

複数のプロスタグランジン E₂ 受容体サブタイプを介する相乗的な cAMP 産生機構

波多江 典之

Cooperation of Two Subtypes of PGE₂ Receptor, Gi Coupled EP3 and Gs Coupled EP2 or EP4 Subtype

Noriyuki HATAE

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

(Received June 2, 2003)

Four prostaglandin E (EP) receptor subtypes have been identified and cloned, designated as EP1, EP2, EP3 and EP4. These EP receptors are members of the G-protein coupled receptor family. EP3 receptor signals are primarily involved in inhibition of adenylyl cyclase via Gi activation, while EP2 and EP4 receptor signals cause a stimulation of adenylyl cyclase via Gs activation. Immune cells, such as mast cells, express multiple EP subtypes on their cell membranes, but few studies have been conducted to understand exactly what signals the main flow for the multiple subtypes expressing immune cells. We previously demonstrated that activation of Gi-coupled EP3 receptor exhibited a cooperative effect on cAMP synthesis induced by Gs-coupled EP2 receptor in COS-7 cells. Here we report that a selective EP4 agonist-induced adenylyl cyclase activity was augmented by simultaneous addition of a selective EP3 agonist in mastocytoma P-815 cells, which express mRNAs for both EP3 and EP4 subtypes. The augmentation in cAMP synthesis was found to be pertussis toxin-sensitive. P-815 cells are demonstrated to bind to Pronectin-F, a proteolytic fragment of fibronectin, in adhesion protein of the extracellular matrix, by addition of PGE₂, which is mediated by PKA. The binding of P-815 cells to Pronectin-F mediated by EP4 receptor was augmented by the EP3 receptor. These findings indicate that two subtypes of PGE₂ receptors, EP3 and EP4, cooperatively activate the cAMP-mediated adhesion event through induction of fibronectin ligand elicited by PGE₂ in P-815 cells. Furthermore, the PGE₂-induced adhesion response may contribute to the mast cell recruitment function on extracellular matrix during inflammation.

Key words—PGE₂ receptor; EP3 subtype; adenylyl cyclase; Gi protein; fibronectin

1. はじめに

プロスタグランジン (PG)E₂ はシクロオキシゲナーゼと PGE 合成酵素の協調作用により、膜リン脂質に由来するアラキドン酸から生成する生理活性脂質である。PGE₂ は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オータコイドの一種である。PGE₂ 受容体は、選択的なアゴニストやアンタゴニストを用いた薬理学的研究及び PGE 受容体サブタイプの遺伝子クローニングの結果から、4 種類のサブタイプから構成されており、それらは EP1, EP2, EP3, EP4 と名

称されている。発現細胞系を用いた解析により、EP1 は未同定の G 蛋白と共役し細胞内 Ca²⁺ レベルの上昇、EP2 と EP4 は Gs 蛋白質と共役して細胞内 cAMP レベルの上昇、EP3 は Gi 蛋白質と共役して細胞内 cAMP レベルの減少、それぞれを惹起することが明らかにされている。¹⁻³⁾ しかしながら、これら単一サブタイプ発現細胞を用いた解析だけでは、必ずしも生体内における細胞の受容体—情報伝達系の実際の様子を反映しているかは不明である。例えば、EP2 あるいは EP4 の選択的アゴニストによる cAMP レベルの上昇は、PGE₂ による作用よりもはるかに弱いことが知られている。これは、同一細胞に複数の PGE₂ 受容体サブタイプが発現しているため、サブタイプ受容体間で何らかの相互作用が起きているためと想定されているが、複数の PGE₂ 受容体を介した情報伝達経路の詳細な解析

