

プロスタグランジン E 受容体サブタイプ EP4 欠損マウスの作製とその表現型の解析

瀬木 恵里

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

A Study for Functions of Prostaglandin E Receptor EP4 Subtype
by Analysing Knockout Mice

Eri SEGI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received September 14, 2000)

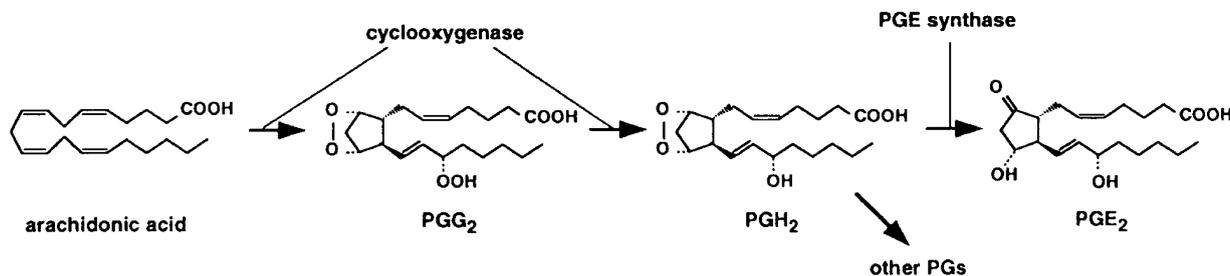
The physiological role of the prostaglandin (PG) E₂ receptor EP4 subtype was investigated by the generation of EP4-deficient mice by gene targeting. Loss of the EP4 receptor was not lethal in utero, but most EP4 (−/−) neonates became pale and lethargic approximately 24 h after birth, and died within 72 h. Less than 5% of the EP4 (−/−) mice survived and grew normally more than a year. Marked congestion in the pulmonary capillaries were observed before death, suggesting that EP4 (−/−) neonates had left-sided heart failure. Histological examination revealed that the ductus arteriosus in dead neonates remained open, while it was partially closed in the survivors. *In situ* hybridization study showed that EP4 mRNA was strongly expressed in the ductus. The treatment of indomethacin, an inhibitor of PG synthesis, on wild-type fetus induced constriction of ductus arteriosus, while the ductus in EP4 (−/−) fetus was insensitive to indomethacin. These results suggest that neonatal death is at least partly due to patent ductus arteriosus, and that the EP4 receptor plays a role in the regulation of the patency of this vessel. They also indicate that the normal function of the EP4 receptor is essential in neonatal adaptation of the circulatory system.

Key words—prostaglandin; EP4 receptor; ductus arteriosus; knockout

1. 緒言

プロスタノイドはプロスタグランジン (Prostaglandin; PG) とトロンボキサンよりなり, 様々な生理作用を持つ一群の生理活性脂質である. プロスタノイドは細胞外からの刺激に応じて活性化するホスホリパーゼ A₂ の作用より, 膜リン脂質から切り出されるアラキドン酸を基質として, シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase; COX) の働きで産生されるプロスタノイドに共通の前駆体である PGH₂ を介して各種の PG 合成酵素の作用で産生される. プロスタグランジンの 1 つであり, 生体内で最も大量にかつ広範囲の組織で産生される PGE₂ は, PGH₂ から PGE 合成酵素によって生成され, 細胞外に分泌され, 産生細胞自身やその周辺細胞の細胞膜上に存在する受容体と結合して作用を発揮する (Fig. 1).¹⁾ 種々のアゴニスト・アンタゴニストを用いる薬理学的研究により, まず, PGE 受容体には情報伝達を異にする 4 種類のサブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4 と分類) が存在することが明らかにされた. すなわち, EP1 は細胞内 Ca 上昇系, EP2 と EP4 は cAMP 上昇系, EP3 は cAMP 減少系に

それぞれ共役する.^{2,3)} 近年, 4 種類の PGE 受容体サブタイプの遺伝子クローニングが行われ, 発現細胞を用いての受容体の構造とリガンド結合特異性, 共役 G 蛋白, 情報伝達系, イソフォームの有無などの生化学的性質 (Table 1), また, Northern blot や *in situ* hybridization によってマウスの組織・細胞における受容体 mRNA の発現部位の同定 (Fig. 2), さらに, 遺伝子の発現調節機構の解析などが行われている.⁴⁾ これらの研究成果は, 各 PGE サブタイプ受容体に対する選択性の高いアナログの合成を可能とするばかりではなく, 薬剤の代謝, 適用に必要な生体情報を与えるものである. しかし, 各サブタイプ受容体に対する選択性の高いアゴニスト, アンタゴニストが十分に利用できない現状においては, 各サブタイプ受容体が生体内においてどのような生理条件下で機能するのか, その機能は個体レベルでの生体作用でどれほどに重要であるかなどについて明らかにすることは非常に困難である. そこで, この問題にアプローチするためには, 明らかにされた PGE 受容体の遺伝子操作により, PGE 受容体遺伝子を欠損するノックアウトマウスを作製し,

Fig. 1. Biosynthesis of PGE₂

PGE₂ is synthesized from arachidonic acid by the actions of cyclooxygenase and PGE synthase.

Table 1. Molecular and Biochemical Properties of the Prostaglandin E Receptor Subtypes

Receptor type	Amino acids	Kd (nM) [³ H] PGE ₂	Rank order of binding affinity	Signaling G protein	Gene locus	Isoforms
EP1	405	21	PGE ₂ > I ₂ > E ₁ >> F _{2α}	[Ca ²⁺] ↑ (G)?	19p 13.1 (human) chr 8 (mouse)	2 (rat)
EP2	362	27	PGE ₂ = E ₁ >> I ₂ >> F _{2α} , D ₂	cAMP ↑ Gs	not identified	None
EP3	365	3	PGE ₂ = E ₁ >> I ₂ > D ₂ > F _{2α}	cAMP ↓ [Ca ²⁺] ↑ Gi(Gq, Gs)	1p 31.2 (human) chr 3 (mouse)	7 (human) 3 (mouse)
EP4	513	11	PGE ₂ = E ₁ >> I ₂ , F _{2α} , D ₂	cAMP ↑ Gs	5p 13.1 (human) chr 15 (mouse)	None

