

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (2002) 45(6):909-920.

**【最先端創薬】 医薬品開発のストラテジー 変異マウスを用いた薬物  
適応の発見 プロスタノイド受容体とその遺伝子ロックアウトマウス  
牛首文隆, 成宮周**

## プロスタノイド受容体とその遺伝子ノックアウトマウス

牛首文隆・成宮 周

I-C-2

プロスタグランジとトロンボキサンよりなるプロスタノイドは、アラキドン酸から合成される生理活性物質であり、生体内において多彩な作用を示す。これらの作用は、標的細胞上に存在するおのおののプロスタノイドに特異的な受容体を介して発揮される。しかし、実際に生体内でプロスタノイドが果たす役割やその意義について、十分には解明されていない。この問題を解決するため、おのおののプロスタノイド受容体を欠失するマウスが作出・解析されつつある。本稿では、受容体欠損マウスの解析によって現在までに明らかにされたプロスタノイドの生理的・病態生理的役割について紹介する。

**Key words** 【プロスタノイド】【プロスタグランジン】【トロンボキサン】  
【ノックアウトマウス】

はじめに プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) よりなるプロスタノイドは、炭素数 20 個の不飽和脂肪酸であるアラキドン酸から、シクロオキシゲナーゼ (COX) とおのおののプロスタノイドに特異的な合成酵素によって合成される生理活性物質である (図 1)。アラキドン酸は、種々の生理的・病理的な刺激に応じて活性化されたホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の作用によって膜リン脂質より遊離し、プロスタノイドが合成される。プロスタノイドはその合成直後に細胞外に放出される。プロスタノイドのうち PGI<sub>2</sub> と TXA<sub>2</sub> は化学的に不安定であり、生理的条件下では 30 秒から数分の半減期で不活性な物質に変化する。それ以外の PG は化学的には比較的安定であるが、肺血管内皮に存在する PG 特異的トランスポーターにより細胞内に取り込まれて代謝を受け不活性化される。プロスタノイドの示すこ

の性質から、プロスタノイドは合成された局所で作用しそのホメオスタシスの維持や種々の病態形成に関与するオータコイドと考えられる。

プロスタノイドは、生体内の種々の臓器や組織において、非常に多彩な作用を示す。もっとも代表的なものは、血管、気管、消化管、子宮など種々のタイプの平滑筋の収縮や弛緩作用である。また、プロスタノイドは神経伝達物質の遊離を刺激あるいは抑制したり、知覚神経の侵害刺激に対する感受性を亢進して末梢神経系の活動を調整する。また、発熱や睡眠・覚醒、視床下部における神経内分泌系への影響など、中枢神経系での作用も知られている。さらに、腸管の蠕動運動や消化液分泌、胃粘膜保護や胃酸の分泌抑制、腎臓におけるイオン・水輸送の調整作用を示す。また、プロスタノイドは血小板の機能を調節し、血管のホメオスタ

Fumitaka Ushikubi, 旭川医科大学薬理学講座 (〒078-8510 旭川市緑が丘東 2-1-1-1) [Department of Pharmacology, Asahikawa Medical College, Midorigaoka-higashi, Asahikawa 078-8510, Japan] E-mail: ushikubi@asahikawa-med.ac.jp  
Shuh Narumiya, 京都大学医学研究科神経細胞薬理学 (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町) [Department of Pharmacology, Kyoto University, Faculty of Medicine, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan]  
*Analysis of the mice lacking the prostanoid receptor*