京都大学大学院薬学研究科生命薬科学専攻生体情報制御学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

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

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

はこれまでなされていない。

肥満細胞を始めとする多くの血球系細胞は、同一細胞内に複数の EP サブタイプを発現しているため、⁴⁾ 単一の EP サブタイプの解析から得られた知見を基に細胞内情報伝達を解析するだけでは十分でなく、サブタイプ受容体間の相互作用の解明が必要である。そこで本稿において、複数の PGE₂ 受容体を介する細胞内情報伝達系の相互作用に関して、癌化肥満細胞における EP4 と EP3 サブタイプ受容体の協調作用による細胞内 cAMP 産生の調節機構とそれによるマトリックスへの細胞接着についての研究成果を紹介する。

2. EP3 による発現細胞系での EP2 による cAMP 産生の増強効果

PGE₂ 受容体として、Gs 共役型 EP2 と Gi 共役型 EP3 とを共発現させた際の細胞内 cAMP 産生系の相関性について検討した。既に CHO 発現細胞系を用いた解析により、EP3 は Gi 蛋白質の活性化を介して cAMP 産生を抑制することが知られているが、⁵⁾ EP2 と EP3 を共発現させた COS-7 細胞系を用いた際、EP3 は EP2 による cAMP 産生を抑制するのではなく、逆に EP2 による cAMP 産生を増強した (Fig. 1)。⁶⁾ また、Gs 共役受容体として EP2 の代わりに EP4 を用いた際も同様に、EP3 は EP4 による cAMP 産生を増強したため、COS-7 発現細胞系において、EP3 は Gs 共役型 EP2 若しくは EP4 の cAMP 産生作用に対して、増強的に作用することが認められた。近年、COS-7 発現細胞系において、 α_2 アドレナリン受容体や B₂ ブラジキニン受容体といった Gi 蛋白質共役型受容体が、Gs の活性化に伴う cAMP 産生を増強することが報告された。^{7,8)} また、Gi 共役型受容体として知られるオピオイド受容体においては、cAMP 産生における増強活性が細胞内情報伝達レベルでの脱感作反応の 1 つとして考えられている。⁹⁾ これら Gi 共役型受容体による cAMP 産生の増強機構として、Gi 蛋白質の活性化に伴い遊離される $\beta\gamma$ サブユニットが、II 型アデニル酸シクラーゼファミリーを活性化するためと考えられている。⁷⁾ しかし、EP3 による cAMP 産生の増強は、Gi 蛋白質の阻害剤である百日咳毒素 (PT) に非感受性であったこと、及び $\beta\gamma$ サブユニットのスカーベンジャーである β ARK1 の PH ドメインによっても抑制されなかったことより、従来の

COS-7 細胞で報告されている情報伝達経路とは異なり、Gi 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニット非依存的であることが示唆された。アデニル酸シクラーゼの制御因子として、G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットの他に、Ca²⁺/カルモジュリンが報告されている。¹⁰⁾ そこで、EP3 による cAMP 産生の増強が、細胞内 Ca²⁺ の捕捉剤である BAPTA/AM 処理 (Fig. 1A)、及びカルモジュリン阻害剤である W-7 処理 (Fig. 1B) により抑制されるかについて検討したところ、両阻害剤により本増強活性は阻害されたため、EP3 は本細胞中において Ca²⁺/カルモジュリン経路依存的に cAMP 産生を増強することが示唆された。G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニット非依存的、Ca²⁺/カルモジュリン依存的に活性が増強されるアデニル酸シクラーゼとして、III 型アデニル酸シクラーゼが報告されており、¹¹⁾ 本 COS-7 細胞中にもこのアイソザイムの発現が検出されたことより、EP3 による cAMP 産生の増強は、III 型のアデニル酸シクラーゼの活性化を介していることが示唆された (Fig. 1C)。