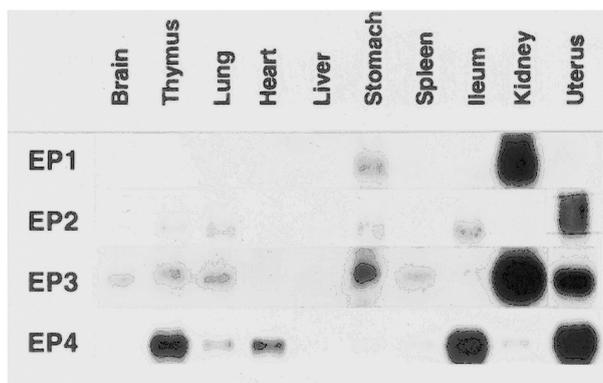


Fig. 2. Distribution of the PGE Receptor Subtype mRNAs in Various Mouse Tissues

それを用いた研究の遂行が必要であると考えた。

そこで筆者は、各々の PGE 受容体サブタイプ遺伝子を欠損させたマウスを作製し、それらの表現型の逐一的な解析を行うことを目的として本研究を実施した。その結果、4種類の PGE 受容体欠損マウスの作製に成功し、それらの表現型として、EP4 受容体欠損マウスは新生児死亡を起こすことを発見した。⁵⁾ また、EP3 受容体欠損マウスは免疫性発熱に無応答になること、⁶⁾ EP2 受容体欠損マウスは排

卵・受精の過程に異常が発症すること⁷⁾を明らかにすることができた。本総説では、これら欠損マウスの表現型のうち、EP4 受容体欠損マウスに焦点をあてて記述する。

2. 実験結果

2-1. PGE 受容体 EP4 サブタイプ欠損マウスの作製

マウス 129/Sv の genome DNA ライブラリーより EP4 受容体遺伝子を単離し、遺伝子構造のマッピングを行った。これらの解析から主要なコーディング領域を含むエキソンは第2エキソンであることが判明した。ターゲティングベクターはこれらの領域にネオマイシン耐性遺伝子を置換することとし、genome DNA との相同領域外にもう1つのマーカー遺伝子である単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ遺伝子を導入することとした (Fig. 3A)。常法に従い、ターゲティングベクターを 129/Ola 由来の ES 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、相同組み換え体のクローン選別を行った。得られたクローンをマウスの胚盤胞にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製した。キメラマウスを雌の野生型マウス (C57BL/6) と交配させることにより (129/Ola)X(C57BL/6) を遺伝的 background に持つ F1 ヘテロマウス、さらにそれら F1 マウス同士をかけ合わせ F2 マウス (野生型, ヘテロ変異体, ホモ変異体) を得た。相

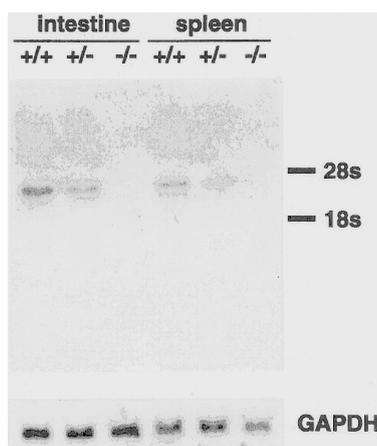
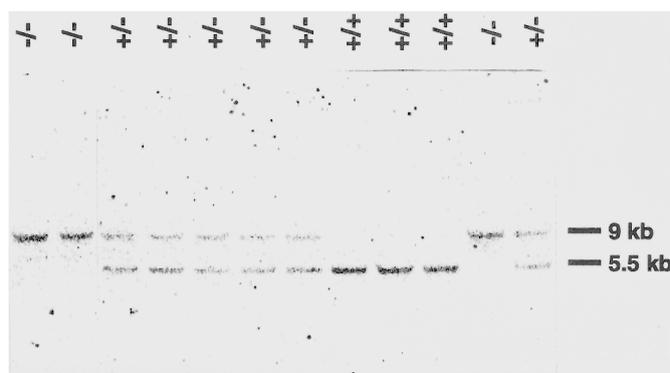
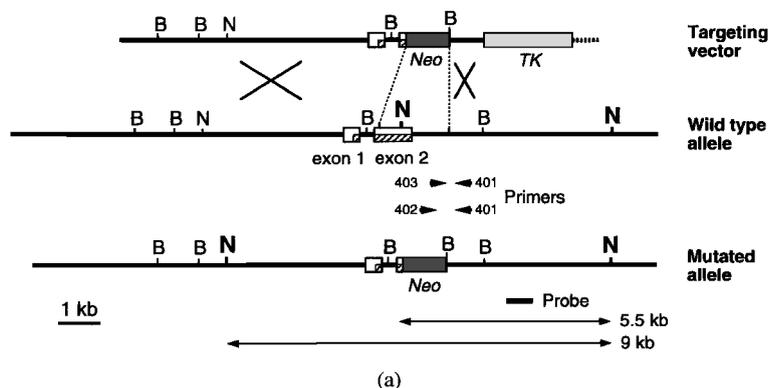


Fig. 3. Disruption of the Gene Encoding the EP4 Receptor

(A) Strategy used for EP4 gene targeting. Construct of the targeting vector, organization of the EP4 gene, and the structure of the targeted genome are shown. Restriction sites are indicated: B: Bam HI, and N: Nsi I. Arrowheads indicate PCR primers. The mutated allele is identified by using the primers 401 and 402. The wild type allele is identified by using the primers 401 and 403. The thick line indicates the DNA probe used in Southern hybridization. TK: thymidine kinase gene, Neo: neomycin-resistant gene. (B) Southern blot analysis of Nsi I-digested genomic DNA from a representative litter of 12 pups. +/+ : wild type, +/- : heterozygote, -/- : homozygote. (C) Northern blot analysis. Total RNA was isolated from the intestine and spleen of newborn mice and was used for hybridization with a specific probe. Hybridization signals for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) are shown in the lower panel.