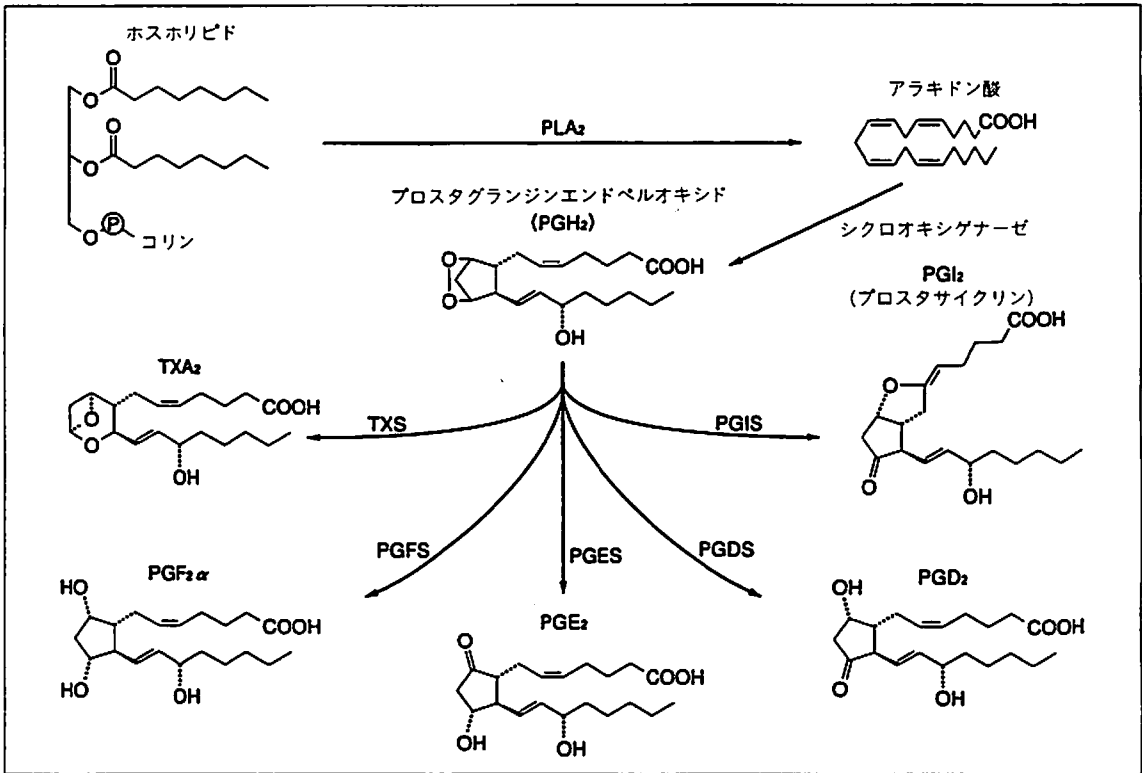


図1 プロスタノイドの生合成

細胞が刺激を受けると、ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)が活性化され、膜リン脂質よりアラキドン酸が遊離される。ついで、シクロオキシゲナーゼによってPGG<sub>2</sub>を経てPGH<sub>2</sub>が合成される。最終的には、各細胞に存在する各々のプロスタノイドに特異的な合成酵素によって、生理的に重要なPGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>の5種類のプロスタノイドが合成される。

シスの維持や止血にも重要な役割を果たす。また、プロスタノイドは細胞のアポトーシス、分化・増殖あるいは発癌などにも関与する。このように、プロスタノイドの作用はすべての臓器に及ぶといっても過言ではない。

これらの作用は標的細胞上に存在するおのおののプロスタノイドに特異的な受容体を介して発揮される。これらには、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>に特異的な受容体として、それぞれDP、EP、FP、IP、TPが知られている。さらにEPにはEP1、EP2、EP3、EP4の4種類のサブタイプが存在する<sup>1-3)</sup>。しかし、最近になってTPがヒト血小板より精製され<sup>4)</sup>、そのcDNAがクローン化されるまで<sup>5)</sup>、プロスタノイド受容体の本態はまったく不明であった。これらの研究の結果、TPは7回膜貫通構造をもち、G蛋白質と連関するロドプシン型の受容体であることが明らかとなった。また、ホモロジッククローニングによって、マウスの8種

類のプロスタノイド受容体 (DP, EP1, EP2, EP3, EP4, FP, IP, TP)の1次構造が解明された<sup>3)</sup>。ついで、種々の培養細胞系を用いて発現された均一な受容体標本に対して、そのリガンド結合の特異性や情報伝達機構が詳細に解析された。また、プロスタノイド受容体 mRNA の発現分布がノーザンプロット解析や *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて明らかにされつつある。

しかし、実際に生体内でプロスタノイドが果たす役割やその意義について、十分には解明されていない。また、発熱などのよく知られたPGE<sub>2</sub>の作用にどの受容体サブタイプが関与するかについても必ずしも明らかではなかった。これらの問題を解決するため、最近になっておのおののプロスタノイド受容体を欠失するマウスが遺伝子ターゲティング法により作出され、種々の生理的・病態生理的な状況においてプロスタノイドが果たす役割が解析・評価されつつある。本稿では、ま