CHO 細胞を用いた解析により、EP3 は Gi 依存的な経路により細胞内 Ca²⁺ を上昇させることが報告されているが、¹²⁾ Gi 非依存的な細胞内 Ca²⁺ の上昇経路については不明である。近年、Audoly らにより、ウサギ EP3 が、HEK293 細胞において、PT 非依存的に cAMP response element (CRE) を介して転写を活性化することが報告された。¹³⁾ EP3 による CRE を介した転写の活性化は、部分的にはあるが、細胞内 Ca²⁺ の上昇に引き続く、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化に依存した経路であった。COS-7 細胞における cAMP 産生の増強、及び HEK293 細胞における CRE を介した転写の活性化において、従来の報告とは異なり、EP3 が Gi 非依存的な経路で細胞内 Ca²⁺ を上昇させることが示唆された。Liu らにより、好中球において、EP3 はネクロシスともアポトーシスとも異なる形態の細胞死を誘導することが報告された。¹⁴⁾ この EP3 による好中球の細胞死は、PKC の阻害剤である H-7 の処理により抑制されたことより、PT 感受性については不明であるが、細胞内 Ca²⁺ の上昇に引き続く PKC の活性化を介する経路であった。EP3 による細胞内 Ca²⁺ の上昇は、これら好中球等で、種々の生理応答を誘導していることが考えられ、COS-7

