してはいくつかのグループが精製を目指していたが、同様にビタミン B₆ を補酵素とする他の脱炭酸酵素のグループと比較するとその精製は困難であった。著者の所属する研究室ではマウス癌化マスト細胞株、P-815 から HDC の精製を行いその部分配列の同定に初めて成功し、¹⁾ 引き続きその cDNA クローニングを行った。²⁾ その結果、精製酵素は 53-kDa の分子量から成る 2 量体であるが、cDNA がコードするタンパク質の分子量は 74-kDa であり、HDC において翻訳後プロセシングが起こっている可能性が示された。そこで著者らは特異的な抗体を作製し、マスト細胞内における HDC の翻訳後プロセシングを解析し、その役割が酵素の細胞内局在性を調節することにあることを見出した。ヒスタミンが細胞内においてどこで合成され、またどのような機構で顆粒に貯留されるのかは従来不明であり、HDC の細胞内局在を明らかにすることはその解明につながる知見である。著者らはその後、ヒスタミン生合成という観点からその生理作用を解析し、近年は HDC 欠損マウスを用いてヒスタミン合成が重要な機能を果たす生理現象の解明に努めている。本総説では、著者らが得たヒスタミン研究の成果を中心に、ヒスタミンの機能に関して近年新たに得られた知見を併せて紹介する。

2. HDC の翻訳後プロセシングとその細胞内局在性の解析

HDC は B₆ 酵素ファミリーに分類されるが、一次構造上の特徴として他の HDC とホモロジーのある脱炭酸酵素と相同性のない C-末端側 20-kDa の領域を有することが挙げられる。精製酵素のプロテアーゼ断片の解析から、この部分は翻訳後プロセシングにより失われる領域であることが推察された。²⁾ また一般的にプロ体で合成される酵素はその細胞内での活性調節の必要性から低活性体であることが多いが、発現系での検討では 74-kDa 分子種にも酵素活性が認められた。バキュロウイルス-昆虫細胞発現系や COS 細胞発現系では、74-kDa の前駆体分子種は不溶性画分に、C-末端 20-kDa の領域を欠失させた変異体 54-kDa 分子種は可溶性画分に、それぞれ分布することが明らかとなり、プロセシングは酵素の細胞内局在性を支配している可能

性が考えられた。^{3,4)} そこで著者らは HDC に対する特異抗体を作製し、⁵⁾ 高い HDC 活性を有する細胞株であるラット好塩基球細胞株、RBL-2H3 を用いて酵素の細胞内局在性を検討した。⁶⁾ [³⁵S] 標識した細胞を用いて免疫沈降法により新生 HDC の代謝回転を検討したところ、74-kDa 分子種から 53-kDa 分子種への翻訳後プロセシングが確認された。また Streptolysin-O 処理により形質膜を選択的に透過させた際には、74-kDa 分子種のみが漏出し、約 40% の活性を得た。このことはサイトゾルには 74-kDa 分子種のみが活性体として存在することを示唆している。さらに Percoll を用いた密度勾配遠心分画により、小胞体、ゴルジを含む画分においてプロセシングが起こっていること、また 53-kDa 分子種は顆粒画分にも分布することが明らかとなった。酵素活性、及びヒスタミンはサイトゾルと顆粒の両画分に検出された。次に 53-kDa 分子種の局在の詳細を検討することを目的として、ジギトニンで形質膜を選択的に透過処理した後にトリプシン消化を行ったところ、74-kDa 分子種が完全に消化されるのに対して 53-kDa 分子種は抵抗性を示し、その他のサイズの分子種は検出されなかった。このことは、74-kDa 分子種がサイトゾルあるいはサイトゾルに接した領域に分布すること、及び 53-kDa 分子種がプロテアーゼによる消化から免れる領域、すなわちオルガネラの内腔側に存在することを示唆している。以上の結果から、HDC はサイトゾルで翻訳された後、小胞体へと輸送されその内腔側でプロセシングを受け、顆粒へと輸送されることが推察された。しかしながら、HDC は膜タンパク、分泌タンパクの多くに見られる N-末端側の典型的なシグナル配列を持たないこと、また膜貫通可能な疎水性領域を持たないことなどから、小胞体への輸送は未知の機構で行われている可能性が考えられた。そこで、ウサギ網状赤血球を用いた *in vitro* 翻訳系にイヌ臍臓ミクロソーム膜を再構成した実験系において輸送に関する解析を行ったところ、HDC のミクロソームへの移行は翻訳と共役しないことが明らかとなった。⁷⁾ COS 細胞発現系を用いた C-末端欠失変異体の解析から C-末端側 10-kDa の領域が小胞体移行に重要であることが判明し、その領域を C-末端側に結合させた Green fluorescent protein (GFP) 融合タンパク質はやはり小胞体へと