同組換えを起こした ES 細胞の選択，ヘテロ変異体，ホモ変異体の遺伝子型の確認は genome DNA の Southern 解析により行った (Fig. 3B)。また，実際に受容体が欠損していることを確認するために，Northern 解析を行った (Fig. 3C)。

2-2. EP4 受容体欠損マウスの死因についての解

析 EP4 受容体ヘテロ変異体のかけ合わせにおいて，離乳後の F2 マウスの遺伝子型を解析したところ，EP4 ホモ変異体は野生型に対し，約 5% 程度しか存在せず，EP4 ホモ変異体は出生以降の生育過程で致命的な障害のあることが示唆された。そこで，このマウスにおける死因の解析を試みた。ま

ず、胎生中期・後期において母体内に生存している仔の遺伝子型を解析したところ、EP4 ホモ変異体は野生型と同程度存在していた。しかしながら、生後3日目において調べたところ、既にその大部分が死亡していることが確かめられた (Table 2)。そこで、周産期において死亡に至るまでの経過を詳細に観察したところ、ホモ変異体は生後すぐに呼吸を開始し、外見上野生型と異なるところは見られず、また、哺乳行動も認められた。しかし、生後24時間以内に衰弱が始まり皮膚が蒼白となり、大多数は生後72時間以内に死亡に至ることが判明した。

次に衰弱しているEP4 ホモ変異体の組織的検討を行ったところ、肺・心血管系に異常が存在することが判明した。すなわち、肺胞構造が乱れており毛細血管のうっ血がみられ、循環障害が起きていることが示唆された (Fig. 4)。また、左心室、肺動脈の拡張も観察された。これらの結果は左心室不全による肺循環系のうっ血と体循環系の循環不全が起きていることを示している。これらの異常を引き起こしている原因組織を解析するために、胎児循環系におけるEP4 受容体 mRNA の発現解析を *in situ* hybrid-

ization 法を用いて行ったところ、動脈管と呼ばれる胎児期特異的に機能する血管平滑筋にEP4 mRNA が大量に発現していることが明らかになった (Fig. 5)。この発現は動脈管特異的であり、隣接する大動脈・大静脈にはほとんど発現が認められなかった。また、この発現は少なくとも胎生中期であるE15日から出生後24時間の時点まで認められた (data not shown)。

動脈管は肺呼吸を行わない胎児期において、肺動脈と大動脈をバイパスしている血管であり、生後呼吸を開始するとともに閉鎖することが知られている。⁸⁾そこで、生後における動脈管の様子を凍結切片作成法により経時的に観察したところ、野生型では生後呼吸を開始するとともに動脈管が収縮し始め、約5時間で完全に閉鎖に至ったが、EP4 ホモ変異体では生後24時間が経過しても動脈管の閉鎖が認められず、死亡するまで閉鎖不全を起こしていることが判明した (Fig. 6)。生後6時間における野生型とEP4 ホモ変異体の動脈管をさらに観察したところ、野生型の動脈管平滑筋では肥厚が認められ、内皮細胞により血管内部が閉鎖していたのに対し、ホモ変異体の動脈管平滑筋では全く肥厚はなく、血管収縮が起っていないことが判明した (Fig. 7)。一方、少数であるが生存したEP4 ホモ変異体の動脈管は、完全ではないものの部分的な閉鎖を起こしていた (Fig. 8)。死亡したすべてのEP4 ホモ変異体は動脈管の閉鎖不全を起こしていたこと、また生存した少数のホモ変異体は不完全であるものの動脈管収縮を起こしていたことより、大部分のEP4 受容体欠損マウスの死亡原因は動脈管の閉鎖不全によることが示唆された。

EP4 受容体ホモ変異体において動脈管閉鎖の表現型にばらつきが生じる原因の1つとして、マウスの遺伝的背景の違いによることが考えられる。戻し交配により遺伝的背景をC57BL/6に近づけたEP4

Table 2. Genotypes of Progenies of Heterozygote Inter-crosses

Genetic background	Time of analysis	Genotype of progenies from (+/-) × (+/-)		
		+/+	+/-	-/-
(129/Ola) × (C57BL/6)	E 14.5 fetuses	16	41	20
	E 19.5 fetuses	40	67	37
	3-day-old neonates	181	309	5
(C57BL/6)	3-day-old neonates	50	84	0

The genotypes and numbers of living mice and fetuses are shown.

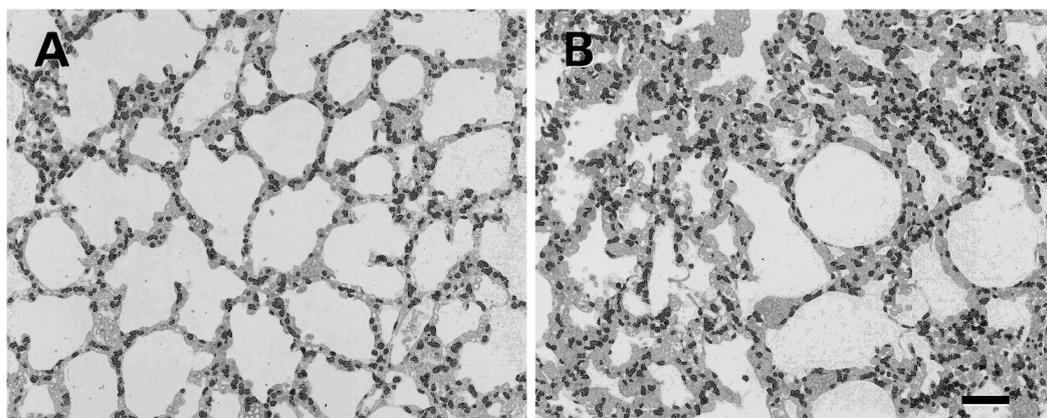


Fig. 4. Histological Analysis of Lungs from a Wild Type (A) and a Homozygous (B) Mouse Sacrificed at 30 h after Birth. Marked congestion of the pulmonary capillaries and disorganized alveolar structures are seen in the homozygous lung. Bar: 50 μ m.