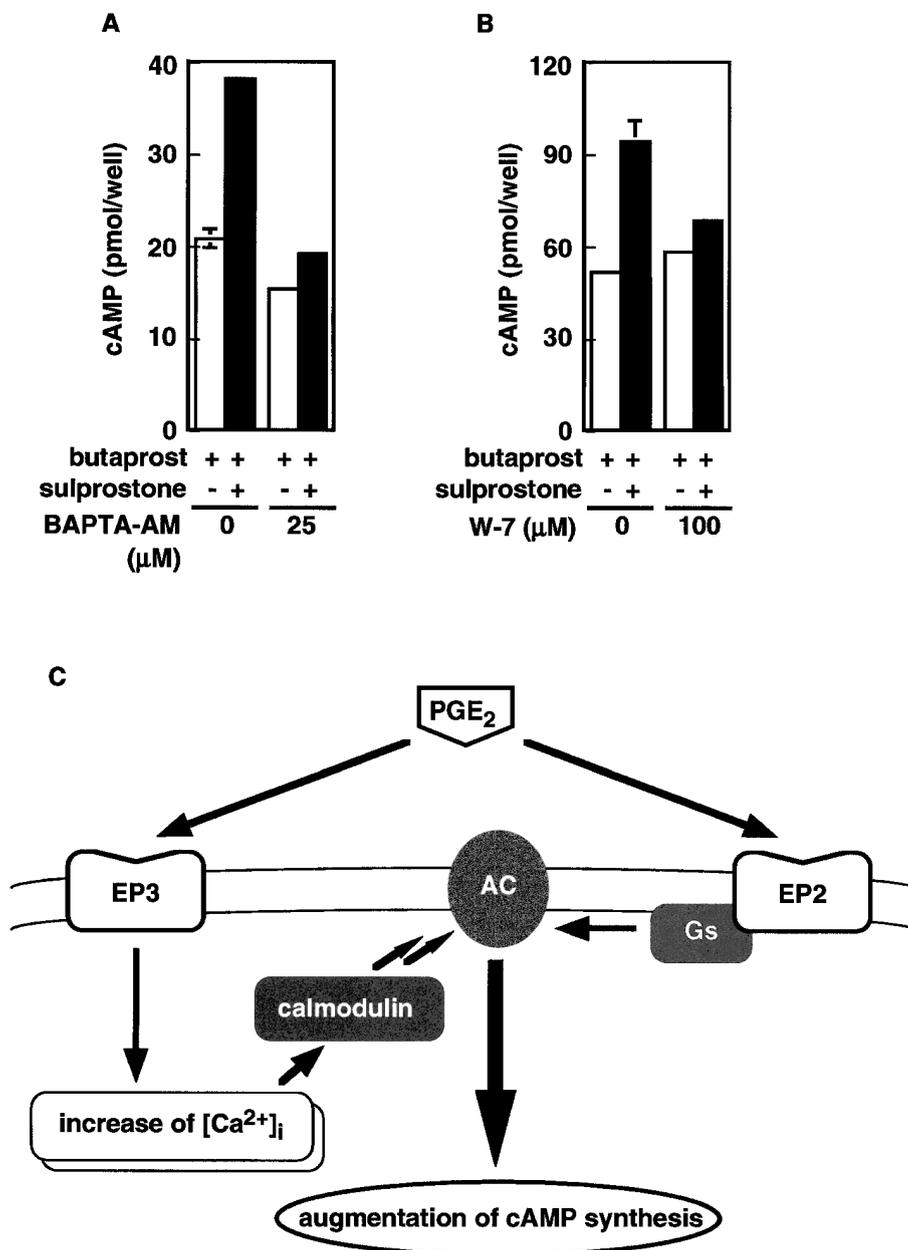


Fig. 1. EP3 Receptor-induced Augmentation of EP2-stimulated cAMP Formation in EP2 and EP3 Receptor-expressing COS-7 Cells

A and B: COS-7 cells were transiently co-transfected with plasmid DNA encoding EP2 and EP3β receptor. After cells were pretreated with the indicated concentration of BAPTA-AM (A) or W-7 (B), they were stimulated with EP2-agonist butaprost in the absence (opened column) or presence (filled column) of EP3-agonist sulprostone, and then the cAMP formation was determined. Values are shown as the means ± S.E. for triplicate experiments. C: schematic illustration of the mechanism of EP3 receptor-induced Ca²⁺-dependent augmentation of cAMP synthesis. The mouse EP3 receptors stimulate an increase in intracellular Ca²⁺ levels in PT-insensitive manner, and promote Gs-activated adenylyl cyclase (AC) through the Ca²⁺-calmodulin pathway.

発現細胞系を用いて得られた Gi 非依存的な細胞内 Ca²⁺ の上昇機構の解明は、EP3 の活性化による種々の生理応答を理解する上で、重要な知見であると考えられる。

マウス EP3 には、スプライシングの違いにより、C 末端鎖の異なる 3 種のアイソフォーム、EP3α, EP3β, EP3γ が存在し、それぞれ Gi 蛋白質の活性

化におけるアゴニスト依存性が異なることが報告されている。^{15,16} また、3 種のアイソフォーム間で異なる C 末端鎖を欠失させた変異体 T-335 は、アゴニストに依存せず、恒常的に Gi 蛋白質を活性化することが報告されている。¹⁷ これら 3 種のアイソフォーム、及び T-335 を用いた研究により、EP3 による G 蛋白質の活性化モデルとして、EP3 のコア

領域による G 蛋白質の活性化を、アイソフォーム間で異なる C 末端鎖が抑制的に作用するモデルが提唱されている。¹⁷⁾ COS-7 発現細胞系における EP3 による cAMP 産生の増強反応は、EP3 として T-335 を用いた際でも、アゴニスト依存的であったことより、本 cAMP 産生増強様式は、Gi 蛋白質の活性化モデルとは異なり、EP3 のコア領域内に活性化部位と抑制部位とがあり、アゴニストが存在したときにのみ、コア領域中の抑制部位の作用が解除され、細胞内 Ca²⁺ の上昇に伴う cAMP 産生の増強活性が発現することが示唆された。