ず、プロスタノイド受容体について概説し、ついで受容体ノックアウトマウスの解析によって現在までに明らかになったプロスタノイドの生理的・病態生理的役割について紹介する。

## 1. プロスタノイド受容体とその遺伝子の構造

### 1. ロドプシン型受容体としてのプロスタノイド受容体

クローン化されたマウスプロスタノイド受容体のアミノ酸配列を図2に示す。ここでは、想定された7つの膜貫通領域の相同性をもとに8種類の受容体を配置した。この膜貫通領域やその近傍には計28個の、すべてのプロスタノイド受容体で保存されたアミノ酸残基が

存在しており、これらはリガンドであるプロスタノイド分子間の共通構造を認識する結合部位の形成や受容体の構造維持に重要と考えられる。たとえば、第1および第2細胞外ループに存在する2個のシスチン残基は、ジスルフィド結合することにより受容体の構造保持やリガンド結合に寄与すると考えられている。また、第7膜貫通領域に存在するアルギニン残基はすべてのプロスタノイド受容体において保存されており、この残基がロドプシンのレチナール結合部位である Lys 296 との類推から、プロスタノイド分子に存在するカルボキシル基の結合部位であることが提唱されている<sup>54)</sup>。一方、プロスタノイド受容体にはこれらの保存されたアミノ酸以外にもロドプシン型受容体としてのいくつかの特徴がある。まず、1個ないし2個のN-グリコシル



図2 プロスタノイド受容体のアミノ酸配列

マウスの PGD<sub>2</sub> 受容体 (DP), PGI<sub>2</sub> 受容体 (IP), 4 種類の PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4), TXA<sub>2</sub> 受容体 (TP), PGF<sub>2α</sub> 受容体 (FP) のアミノ酸配列を相同性が高くなるように並べた。横線は細胞膜貫通領域を示し、プロスタノイド受容体間でも保存されたアミノ酸を白抜き文字で強調して示す。

化を受けると想定される配列 (Asp-X-Ser/Thr) が N 末端細胞外領域, 第 1 細胞外ループ, 第 2 細胞外ループに存在する。次に, 多くのロドプシン型受容体にみられるように, リン酸化部位と考えられるセリンとスレオニン残基がすべてのプロスタノイド受容体の細胞内ドメインに広範に分布している。

## 2. プロスタノイド受容体の遺伝子構造とアイソフォーム

プロスタノイド受容体の遺伝子構造は, 最初にヒト TP 受容体について解析された。その結果 TP 遺伝子は 5' 側非翻訳領域と第 6 膜貫通領域の終わりの部分に位置する 2 個のイントロンによって隔てられた 3 個のエクソンよりなることが明らかとなった<sup>7)</sup>。このエクソン-イントロンの関係は, プロスタノイド受容体間で種をこえて保存されている。一方, いくつかのプロスタノイド受容体においては C 末端にさらにエクソンが存在し, このエクソンの選択的スプライシングによって受容体アイソフォームが生成する。これは, EP3<sup>8-10)</sup>, TP<sup>11)</sup>, FP<sup>12)</sup> で報告されている。この選択的スプライシングは第 7 膜貫通領域の直後で起こり, C 末端の構造のみ異なるさまざまな受容体アイソフォームが形成される。EP3, FP, TP アイソフォーム間ではおのおのそのリガンド結合の特異性に関してほとんど差が認められない。しかし, ウシ EP3 とヒト TP アイソフォームは, それぞれ異なる G 蛋白質と連関し, 異なった情報伝達を行う<sup>8,10)</sup>。さらに, マウス EP3 アイソフォームはその G 蛋白との連関の効率<sup>13)</sup>, アゴニストによって誘導される脱感作の感受性<sup>20)</sup>, 受容体の constitutive activity の程度<sup>21,22)</sup> などに差が認められる。また, 受容体の constitutive activity の程度の差はヒト EP3<sup>23)</sup> やヒツジ FP<sup>12)</sup> のアイソフォーム間でも認められる。

## II. プロスタノイド受容体の機能

### 1. リガンド結合特異性と受容体アゴニスト・アンタゴニスト

プロスタノイド受容体の 8 種類のタイプ・サブタイプ受容体は, それぞれ特異的なリガンド結合特異性を示し, この特異性によってその分類が可能である。従来, このリガンド結合特異性は, おもに選択的な受容体アゴニスト・アンタゴニストやプロスタノイド類似