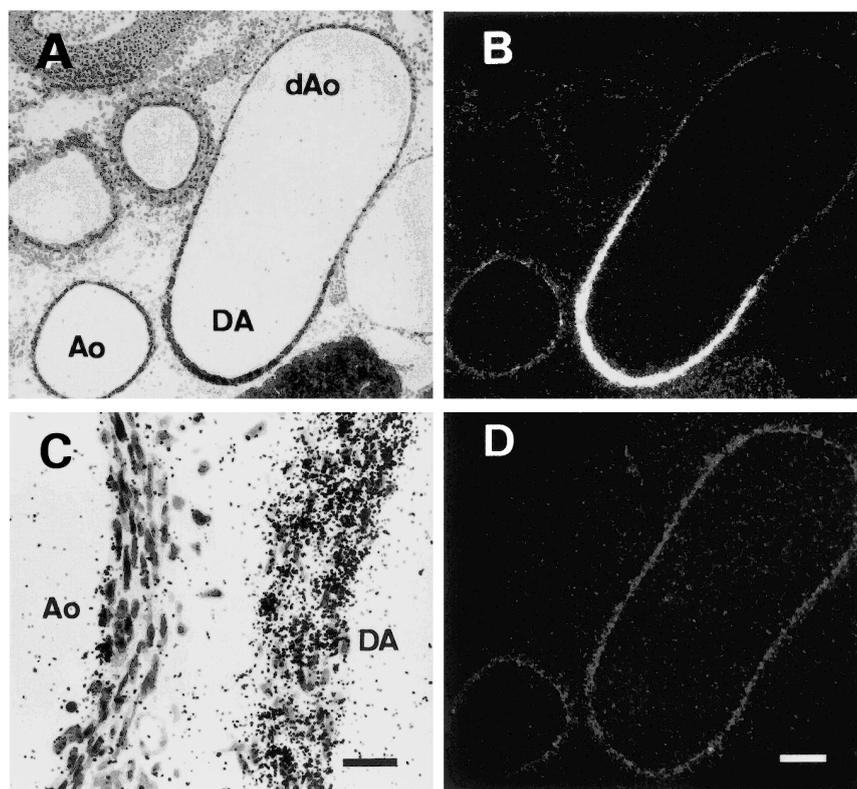


Fig. 5. *In situ* Hybridization of the EP4 Transcripts

Photomicrographs are thoracic sections of a wild type E18.5 fetus. These sections were hybridized with a ^{35}S -labeled antisense RNA probe for the EP4 receptor in the absence (A, B and C) or presence (D) of an excess amount of unlabeled probe (A and C: bright-field, B and D: dark-field). Strong signals are observed in the smooth muscle layer of the ductus arteriosus. Ao: aorta, dAo: descending aorta, DA: ductus arteriosus. Bars: 200 μm (D) and 25 μm (C). The magnifications of micrographs A, B and D are the same.

ヘテロ変異体を用いて仔の生存率を検討したところ、生存続ける個体はなかった (Table 2). さらに、少数の生存した遺伝的背景の異なる EP4 ホモ変異体同士をかけ合わせたところ、その生存率は4回のかけ合わせ時点で35%にまで上昇した (Table 3). これらのことから、生存した EP4 ホモ変異体ではマウス系統で異なる未同定の動脈管収縮因子によって動脈管の部分的な収縮が起こったものと考えられる. このようにして生存した EP4 ホモ変異体は外観上の顕著な異常は観察されず1年以上の生存が可能であり、生殖も可能であった.

2-3. EP4 受容体欠損マウスの動脈管の性質についての解析 EP4 受容体は cAMP 上昇系に共役しており、またウサギ動脈管を用いた薬理実験からは PGE_2 が cAMP 上昇を介して動脈管を弛緩させる働きを持つことが示唆されている.⁹⁾ また、筆者の研究により、マウス動脈管に EP4 受容体 mRNA が大量に発現していることが見出された. したがって、EP4 受容体が欠損した場合、動脈管の収縮が仮説されたが、実際に表れた表現型は動脈管の収縮不全であった. このことは、EP4 受容体欠損マウスの動脈管は、単に EP4 受容体の弛緩機能のみの欠損ではなく、動脈管の収縮・弛緩に参与する他

の因子の働きに変化が起きている可能性を示唆していると考えられる. そこで、EP4 ホモ変異体の動脈管の性質がどのように変化しているかについて検討を行った. まず、動脈管における EP4 受容体以外の7種類のプロスタノイド受容体 (EP1, EP2, EP3, PGD 受容体 [DP], PGF 受容体 [FP], PGI 受容体 [IP], Tromboxane 受容体 [TP]) mRNA の発現及び受容体の内因性リガンドを合成する COX-1, COX-2 の発現に変化がないかについて解析した. その結果、野生型マウスの動脈管では EP1, TP 各受容体 mRNA は中程度に、EP3, DP 各受容体 mRNA はかすかに、一方 COXs については COX-1 が中程度に発現していることが分かった. しかし、これらの発現は EP4 受容体の発現が動脈管に局在していることは異なり、動脈管とともに隣接する大動脈にも発現が認められた (Table 4). さらに、このような発現パターンは EP4 ホモ変異体の動脈管においても観察された (data not shown). したがって、EP4 受容体欠損マウスの動脈管においては EP4 受容体以外のプロスタノイド受容体が補償的に機能しているとは考えにくい. さらに、ラット胎仔の動脈管はインドメタシンにより収縮を起こすこと¹⁰⁾から、弛緩に参与する内在性のプロスタノイド

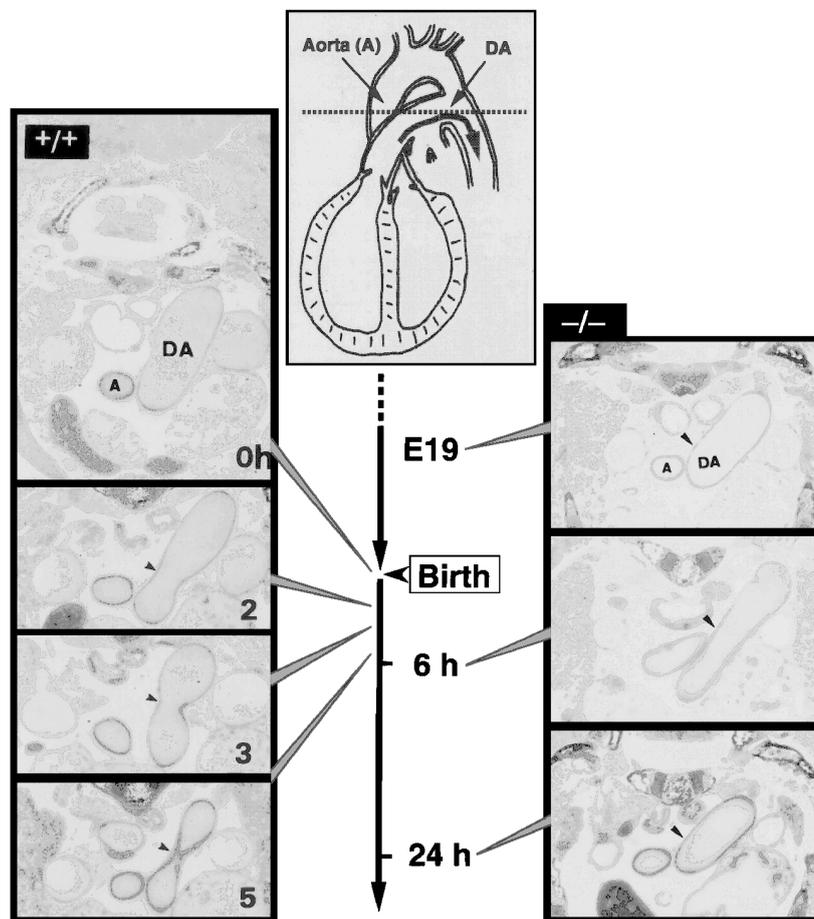


Fig. 6. Morphological Changes of Ductus Arteriosus after Birth of Wild Type Mice (Left) and EP4 (-/-) Mice (Right)
Middle: the model of fetal circulation. Ductus arteriosus are shown by arrowhead. A: aorta, DA: ductus arteriosus.