3. 癌化肥満細胞株 P-815 細胞における EP3 による EP4 の cAMP 産生の増強効果

肥満細胞を始めとする多くの血球系細胞は、同一細胞内に複数の EP サブタイプを発現していることが報告されている。⁴⁾ COS-7 発現細胞系を用いた解析により、EP3 は Gs 共役型 EP サブタイプ (EP2 若しくは EP4) との共発現により、cAMP 産生を増強することが明らかとなった (Fig. 2A)。そこで、COS-7 発現細胞系を用いた解析結果と同様に、癌化肥満細胞株 P-815 細胞においても、EP3 が Gs 共役型 EP サブタイプによる cAMP 産生を増強するかについて検討した。P-815 細胞における PG 受容体の発現は、IL-3 依存的骨髄由来培養肥満細胞同様、EP3, EP4, IP のみであった。そこで、EP3, EP4 の各選択的アゴニストを用いて、単独若しくは共刺激した際の、cAMP 産生について解析したところ、COS-7 細胞系同様、EP3 アゴニストの単独刺激では cAMP は産生されず、EP4 アゴニストとの共刺激により、EP3 は EP4 による cAMP 産生作用を増強した。¹⁸⁾ 近年、Southall らの報告により、EP3C と EP4 を発現するラットの感覚神経細胞において、PGE₂ による cAMP の産生には、EP3 と EP4 の両サブタイプが必要であることが示唆された。¹⁹⁾ また、PGE₂ 受容体の他にも、血管平滑筋細胞において、Gq 共役型 V₁ バソプレシン受容体と Gs 共役型 β₂ アドレナリン受容体との間に、cAMP 産生における相乗作用が報告されており、²⁰⁾ 多くの生体内の細胞において、Gs 共役型受容体と Gi 若しくは Gq 共役型受容体間の相乗的な作用による cAMP 産生の増強が起こる可能性が示唆された。また、EP3 との共刺激による cAMP 産生の増強により、EP4 単独刺激時に比べ EC₅₀ 値が亢進され

PGE₂ に対して高感受性にするのではなく、EP4 の機能を増強することが示唆された。さらに、EP3 による cAMP 産生の増強は、EP4 の代わりに IP を用いた際にも認められたことより、Gs 共役型受容体による cAMP 産生に対して、EP3 は相乗的に作用することが示唆された。

P-815 細胞における、EP3 による cAMP 産生の増強機構は、COS-7 発現細胞系の場合とは異なり、Gi 蛋白質の活性化を介した経路であることが明らかとなった。実際、P-815 細胞において、Gi 蛋白質の βγ サブユニットにより活性化される II, IV, VII 型アデニル酸シクラーゼのうち、IV 型のアイソザイムの発現が確認された。また、P-815 細胞には、COS-7 細胞同様、III 型アデニル酸シクラーゼの発現が認められたことより、両細胞間で細胞内情報伝達経路の相違は、それぞれの細胞におけるアデニル酸シクラーゼのアイソザイムの発現の違いに依存するのではないことが考えられた。

4. EP3 と EP4 の相乗作用による癌化肥満細胞株 P-815 細胞の細胞外基質への接着

癌化肥満細胞株 P-815 細胞を PGE₂ で刺激したところ、浮遊性の P-815 細胞はフィブロネクチンへ接着することが明らかとなった。²¹⁾ 肥満細胞は骨髄幹細胞より分化した細胞で、循環血を経て、皮膚などのマトリックスと接着して成熟体へと分化すると考えられている。好塩基球、好中球、好酸球といった骨髄由来の血球系細胞と肥満細胞は、組織への結合能において大きく性質が異なる。現在までに、肥満細胞と接着する細胞外基質として、ラミニン、²²⁾ フィブロネクチン、²³⁾ ビトロネクチン²⁴⁾ がそれぞれ報告されている。これら細胞外基質への肥満細胞の接着は、PKC の活性化や抗原による FcεRI の架橋反応によって誘導され、PKA の活性化によりラミニンとの接着が抑制されることが報告されているが、その詳細については不明である。²⁵⁾ 一方、PGE₂ の肥満細胞への作用については、培養細胞系を用いた実験により、PGE₂ は肥満細胞の分化・増殖において重要な役割を担うことが示唆されている。Hu らにより、PGE₂ がマウス脾臓細胞にある未分化の肥満細胞を、IL-3 存在下で肥満細胞へと成熟させることが報告された。²⁶⁾ また、ヒト臍帯血単核球由来細胞からの肥満細胞の分化において、PGE₂ はマクロファージからの GM-CSF の遊離を抑制す