化合物の一群のバイオアッセイ系での効力を, 比較検討して評価されてきた。このように, 薬理学的手法は非常に正確なプロスタノイド受容体の分類に成功した。しかし, これらの研究は受容体のリガンド結合特異性に関しては定性的であり, 定量性に欠けていた。一方, プロスタノイド受容体のクローニングによって, 1 つの種の均一な受容体を発現させ, 各プロスタノイド受容体のリガンド結合特異性やプロスタノイドリガンドの受容体選択性を詳細に解析することが可能となった。桐山ら<sup>24)</sup> は, 33 種類のプロスタノイドやその類似化合物を用いてすべてのマウスプロスタノイド受容体のリガンド結合特異性を系統的に解析した (表 1)。

### 2. 情報伝達機構

プロスタノイド受容体の情報伝達経路を表 2 にまとめて示す。TP を介する情報伝達には数種類の G 蛋白質が関与することが報告されている<sup>25-29)</sup>。これらの結果は, TP のアイソフォームの存在と併せて TP を介する情報伝達経路の多様性を説明するものと考えられる。EP1 に連関する G 蛋白質は, CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞において PGE<sub>2</sub> による Ca<sup>2+</sup> イオンの上昇を仲介する。この細胞内 Ca<sup>2+</sup> イオンの上昇は細胞外 Ca<sup>2+</sup> イオンに依存しており, そのとき PI 代謝回転はほとんど検出できない<sup>30)</sup>。EP2, EP4 は Gs 蛋白質と連関し, 細胞内 cAMP 濃度の上昇を惹起する。EP3 の主要な情報伝達経路は Gi 蛋白質を介したアデニレートシクラーゼの抑制である。しかし上記のように EP3 にはスプライシングバリエーションが存在し, それぞれ異なった情報伝達を行ったり, ある受容体アイソフォームは G 蛋白質の活性化ではなく機能の抑制をすることなどは注目に値する。IP 受容体はアデニレートシクラーゼを刺激することが知られていた。しかし, クロニ化受容体の発現系を用いた解析によると IP 受容体は cAMP 濃度の上昇をひき起こすだけでなく, PI 代謝回転も惹起することが明らかとなった<sup>31)</sup>。FP は Gq 蛋白質と連関し, 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇を惹起する<sup>32)</sup>。DP は Gs 蛋白質と連関し, 細胞内 cAMP 濃度の上昇を惹起する。DP を介する情報伝達においては PI 代謝回転の関与は報告されていない。

表1 プロスタノイドおよびその類似化合物のマウスプロスタノイド受容体に対する結合親和性

リガンド	$K_i$ 値 (nM)							
	DP	IP	TP	FP	EP <sub>1</sub>	EP <sub>2</sub>	EP <sub>3</sub>	EP <sub>4</sub>
PGD <sub>2</sub>	21 (17~28)			47 (34~66)			280 (180~430)	
BW245C	250 (160~380)			1700 <sup>a)</sup>				
BW868C	220 (150~340)							
シカプロスト		10 (8.2~13)				1300 <sup>a)</sup>	170 (130~210)	
イロプロスト		11 (8.7~15)			21 (17~26)	1600 <sup>a)</sup>	22 (17~30)	2300 <sup>a)</sup>
カルバシクリン		100 (85~130)		1200 <sup>a)</sup>		1600 <sup>a)</sup>	31 (22~42)	2300 <sup>a)</sup>
イソカルバシクリン		15 (12~18)				1000 <sup>a)</sup>	31 (25~38)	
ベラプロスト		16 (13~21)					110 (91~130)	
ONO-1301		47 (38~57)					740 (460~1200)	
S-145			0.68 (0.47~0.97)					
I-BOP			0.56 (0.44~0.72)	100 (73~140)		220 (160~310)	100 (84~130)	
GR-32191			12 (9.9~16)					
STA <sub>2</sub>	1600 (590~4600)		14 (11~17)	97 (73~130)		220 (150~340)	23 (18~28)	350 (240~510)
SQ-29548			13 (9.6~18)					
U-46619			67 (48~93)	1000 (560~1600)				
PGF <sub>2α</sub>				3.4 (2.8~4.2)	1300 <sup>a)</sup>		75 (53~100)	
フルプロステノール				3.8 (3.1~4.8)				
PGE <sub>2</sub>				100 (73~140)	20 (15~26)	12 (9.2~15)	0.85 (0.69~1.1)	1.9 (1.5~2.5)
PGE <sub>1</sub>		33 (25~42)			36 (27~48)	10 (7.8~13)	1.1 (0.91~1.4)	2.1 (1.5~3.1)
17-フェニル-PGE <sub>2</sub>				60 (47~77)	14 (11~18)		3.7 (2.8~4.9)	1000 <sup>a)</sup>
スルプロストン				580 (360~930)	21 (17~25)		0.60 (0.44~0.81)	
M&B-28767			1300 <sup>a)</sup>	124 (123~124)	120 (110~150)		0.68 (0.53~0.87)	500 (300~850)
16, 16-ジメチル PGE <sub>2</sub>				350 (250~480)		17 (13~23)	1.9 (1.5~2.5)	43 (32~58)
11-デオキシ-PGE <sub>1</sub>		1000 <sup>a)</sup>			600 <sup>a)</sup>	45 (37~54)	1.5 (1.2~1.8)	23 (16~32)
GR-63799X							1.9 (1.6~2.4)	480 (320~720)
19R(OH)-PGE <sub>2</sub>				1000 <sup>a)</sup>				
ミソプロストール					120 (94~150)	250 (190~340)	67 (53~89)	67 (45~99)
ブタプロスト						110 (83~140)		
1-OH-PGE <sub>1</sub>							330 (240~460)	190 (120~280)
AH-13205						240 (150~400)	82 (57~120)	
AH-6809						350 (250~500)		
SC-19220								
8-エピ-PGF <sub>2α</sub>								

