

審査の結果の要旨

氏名 坂東 浩二

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、細胞増殖、血小板の凝集、平滑筋の収縮など多彩な作用を持つ脂質性のメディエーターであるが、その作用機構は長い間不明であった。1996年に LPA 受容体として EDG2 (Endothelial differentiation gene 2) が最初に発見され、次いで 1998年に EDG4 が報告された。本研究では、新規リゾリン脂質性メディエーター受容体 EDG7 を同定し、リガンドが LPA であることを明らかとした。さらに、EDG7 と、これまでに同定されていた EDG2、EDG4 との比較検討を行い、EDG7 が不飽和脂肪酸を持つ LPA にのみ反応する非常にユニークな LPA 受容体であることを明らかにしている。

1. 新規 EDG family 受容体遺伝子のクローニングとリガンドの同定

Human Jurkat T cell の cDNA を template とし、degenerate PCR 法によって新規 EDG family 遺伝子の部分配列の増幅を行い、得られた部分配列を基に、5' 並びに 3'-RACE を行い全長をクローニングした。この遺伝子は、既知の LPA 受容体 EDG2、EDG4 にアミノ酸レベルで、それぞれ 53.7%、48.8% と非常に相同性が高く EDG7 と命名した。また、その相同性から LPA 受容体をコードすることが予想されたことから、リガンドの同定を行った。リガンドの同定には、無血清培地で培養でき、さらに LPA 受容体を持たない昆虫細胞 Sf9 を用いた。リガンド同定の指標として、カルシウム蛍光指示薬 fura-2 AM を用い、細胞内カルシウム濃度上昇を測定した。その結果、親株の Sf9 細胞では LPA 刺激による反応は観察されなかったが、EDG7 を発現させた Sf9 細胞では、LPA で刺激した時にのみ一過性の細胞内カルシウム濃度上昇が観察された。その他の試した全てのリゾリン脂質 (LPC、LPS、LPI、LPE) では無効であった。また、³H ラベルされた LPA を用いたリガンド結合実験においても EDG7 を発現させた Sf9 細胞には特異的な結合が見られた。以上の結果から、EDG7 受容体のリガンドが LPA であると結論付けた。

2. EDG7 受容体のリガンド特異性

生体内では、様々な脂肪酸を持つ LPA 分子種が存在することから、3つの受容体の間において LPA の分子種に対し反応性の違いがあるかどうかを検討した。各受容体を発現させた Sf9 細胞を、LPA 刺激したときの細胞内カルシウム濃度上昇を測定する系を用いて解析した結果、EDG2 と EDG4 は飽和、不飽和どちらの脂肪酸を持つ LPA に対しても反応を示したが EDG7 では飽和脂肪酸を持つ LPA にはほとんど反応を示さず、不飽和脂肪酸を持つ LPA にのみ高い反応性を示した。また、不飽和脂肪酸が LPA のグリセロ骨格 sn-2 位に結合している 2-acyl LPA が、脂肪酸が sn-1 位に結合している 1-acyl LPA に比べ約 10 倍ほど反応が良いことが明らかとなった。さらにこの系を用い、LPA 誘導体であり、ある種の細胞に対し高い細胞増殖誘導能を持つことが知られていた、OMPT (1-oleoyl-sn-2-o-methyl-glycero-3-phosphothionate) が、EDG7 に非常に特異性が高く、EDG2 と EDG4 ではほとんど反応しないことから、EDG7 の選択的アゴニストであることが分かった。

3. EDG7 受容体の臓器分布と発現の局在

EDG7 の臓器分布を Northern blot で解析した。Human において、前立腺、卵巣、精巣などの生殖器系で発現が強いことが明らかとなった。さらに、EDG7 特異的モノクローナル抗体を用い組織染色を行ったところ、ヒト前立腺において分泌管を取り巻くように存在している分泌腺細胞に、非常に強い染色が認められた。

4. 精液中の LPA の検出

EDG7 が前立腺の分泌細胞に強く発現していることから、その分泌細胞が分泌する液に LPA が含まれており、autocrine で受容体を刺激しているのではないかと考えた。そこで、前立腺分泌液を含む精液で、各受容体を発現させた Sf9 細胞を刺激したところ、EDG7 だけが活性化され、EDG2 と EDG4 は活性化されなかった。精液の脂質を抽出しその脂質で刺激した場合では3つの受容体全てが活性化された。

5. 前立腺培養細胞株での EDG7 受容体を介し細胞増殖効果の解析

前立腺正常腺細胞 PrEC と前立腺ガン細胞株 LNCaP、TSU-pr1、ALVA-31、PC-3 を OMPT で刺激し増殖効果を解析した。前立腺ガンは、初期の段階では androgen に感受性であり、精巣除去手術などで増殖を抑えることが出来るが、進行すると androgen に非感受性となり、現在、どのような因子がこの段階のガン細胞の増殖に効いているかがほとんど分かっていない。ガン細胞株 LNCaP は、androgen に感受性の初期のガン細胞モデルである。TSU-pr1 と ALVA-31 は進行ガンのモデル。PC-3 は最も進行が進んだモデルとして、今回の実験に用いた。その結果、正常細胞 PrEC と、初期のガン細胞 PrEC では LPA による刺激で増殖は見られなかった。TSU-pr1 と ALVA-31 は、EDG7 の良いリガンドである 18:1-LPA と OMPT の刺激により顕著な増殖を見せたが、PC-3 では LPA に関係なく増殖を見せることが分かった。また、EDG2 と EDG4 の良いリガンドである 16:0-LPA では、全く増殖を示さなかった。この結果から、進行した前立腺ガンのある段階では、EDG7 を介して増殖を示すことが明らかとなった。

以上を要するに、本研究は、新規 LPA 受容体 EDG7 の同定と、その生体内での機能の解析が中心となっている。特に、EDG7 が不飽和脂肪酸を持つ 2-acyl LPA に特異的な受容体であることを明らかにした意義は非常に大きい。これまでに LPA の様々な作用が、脂肪酸の種類により異なっていることが分かっていたが、この現象が受容体のリガンド特異性に起因していることを初めて明らかとしたからである。この発見は、LPA 受容体をターゲットにした創薬における薬のデザインにも有用な情報になると考えられる。また、今回の研究によって EDG7 が前立腺において機能していることも初めて明らかにしている。このことから、前立腺癌や肥大などに対する効果的な治療薬が存在しない病態に対する新たな創薬の可能性を示すものである。以上の知見は、LPA とその受容体の生体内での意義を考える上で非常に重要なものであり、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。