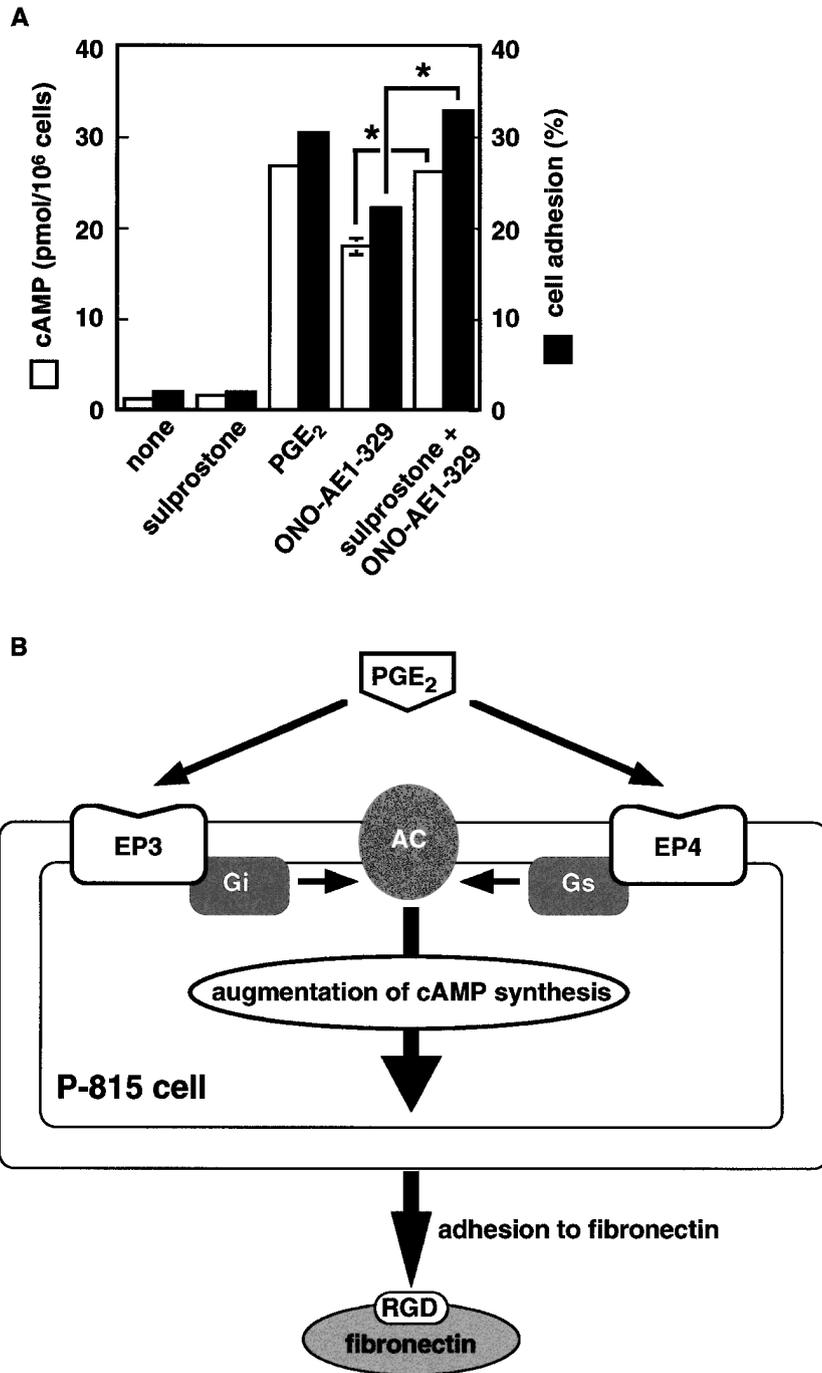


Fig. 2. Induction of Adherent Activity in Mastocytoma P-815 Cells by the Cooperation of Two PGE₂ Receptor Subtypes, EP3 and EP4

A: P-815 cells were stimulated with PGE₂, EP3-agonist sulprostone, EP4-agonist ONO-AE1-329, or both sulprostone and ONO-AE1-329, and then the cAMP formation (opened column) and the percentage of RGD-dependent cell adhesion (filled column) were determined. Values are shown as the means ± S.E. for triplicate experiments. *: *p* < 0.01 versus stimulation with ONO-AE1-329 alone. B: schematic illustration of induction of adherent activity in P-815 cells by the cooperation of two PGE₂ receptor subtypes, EP3 and EP4. The mouse EP3 receptors activate the Gi protein, and promote EP4-activated adenylyl cyclase (AC) in Gi-dependent manner. Thus, EP3 leads to the acceleration of RGD-dependent adhesion mediated by PKA activation.