数字は結合置換実験の結果をコンピュータ解析することによって得られた  $K_i$  値とその 95% 信頼域 (括弧内) を示す。空欄は、その化合物の 10 μM の濃度における各受容体特異的な放射性リガンドの置換率が 50% 以下であることを示す。

a) コンピュータによるデータ解析が不能であるため、得られた IC<sub>50</sub> 値より計算された  $K_i$  値を示す。

表 2 プロスタノイド受容体の情報伝達

タイプ	サブタイプ	アイソフォーム	G蛋白質	セカンドメッセンジャー	
TP		TP $\alpha$	Gq, Gs	PI 応答, cAMP $\uparrow$	
		TP $\beta$	Gq, Gi	PI 応答, cAMP $\downarrow$	
EP	EP1		G(?)	Ca <sup>2+</sup> $\uparrow$	
	EP2		Gs	cAMP $\uparrow$	
	EP4		Gs	cAMP $\uparrow$	
	EP3	EP <sub>3A</sub>	Gi		cAMP $\downarrow$
		EP <sub>3B</sub>	Gs		cAMP $\uparrow$
		EP <sub>3C</sub>	Gs		cAMP $\uparrow$
EP <sub>3D</sub>		Gi, Gs, Gq		cAMP $\downarrow$ , cAMP $\uparrow$ PI 応答	
FP			Gq	PI 応答	
IP			Gs, Gq	cAMP $\uparrow$ , PI 応答	
DP			Gs	cAMP $\uparrow$	

この表は種々の動物のプロスタノイド受容体より得られたデータをまとめて示す。TP アイソフォームはヒト、EP3 アイソフォームはウシ、それ以外はマウスの受容体である。

血管平滑筋での作用は、種々の病態時の血小板機能や局所での臓器血流の調節などに関与すると考えられる。次に血管内皮障害モデルを用いた血栓形成<sup>35)</sup>が検討された。頸動脈の外膜側より塩化第二鉄を添加して血管内皮障害を惹起し、4時間後に血流と血管組織像が解析された。その結果、IP 欠損マウスでは著明な血栓形成の増強が認められ、PGI<sub>2</sub> が血管の内皮障害に起因する血栓形成に重要な役割を果たすことが示された。動脈硬化が血管内皮の障害を契機とし

### III. プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた解析

これまで述べたように、分子生物学的な手法を用いた解析も加わり、現在プロスタノイド受容体の構造、機能およびその生体内分布について多くの知見が得られている。しかし、生体においてプロスタノイドの果たす役割やその意義については十分には解明されていない。また、発熱などのよく知られた PGE<sub>2</sub> の作用にどの受容体サブタイプが関与するかについても必ずしも明らかではない。これらの点のいくつかに関しては、それぞれのプロスタノイド受容体欠損マウスの解析によって明らかにされつつある。