の減少が動脈管閉鎖反応に関与すると考えられている。そこで、EP4 ホモ変異体はインドメタシンに対する感受性がどの程度変化しているかについて検討した。妊娠最終日の母胎に5 mg/kg のインドメタシンを腹腔内に投与し4時間後に帝王切開して仔を取り出し動脈管を観察したところ、野生型では動脈管壁が肥厚し動脈管の収縮が観察されたのに対し、EP4 ホモ変異体では動脈管の肥厚と収縮は認められなかった (Fig. 9)。すなわち、EP4 受容体欠損マウスではプロスタノイドが減少しても動脈管は弛緩し続けることを示しており、この実験結果も、プロスタノイド以外の因子が動脈管の持続的な弛緩に関与するとする著者の仮説の妥当性を支持する。

3. 考察

3-1. 動脈管開存症と新生児死亡 4種類のPGE受容体サブタイプについて、それぞれの受容体サブタイプを欠損するマウスを作製したところ、EP4受容体欠損マウスは出生後すみやかに死亡に至るという重篤な障害を引き起こすことを見出した。死因として、動脈管の異常を推察した。著者の研究と前後して、NguyenらはEP4受容体欠損マウ

スを作製し、同様の表現型を示すことを報告した。¹¹⁾異なる実験条件により作製されたEP4受容体欠損マウスが、同じように動脈管の異常という表現型を示したことは、この表現型が欠損マウスを作製する上でのstrategyに依存するものではなく、EP4受容体そのものの欠損によるものであることを強く示唆する。動脈管は胎児期において肺動脈と大動脈をバイパスする血管である (Fig. 10)。胎生期においては、酸素は母胎から胎盤を経由して送られてくるため肺は機能する必要がなく、肺胞は肺胞液で満たされている。そのため、肺血管抵抗の値は高く、右心室から送り出されてきた血液は肺を通過しにくい。胎児の肺血管抵抗は体循環抵抗よりも高いために右心室からの血液の大部分は肺を通過せず動脈管を通り直接全身へ流れ込む (右→左シャント)。生後呼吸を開始することにより肺胞に空気が送り込まれ肺血管抵抗は急激に低下する。それに伴い右心室から送り込まれる血液は肺へ流れ込むようになる。血液中の酸素分圧が上昇するのに伴い動脈管は収縮し、体循環と肺循環が分離される。以上のように動脈管は胎児期においては太く開いていることで胎児

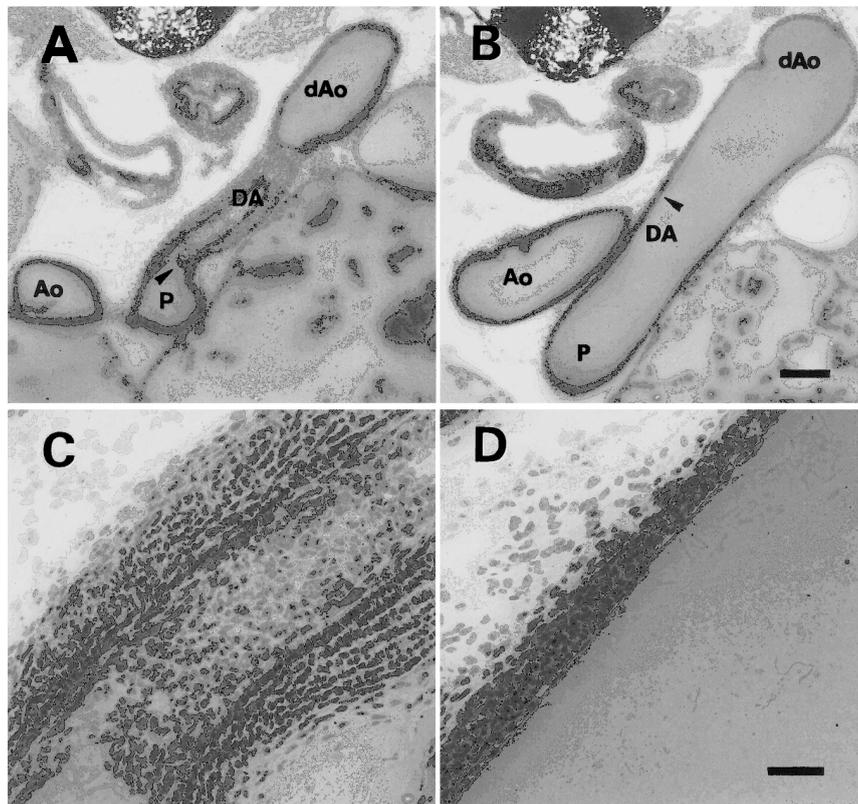


Fig. 7. Patency of the Ductus Arteriosus in EP4 (-/-) Neonates

Thoracic sections of a wild type (A, C) and a homozygous (B, D) neonate sacrificed at 6 h after birth are shown. Bottom panels are magnifications of the arrowhead on each top panel. In the wild type, the ductus arteriosus is completely closed and its wall is thickened. On the other hand, in the homozygous neonate, the ductus is open and its wall is thin. Ao: aorta, dAo: descending aorta, P: pulmonary artery, DA: ductus arteriosus. Bar: 200 μ m (B) and 25 μ m (D).