ることで、肥満細胞への分化を誘導することが報告されている。²⁷⁾ さらに、ケラチノサイトと線維芽細胞との共存培養系において、ケラチノサイトより遊離される IL-1 α 刺激により、線維芽細胞より PGE₂

が産生され、²⁸⁾ 肥満細胞と線維芽細胞との共存培養系において、線維芽細胞より産生される PGE₂ により、肥満細胞の増殖が誘導されることが報告されている。²⁹⁾ これらの報告より、PGE₂ が肥満細胞と線

維芽細胞, 及び線維芽細胞より放出される細胞外マトリックスとの相互作用に重要な役割を担うことが仮定される. PGE₂ 刺激による, 癌化肥満細胞株 P-815 細胞のフィブロネクチンへの接着は, フィブロネクチンの接着活性部位である RGD 配列に特異的であり, 細胞内情報伝達機構の解析の結果, プロテインキナーゼ A (PKA) の阻害剤である H-89 で接着活性が阻害されたことより, PGE₂ 刺激による接着は cAMP 産生の上昇に伴う PKA の活性化を介していることが示唆された. P-815 細胞において, PGE₂ 刺激による cAMP の産生は, EP3 と EP4 の相乗的な作用によることが明らかとされたため, フィブロネクチンへの接着も, 両サブタイプ間の相乗効果によるかについて検討した. EP3 と EP4 の共刺激により cAMP 産生が, EP4 単独刺激の場合の約 1.5 倍であったのに対して, フィブロネクチンへの接着活性も同様に, EP3 と EP4 の共刺激により, EP4 単独刺激の場合の約 1.5 倍となった (Fig. 2A). これらの検討の結果, 癌化肥満細胞株 P-815 細胞において, EP3 は EP4 の cAMP 産生に対し相乗的に作用することで, PKA の活性化を増強し, 結果フィブロネクチンへの接着を増強していることが明らかとなった (Fig. 2B).

5. おわりに

以上, cAMP 産生に対して, 促進系受容体である EP2 又は EP4 と, 抑制系受容体である EP3 との間に起こるであろうクロストークに関する研究に関する知見についてまとめた. 冒頭にも述べたように, 肥満細胞を始めとする血球系細胞では, 同一細胞上に複数の PGE₂ 受容体を発現しており, 細胞内情報伝達系の異なる複数サブタイプが, PGE₂ 刺激に対して, 相乗的に作用し, 肥満細胞の接着活性を増強することを示した. また本知見は, PGE₂ 受容体間のクロストークの解析に限局されるのではなく, 医薬品の作用機構の解析において, 複数の受容体間での相互作用を解析することの重要性を示唆するものと考えられる.

謝辞 本研究の遂行にあたり, 終始懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました京都大学名誉教授, 現武庫川女子大学教授・市川 厚博士並びに京都大学大学院生命科学研究科教授・根岸 学博士に深甚なる謝意を表します. さらに, 終始有益な御指導と御協

力を頂きました京都大学大学院薬学研究科生体情報制御学分野のみなさんに心より感謝いたします.