#### 1. IP 欠損マウスと血栓形成、炎症反応

PGI<sub>2</sub> は血小板活性化の抑制と血管平滑筋の弛緩作用を示す。一方、TXA<sub>2</sub> は血小板活性化と血管平滑筋の収縮作用を示すことから、この両者のバランスが血栓傾向や動脈硬化の要因として重要と考えられている<sup>33)</sup>。

IP 遺伝子の第2および第3エクソンの一部をネオマイシン耐性遺伝子で置換し、相同組換えによってIPを欠損するマウスが作製された<sup>34)</sup>。IP ホモ欠損マウスは正常に発育し、生殖機能にも異常を認めなかった。また、IP 欠損マウスの血小板や血管平滑筋は PGI<sub>2</sub> アゴニストに対する反応を欠如するが、出血時間や血圧には変化を認めなかった。したがってこれらの血小板や

で発症・進展することを考えると、この抗血栓効果が PGI<sub>2</sub> のもつ抗動脈効果の作用機構の一部であると考えられる。

従来、プロスタノイドは炎症のメディエーターとしての役割が知られている<sup>36)</sup>。なかでも PGE<sub>2</sub> がその中心と考えられ、PGI<sub>2</sub> の関与は明らかではなかった。そこで、炎症反応の指標として血管透過性の亢進について焦点をあて、外来性に投与したこれらの PG の作用が解析された。マウスにボンタミンスカイブルー色素を静注した後、背部皮下にブラジキニン単独あるいは PG と併せて注入し、4時間後に皮内に漏出した色素を抽出し比色定量した<sup>37)</sup>。この結果、野性型マウスでは PGE<sub>2</sub> と PGI<sub>2</sub> はともにブラジキニンの血管透過性亢進作用を強く増強し、IP 欠損マウスでは PGI<sub>2</sub> の作用のみが欠失していた。この結果は、PGE<sub>2</sub> と PGI<sub>2</sub> がともに炎症の場において血管透過性を亢進させる可能性を示唆した。ついで内因性 PG の炎症反応への関与がカラゲニン浮腫モデル<sup>38)</sup>を用いて検討された。マウス後肢にカラゲニンを皮下注入し、惹起された炎症反応に伴う血管透過性亢進による浮腫を足趾の体積の変化として解析した。その結果、IP 欠損マウスでは浮腫の形成が著明に減弱しており、その程度は野性型マウスをインドメタシン処理したものと同程度であった(図3a)。この結果、予想に反して PGE<sub>2</sub> ではなく PGI<sub>2</sub> がカラゲニン炎症に伴う血管透過性に重要なプロスタノイドであることが明らかとなった。

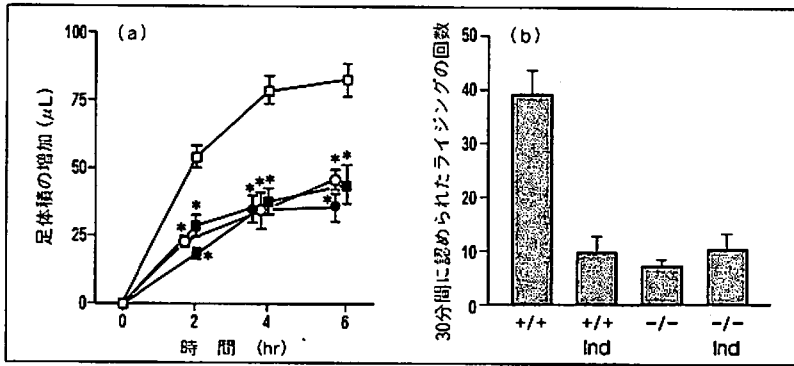


図3 IP欠損マウスにおける炎症性浮腫と疼痛感受性  
 (a) カラゲニン誘発足浮腫: 2% カラゲニン溶液 30  $\mu$ L をマウスの右後肢足掌に注入し、足の体積の経時変化を測定した。インドメタシン (10 mg/kg) はカラゲニン注入の30分前に腹腔内に投与した。□: 野性型マウス (n=9), ○: IP欠損マウス (n=10), ■: インドメタシン処理した野性型マウス (n=8), ●: インドメタシン処理したIP欠損マウス (n=7), \*:  $p < 0.01$ 。  
 (b) 酢酸ライジング試験: 0.9% 酢酸溶液 (5 mL/kg) を腹腔内に投与し、30分の間に認められるライジング (疼痛反応) の回数を測定した。インドメタシン処理は (a) と同様に行った。+/+: 野性型マウス, -/-: IP欠損マウス, Ind: インドメタシン処理, n=6~9, \*:  $p < 0.01$ 。