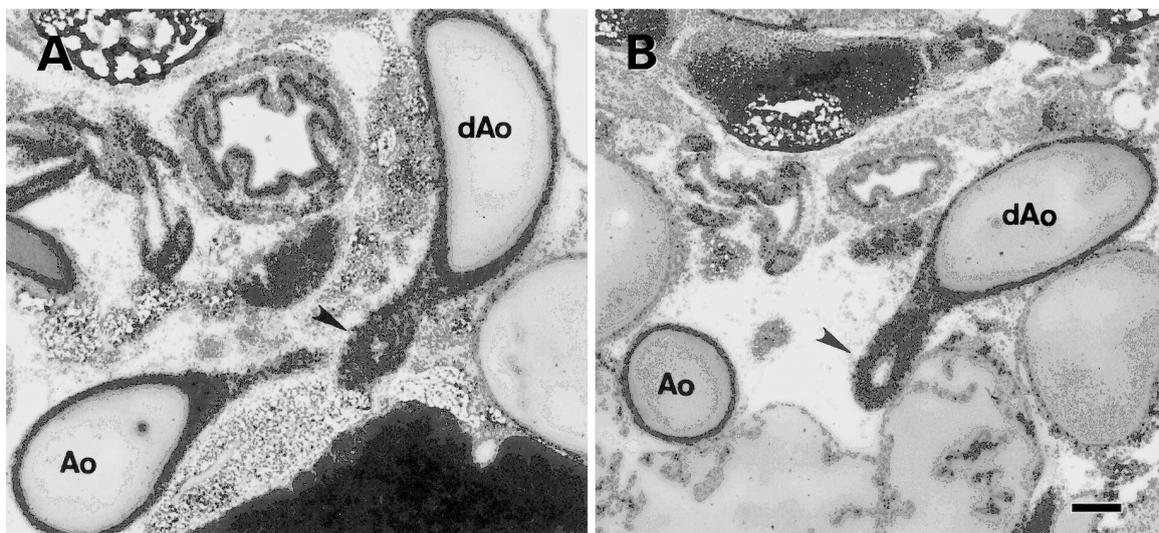


Fig. 8. The Ductus Arteriosus in the Survived EP4 (-/-) Neonate

Thoracic sections of a wild type (A) and a survived homozygous (B) neonate sacrificed at 3 days after birth are shown. Eight surviving homozygous mice at various ages were examined, and representatives are shown. The ductus arteriosus (arrowhead) in the survived homozygous animals are almost closed. Ao: aorta, dAo: descending aorta. Bar: 200 μ m.

型循環の維持を行い、また生後は速やかに肺呼吸型の循環に対応するために閉鎖する。すなわち動脈管は他の大血管系とは異なり出生とそれに伴う循環系の変化に劇的に対応する機能を有している。EP4受容体欠損マウスは出生後も動脈管閉鎖を起こさないことが判明した。出生後も動脈管が開いている場合、体循環抵抗値が肺循環抵抗値よりも高いため、胎児期とは逆に左心室から送り出されてきた血液が動脈管を通り肺へ流入する(左→右シャント)。血液は肺から再び左心房・左心室と血液が戻ってくるため、肺・左心房・左心室に高い負荷を与える。肺においては肺血流の増加が肺の換気スペースを減少させるため呼吸状態が悪化する。左心室においては左室不全が起こり、肺うっ血、肺浮腫を起こし、呼吸状態を更に悪化させる。また、全身に流れる血液量が減少するため、末梢においては循環不全が引き

Table 3. Survival Ratio of EP4-Deficient Mice Having (129/Ola) × (C57BL/6) Genetic Background

	Parental genotype		Survival ratio*
	♂	♀	
F2	(+/−) × (+/−)		2.8%
F3	(−/−) × (+/−)		4.0%
F4	(−/−) × (−/−)		4.6%
F5	(−/−) × (−/−)		29.6%
F6	(−/−) × (−/−)		34.5%

* Compared with +/+ littermate (F2), +/- littermate (F3 & F4) and offspring of (+/+) × (+/+) mate (F5 & F6).

起こされる。このような所見(肺うっ血、肺動脈・左心室の拡張、末梢循環不全)は実際にEP4ホモ変異体で観察されており、EP4受容体欠損マウスは出生後の動脈管の閉鎖不全により、肺のうっ血を伴う左心室不全により死亡したものと考えられる。

3-2. 動脈管の弛緩に関わるプロスタノイドの役割 従来より妊娠後期の母体にインドメタシンなどのPG合成阻害剤を投与した場合、胎児の動脈管収縮が起こり、その結果、胎児の肺に高負荷がかかることで出生後肺高血圧症を引き起こすことが知られていた。^{12,13)} これらの症例を受けてラットなどを

Table 4. The Expression of Prostanoid Receptors and Cyclooxygenases in Embryonic Ductus Arteriosus and Aorta

	Relative grain densities in <i>in situ</i> hybridization	
	Ductus arteriosus	Aorta
EP1	++	++
EP2	−	−
EP3	+	+
EP4	###	+
IP	−	−
TP	++	++
FP	−	−
DP	+	+
COX-1	++	++
COX-2	−	−

Relative grain densities: ###: very high, ++: moderate, +: low, −: background level.

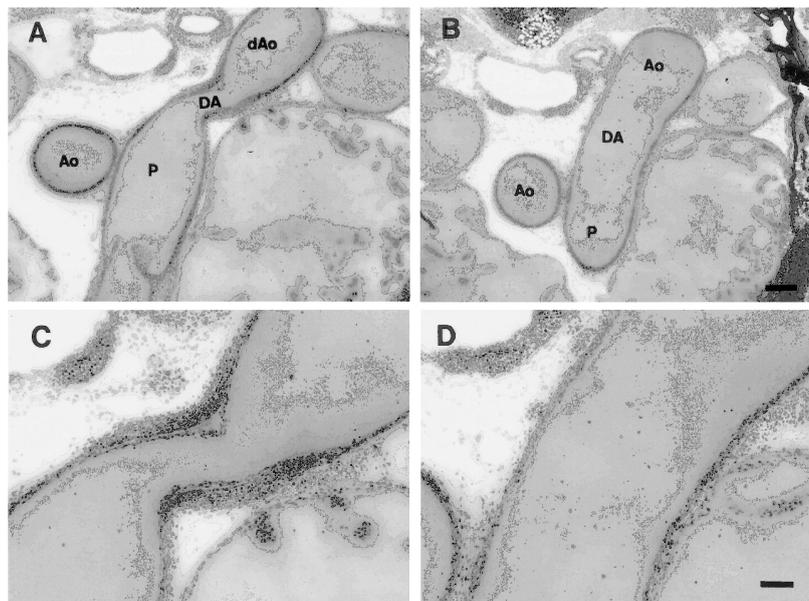


Fig. 9. Effect of Indomethacin on the Fetal Ductus Arteriosus

The ductus arteriosus of a wild type (A, C) and a EP4 (−/−) (B, D) fetus are shown after four hours exposure to indomethacin. Bottom panels are magnified on upper panels. Indomethacin (5 mg/kg) was administered to E19.0 pregnant EP4 (+/−) mice intraperitoneally. The ductus arteriosus of the EP4 (−/−) embryo remains open, while constriction of the vessel has occurred in the wild type littermate.