局在し、この領域に小胞体輸送シグナルが含まれていることが明らかとなった。⁷⁾このような移行機構は哺乳類のタンパク質ではほとんど報告がないが、一部のサイトカインや増殖因子においてもメカニズムはやはり不明であるがシグナル配列非依存的な細胞外への分泌が報告されており、HDCの輸送経路はこれらとの関連においても興味深い例である。また酵母において報告されている同様の可溶性タンパク質の小胞体移行に関しては、新生ペプチド輸送チャンネルである Sec61 複合体を利用する点ではシグナル配列を有する場合と同じであることが示されているが、どのようにして小胞体まで輸送されるかと言った詳細は不明である。このような局在性、移行は HDC の C-末端側配列により支配されていることから、現在その領域に結合するタンパク質の同定を進めている。

著者らは一連の解析過程で、53-kDa 分子種に比してサイトゾルに存在する 74-kDa 分子種は非常に不安定であることを見出した。そこで種々のプロテアーゼ阻害剤を培地中に添加し 74-kDa 分子種の分解を測定したところ、ラクタシステンを初めとするプロテアソーム阻害剤により分解が抑制された。この反応を透析したサイトゾルを用いて *in vitro* で測定を行ったところ HDC の分解は観察されず、

ATP を添加することにより促進されることを見出した。またプロテアソーム阻害剤存在下培養し、抗 HDC 抗体で免疫沈降、抗ユビキチン抗体でイムノブロットを行うことによりポリユビキチン化された HDC の蓄積を確認した。⁸⁾ HDC には複数の PEST 領域と呼ばれる配列が存在することが報告されている。PEST 領域を有するタンパク質は一般的に短寿命であり、因果関係は必ずしも明確ではないがプロテアソームにより分解されることが示されており、HDC もまたこのカテゴリーに含まれることが明らかとなった。

以上の HDC の細胞内局在性、代謝回転に関する知見を模式的に図示した (Fig. 1)。マスト細胞ではヒスタミンはサイトゾル、顆粒という 2 つのコンパートメントにおいて合成され、それぞれ 74-kDa、53-kDa 分子種が関与すると考えられる。それぞれのプールの役割は现阶段では明確ではないが、サイトゾルにおけるヒスタミン合成は 74-kDa 分子種が短寿命であることから、HDC の転写レベルでの誘導パターンと密接に関連することが推察される。HDC は種々の刺激により転写レベルで誘導を受ける発現量変化の大きい酵素であることから、速やかなヒスタミン産生が必要な応答ではサイトゾルにおけるヒスタミン合成が寄与するものと考えられる。

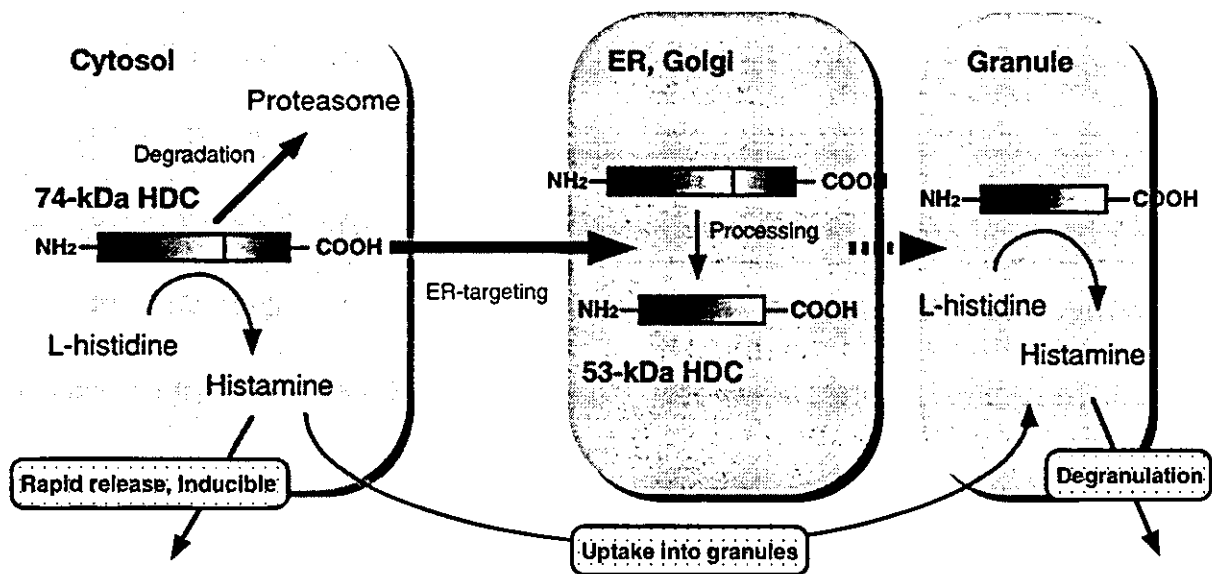


Fig. 1. Intracellular Localization of HDC in Mast Cells

This figure presents a proposed model for intracellular localization of HDC in mast cells. HDC is translated in the cytosol as a precursor, of which molecular weight is 74-kDa, and then targeted to the ER, in which the posttranslational processing of HDC occurs. Histamine is synthesized in the two compartments of mast cells, cytosol and granules. The 74-kDa precursor form was also found to be degraded through ubiquitin-proteasome pathway.