一方、脊髄後根神経節の神経細胞の約50%にIPの発現が認められることから知覚伝達へのPGI<sub>2</sub>の関与が示唆されている。そこで、酢酸ライジング<sup>39)</sup>を用いた炎症反応に伴う疼痛が解析された。マウス腹腔内に希酢酸を注入し疼痛反応としてのライジングの回数を30分間計測した。その結果、野性型マウスでは約40回反応が認められるのに対し、IP欠損マウスでは約8回と疼痛反応の著明な減少を認め、その程度は野性型マウスをインドメタシン処理したものと同程度であった (図3b)。この結果、この系において痛覚の伝達はおもにIPを介していることが証明された。このように、PGI<sub>2</sub>は心血管系での抗血栓作用以外に炎症反応の場において血管透過性の亢進や疼痛の伝達など非常に重要な役割を果たしていることが示された。

## 2. FP欠損マウスと分娩

従来PGF<sub>2 $\alpha$</sub> の作用として、子宮・気管・消化管平滑筋の収縮作用、黄体退縮作用、眼圧低下作用などが知られている。

FP受容体遺伝子の第2エクソンの一部を $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびネオマイシン耐性遺伝子で置換し、相同組換えによってFPを欠損するマウスが作製された<sup>40)</sup>。FP欠損マウスは正常に発育した。従来、ヒツジやブタでは黄体退縮にPGF<sub>2 $\alpha$</sub> が必須であることが知られてお

り<sup>41,42)</sup>、実際にマウスの黄体にもFPが多く発現している<sup>43,44)</sup>。しかし、FP欠損マウスのメスの性周期には異常が認められなかった。また、FP欠損マウスのメスは妊娠可能であり、その卵巣での黄体数および子宮での着床数は正常であった。この結果は、FP欠損マウスのメスの排卵、受精、着床は正常であることを示している。

野性型マウスの体重は妊娠20~21日まで増加し、その後分娩に伴い減少する。しかし、FP欠損マウスの体重は妊娠22~23日まで増加し、その後分娩が認められず体重は約1

週間かかって徐々に減少した (図4a)。このマウスの子宮では、妊娠期間の長期化による胎盤の変性と胎児の子宮内死亡に伴う吸収が観察された。一方、これらの胎児は分娩予定日に帝王切開し借り親に託すことにより救助され (図4b)、その後正常に発育した。これらの結果、ホモ欠損マウスでは分娩の発来機構に異常があることが明らかとなった。

分娩の誘発にはいくつかのホルモンのはたらきが関係しており、なかでもオキシトシンが重要であることが知られている<sup>45)</sup>。実際、分娩時には子宮平滑筋のオキシトシン感受性が亢進するが、これは子宮でのオキシトシン受容体の発現誘導によることが知られている<sup>46)</sup>。そこで、妊娠20日のマウス子宮のオキシトシン感受性が平滑筋の収縮反応で、またオキシトシン受容体mRNAの発現がノーザンブロット法で解析された。その結果、野性型マウスのオキシトシン感受性は亢進しオキシトシン受容体の発現は著明に増加していたが、FP欠損マウスではこれらの変化はまったく認められなかった。

一方、母体の血中プロゲステロン濃度は分娩に先だって低下し<sup>47)</sup>、これが子宮平滑筋の収縮力の増加につながると考えられている<sup>48)</sup>。そこで、マウス血中プロゲステロン濃度を測定すると、野性型マウスでは妊娠19~21日で著明に低下するが、FP欠損マウスでは変化が認め