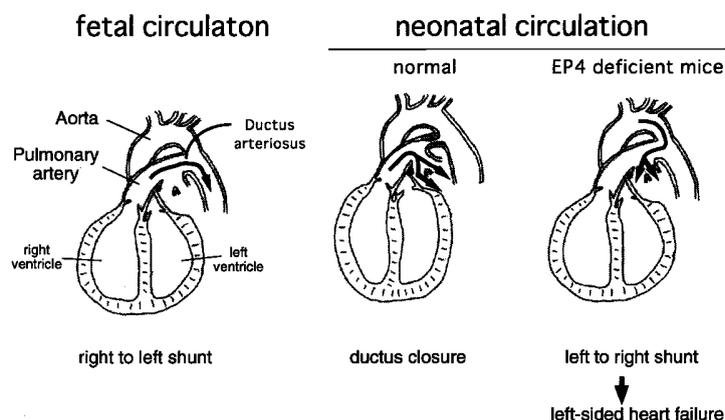


Fig. 10. Model of Fetal and Neonatal Circulations

用いて動脈管に対する *in vivo* のインドメタシンの作用が解析されている。¹⁰⁾ ラットにおいてインドメタシンによる収縮は胎生後期の動脈管で起こり出生直前に最も強い収縮を示す。このことは胎児の血中に存在するプロスタノイドが動脈管の弛緩を持続的に引き起こしており、出産直前にはその作用が最大になることを示唆している。また、*in vitro* ではウサギ動脈管を用いた PGE_2 に対する薬理学検討が行われており、高酸素下で収縮させた動脈管を PGE_2 が濃度依存的に弛緩させる働きを持つことが示されている。⁹⁾ PGE 受容体サブタイプの内、血管弛緩に働くものは cAMP 上昇系に共役する EP2, EP4 受容体であり、動脈管の弛緩に関わっているのはこれらの受容体であることが予想される。筆者は動脈管における PGE 受容体の発現を解析し、動脈管には EP4 受容体が動脈管特異的に大量に発現していることを見出した。一方 EP2 受容体は動脈管にはほとんど発現が認められなかった。このことは PGE_2 に対する動脈管の弛緩作用は EP4 受容体を介している可能性を示唆するものである。また、EP4 受容体欠損マウスの動脈管はインドメタシンに対し収縮を示さなかったことも、EP4 受容体が内在性の PGE_2 による弛緩作用に働いていることを支持するものと言える。胎児において血中のプロスタノイド濃度が新生児と比較して高いことが知られているが、¹⁴⁾ この理由として、胎盤でプロスタノイド合成能が高いこと、¹⁵⁾ また酸素呼吸していないため肺で働く代謝酵素の活性が弱いこと¹⁶⁾ が考えられる。

3-3. EP4 受容体欠損マウスの動脈管の性質
 EP4 受容体が動脈管の弛緩に働いているのであれば、EP4 受容体欠損マウスの動脈管においてまず予想される表現型として胎児期の動脈管の収縮が考えられる。しかしながら、実際に EP4 受容体欠損マウスで現れた動脈管の異常は生後における動脈管の閉鎖不全であった。このことは EP4 受容体を欠損した動脈管は単に弛緩作用の欠失にとどまらない

性質の変化を起こしていることを示している。すなわち EP4 受容体欠損マウスの動脈管の性質として次の 2 点が想定される：

- 1) EP4 受容体がないのにも関わらず、胎児期の拡張を維持している。
(拡張作用に関わる他の経路が存在)
- 2) 生後に血中の酸素濃度が上昇しているにも関わらず、動脈管の閉鎖が認められない。
(収縮作用に関わる経路の減弱)

ところで、EP4 受容体以外のプロスタノイド受容体も動脈管の収縮・拡張に関与していることが薬理実験から予想されている。¹⁷⁾ すなわち、EP4 受容体と同様 DP 受容体は弛緩に関与し、また EP3 受容体、TP 受容体は動脈管の収縮に関与している可能性が示唆されている。筆者は EP4 欠損体の動脈管においてプロスタノイド受容体の発現が変化することで動脈管の拡張や収縮能が変化している可能性を考え、動脈管における各受容体の発現を野生型と欠損体と比較した。しかしながら、両者に発現の違いは観察されなかった。したがって、EP4 欠損マウスの動脈管の変化はプロスタノイド受容体以外の働きによるものと考えられる。

現在のところ、EP4 受容体欠損マウスの動脈管がどのような性質に変化しているかについての詳細は分かっておらず、今後の課題である。プロスタノイド以外に動脈管の拡張・収縮を調節している因子には、拡張因子としては NO、収縮因子として血中酸素分圧の上昇、エンドセリンなどが知られている。¹⁸⁻²⁰⁾ この内で血中酸素分圧の上昇による収縮は、大動脈では見られないもので動脈管に特異的な機構が存在すると考えられる。現在のところ、酸素感受性の収縮のメカニズムについての詳細は分かっていないが、4-aminopyridine 感受性の K^+ channel の関与の可能性²¹⁾ が示唆されており、EP4 受容体欠損マウスの動脈管がこれらの因子に対しどのような反応性を持つかは検討されるべき興味深い課題である。

3-4. 動脈管閉鎖不全との関連 臨床において新生児期での動脈管閉鎖不全は動脈管閉鎖不全と呼ばれ、未熟児では10%以上の頻度で起こる²²⁾。原因としては、血中のプロスタグランジン量が高いこと、酸素に対する反応性が低いことなどが挙げられており、治療法としてはインドメタシン投与が用いられている。しかし、インドメタシンの副作用として腎不全・出血・大腸炎などが存在し、外科的処置を併用することも多い。今回の検討よりPGE₂による動脈管弛緩作用はEP4受容体が介していると考えられ、より動脈管に選択的な薬物として、EP4アンタゴニストの投与が考えられる。また、肺動脈閉鎖症などの先天性心疾患児では、動脈管が開いていることが生存に必要であり、手術前にPGE₁を投与することで動脈管を開かせているが、このような場合もEP4アンタゴニストを投与することでより副作用が少なくなる可能性が考えられる。しかしながら今回のEP4受容体欠損マウスの解析からもEP4受容体そのものに異常が存在する場合は動脈管閉鎖症を引き起こすことが判明しており、この場合はインドメタシンやEP4アンタゴニスト以外の治療が必要になると考えられる。最近、COX-1、COX-2の両者を欠損したマウスでの表現型が報告され、²³⁾EP4欠損マウスと同様に生後24時間以内に死亡し、動脈管が閉鎖していないことが判明し、産生系からも動脈管におけるプロスタノイドの重要性が示された。また、COX-1、COX-2をそれぞれ欠損させたマウスではこのような表現型が表れないことから、²⁴⁻²⁶⁾動脈管に働くPGE₂はCOX-1、COX-2両者から産生されるものと考えられる。