REFERENCES

- 1) Coleman R. A., Kennedy I., Humphrey P. P. A., Bunce K., Lumley P., "Comprehensive Medicinal Chemistry," Vol. 3, Pergamon Press, Oxford, 1990, pp. 643-714.
- 2) Coleman R. A., Grix S. P., Head S. A., Louttit J. B., Mallett A., Scheldrick R. L., *Prostaglandins*, **47**, 151-168 (1994).
- 3) Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F., *Pharmacol. Rev.*, **79**, 1193-1226 (1999).
- 4) Tilley S. L., Coffman T. M., Koller B. H., *J. Clin. Invest.*, **108**, 12-23 (2001).
- 5) Sugimoto Y., Namba T., Honda A., Hayashi Y., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., *J. Biol. Chem.*, **267**, 6463-6466 (1992).
- 6) Hatae N., Yamaoka K., Sugimoto Y., Negishi M., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 162-168 (2002).
- 7) Federman A. D., Conklin B. R., Schrader K. A., Reed R. R., Bourne H. R., *Nature*, **356**, 159-161 (1992).
- 8) Hanke S., Nurnberg B., Groll D. H., Liebmann C., *Mol. Cell Biol.*, **21**, 8452-8460 (2001).
- 9) Avidor-Reiss T., Nevo I., Levy R., Pfeuffer T., Vogel Z., *J. Biol. Chem.*, **271**, 21309-21315 (1996).
- 10) Tang W. J., Gilman A. G., *Cell*, **70**, 869-872 (1992).
- 11) Tang W. J., Gilman A. G., *Science*, **254**, 1500-1503 (1991).
- 12) Irie A., Segi E., Sugimoto Y., Ichikawa A., Negishi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 303-309 (1994).
- 13) Audoly L. P., Ma L., Feoktistov I., DeFoe S. K., Breyer M. D., Breyer R. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 140-148 (1999).
- 14) Liu J., Akahoshi T., Jiang S., Namai R., Kitasato H., Endo H., Kameya T., Kondo H., *J. Leukoc. Biol.*, **68**, 187-193 (2000).
- 15) Hasegawa H., Negishi M., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 1857-1860 (1996).
- 16) Negishi M., Hasegawa H., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **386**, 165-168 (1996).
- 17) Hizaki H., Hasegawa H., Katoh H., Negishi

- M., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **414**, 323–326 (1997).
- 18) Hatae N., Sugimoto Y., Ichikawa A., *J. Biochem.*, **131**, 781–784 (2002).
- 19) Southall M. D., Vasko M. R., *J. Biol. Chem.*, **276**, 16083–16091 (2001).
- 20) Zhang J., Sato M., Duzic E., Kubalak S. W., Lanier S. W., Webb J. G., *Am. J. Physiol.*, **273**, H971–H980 (1997).
- 21) Hatae N., Kita A., Tanaka S., Sugimoto Y., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.* **278**, 17977–17981 (2003).
- 22) Thompson H. L., Burbelo P. D., Segui-Real B., Yamada Y., Metcalfe D. D., *J. Immunol.*, **143**, 2323–2327 (1989).
- 23) Dastyk J. M., Costa J. J., Thompson H. L., Metcalfe D. D., *Immunology*, **73**, 478–484 (1991).
- 24) Bianchene P. J., Burd P. R., Metcalfe D. D., *J. Immunol.*, **149**, 3665–3671 (1992).
- 25) Thompson H. L., Burbelo P. D., Yamada Y., Kleinman H. K., Metcalfe D. D., *Immunology*, **72**, 144–149 (1991).
- 26) Hu Z. Q., Asano K., Seki H., Shimamura T., *J. Immunol.*, **155**, 2134–2142 (1995).
- 27) Saito H., Ebisawa M., Tachimoto H., Shichijo M., Fukagawa K., Matsumoto K., Iikura Y., Awaji T., Tsujimoto G., Yanagida M., Uzumaki H., Takahashi G., Tsuji K., Nakahata T., *J. Immunol.*, **157**, 343–350 (1996).
- 28) Sato T., Kirimura Y., Mori Y., *J. Invest. Dermatol.*, **109**, 334–339 (1997).
- 29) Kameyoshi Y., Morita E., Tanaka T., Hiragun T., Yamamoto S., *Arch. Dermatol. Res.*, **292**, 240–247 (2000).