4. 結語

筆者はPGE受容体EP4サブタイプ欠損マウスの作製とその表現型に関する解析を行い、これらマウスの約95%が出生後数日以内の新生児期に死亡することを見出し、その死亡原因は、胎児循環系である動脈管の閉鎖不全による血液循環の異常が引き起こす心不全にあることを示唆した。また、出生直前の胎児動脈管にはEP4受容体mRNAが大量に発現していることを見出し、PGE₂はEP4受容体を介して動脈管の収縮・弛緩反応を制御している可能性を示唆した。EP4受容体は動脈管のみならず、胸腺・小腸・腎臓など様々な組織にその発現が認められ、今後生存したEP4受容体欠損マウスでの解析から更に多くの表現型が見いだされる可能性がある。また他のPGE受容体サブタイプの欠損マウスと比較して検討を行うことにより生体内におけるPGE₂の作用が受容体サブタイプ毎のレベルで解明されると期待される。

謝辞 本研究は京都大学大学院薬学研究科生体情報制御学教室において行われたものであり、終始有益な御助言並びに御指導を賜りました京都大学薬学

研究科教授 市川 厚先生に心から御礼申し上げます。また本研究の全般にわたり御指導いただいた京都大学医学研究科教授 成宮 周先生、同薬学研究科助教授 杉本幸彦先生、同助手 田中智之先生、旭川医科大学教授 牛首文隆先生、小野薬品研究所阿瀬 善也博士、東京医科学研究所 吉田進昭教授また教室員の方々に深く感謝いたします。なお本研究の一部は文部省科学研究費補助金奨励研究によって行われたものであり併せて感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Moncada S., Flower R. J., Vane J. R. "Prostaglandins, prostacyclin, thromboxane A₂, and leukotriens. in: The Pharmacological Basis of Therapeutics," ed. by Gilman A. G., Goodman L. S., Rall T. W., Murad F., 7th Ed., Macmillan Publishing Co., New York, 1985, pp. 660-673.
- 2) Coleman R. A., Kennedy I., Humphrey P. P. A., Bunce K., Lumley P. "Prostanoids and their receptors. in: Comprehensive Medicinal Chemistry Vol. 3," ed. by Hansch C., Sammes P. G., Taylor J. B., Emmett J. C., Pergaman Co., Oxford, 1990, pp. 643-714.
- 3) Coleman R. A., Grix S. P., Head S. A., Louttit J. B., Mallett A., Sheldrick R. L., *Prostaglandins*, **47**, 151-168 (1994).
- 4) Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F., *Pharmacol. Rev.*, **79**, 1193-1226 (1999).
- 5) Segi E., Sugimoto Y., Yamasaki A., Aze Y., Oida H., Nishimura T., Murata T., Matsuoka T., Ushikubi F., Hirose M., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 7-12 (1998).
- 6) Ushikubi F., Segi E., Sugimoto Y., Murata T., Matsuoka T., Kobayashi T., Hizaki H., Tsuboi K., Katsuyama M., Ichikawa A., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S., *Nature*, **395**, 281-284 (1998).
- 7) Hizaki H., Segi E., Sugimoto Y., Hirose M., Saji T., Ushikubi F., Matsuoka T., Noda Y., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S., Ichikawa A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 10501-10506 (1999).
- 8) Heymann M. A., Rudolph A. M., *Physiol. Rev.*, **55**, 62-78 (1975).
- 9) Smith G. C., Coleman R. A., McGrath J. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 390-396 (1994).
- 10) Momma K., Takao A., *Pediatr. Res.*, **22**, 567-572 (1987).
- 11) Nguyen M., Camenisch T., Snouwaert J. N.,

- Hicks E., Coffman T. M., Anderson P. A., Malouf N. N., Koller B. H., *Nature*, **390**, 78–81 (1997).
- 12) Levin D. L., *Semin. Perinatol.*, **4**, 35–44 (1980).
- 13) Velvis H., Moore P., Heymann M. A., *Pediatr. Res.*, **30**, 62–68 (1991).
- 14) Challis J. R., Dilley S. R., Robinson J. S., Thorburn G. D., *Prostaglandins*, **11**, 1041–1052 (1976).
- 15) Gibb W., Matthews S. G., Challis J. R., *Biol. Reprod.*, **54**, 654–659 (1996).
- 16) Clyman R. I., Mauray F., Heymann M. A., Roman C., *Prostaglandins*, **21**, 505–513 (1981).
- 17) Smith G. C., McGrath J. C., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **25**, 113–118 (1995).
- 18) Coceani F., Kelsey L., Seidlitz E., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**, 82–88 (1994).
- 19) Coceani F., Kelsey L., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**, 218–221 (1991).
- 20) Momma K., Toyono M., *Pediatr. Res.*, **46**, 311–315 (1999).
- 21) Tristani-Firouzi M., Reeve H. L., Tolarova S., Weir E. K., Archer S. L., *J. Clin. Invest.*, **98**, 1959–1965 (1996).
- 22) Gersony W. M., *Pediatr. Clin. North. Am.*, **33**, 545–560 (1986).
- 23) Resse J., Paria B. C., Brown N., Zhao X., Morrrow J. D., Dey S. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 9759–9764 (2000).
- 24) Langenbach R., Morham S. G., Tiano H. F., Loftin C. D., Ghanayem B. I., Chulada P. C., Mahler J. F., Lee C. A., Goulding E. H., Kluckman K. D., Kim H.S., Smithies O., *Cell*, **83**, 483–492 (1995).
- 25) Dinchuk J. E., Car B. D., Focht R. J., Johnston J. J., Jaffee B. D., Covington M. B., Contel N. R., Eng V. M., Collins R. J., Czerniak P. M., Gorry S. A., Trzaskos J. M., *Nature*, **378**, 406–409 (1995).
- 26) Morham S. G., Langenbach R., Loftin C. D., Tiano H. F., Vouloumanos N., Jennette J. C., Mahler J. F., Kluckman K. D., Ledford A., Lee C. A., Smithies O., *Cell*, **83**, 473–482 (1995).