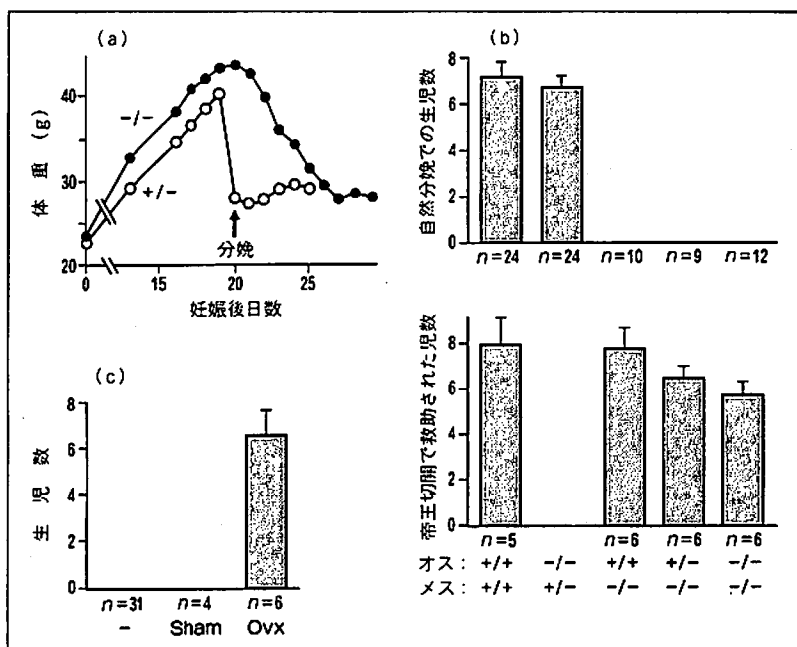


図4 FP欠損マウスに認められた分娩障害

(a) 妊娠に伴う体重の経時変化。○：ヘテロ接合体，●：FP欠損マウス。  
 (b) 出生児数に対する雌雄マウスの遺伝子型の影響（上段）と帝王切開によって救助された生児数（下段）。メスがホモ接合体の場合はオスの遺伝子型とは無関係に分娩障害が認められ児は死亡する。しかし、これらも帝王切開後借り親に託すことにより野性型とほぼ同数の生児が得られる。n.d.：実施せず，+/+：野性型マウス，+/-：ヘテロ接合体，-/-：FP欠損マウス。  
 (c) FP欠損マウスの卵巣摘除による分娩の正常化：妊娠19日のFP欠損マウスに卵巣摘除術を行い、翌日に得られた生児数を示す。-：無処置，Sham：シャム手術，Ovx：卵巣摘除術。

られなかった。この結果は、FP欠損マウスで見られる分娩障害がプロゲステロンの持続産生に起因することを示唆するものであった。実際に、主要なプロゲステロン産生臓器である卵巣を妊娠19日に摘出することにより、FP欠損マウスは分娩が可能となった（図4c）。また、卵巣摘出によって12時間以内に子宮でのオキシトシン受容体が発現誘導されることが確認された。これらの結果を総合すると、FP欠損マウスの分娩障害は黄体退縮が起こらずプロゲステロンが持続して分泌されることが原因と考えられた。

従来、アスピリンなどPG産生を抑制する薬物が分娩遅延をきたすことが知られていたが<sup>49)</sup>、どのPGがどのような機構で分娩に関与するかは不明であった。また、オキシトシンを投与すると子宮でのPGF<sub>2α</sub>産生が亢進することから、PGF<sub>2α</sub>の作用はオキシトシンによって調節されると考えられていた<sup>50)</sup>。しかし、FP欠損マウスの解析によって、PGF<sub>2α</sub>がまず黄体退縮をひき起こ

し、これが血中プロゲステロン濃度を低下させ、続いて子宮でのオキシトシン受容体の発現を誘導するという分娩においてはたらく一連の機構が解明された。この結果、PGF<sub>2α</sub>は子宮収縮作用を示すのみでなく、分娩の発来において基本的に重要な役割をもつプロスタノイドであることが示された。

### 3. EP4欠損マウスと動脈管開存

最近、EP4欠損マウスの作出と解析の報告が2カ所の研究室からなされ<sup>51,52)</sup>、ほぼ同様の結果が得られた。EP4欠損マウスは生後呼吸を開始し正常に授乳を受けるが、その95%は次第に衰弱し蒼白となって72時間以内に死亡した。残りの5%のマウスの動脈管は閉鎖しており、正常に発育して1年以上生存する。この

EP4欠損マウスの生存率はマウスの遺伝的背景の影響を受けて変動する。衰弱したEP4欠損マウスを解剖すると肺うっ血と左心室や肺動脈の拡張など、左心不全の所見が認められた。そこで、心血管系を解析したところ動脈管の開存が見いだされた。動脈管は肺動脈と下行大動脈をつなぐ血管であり、胎生期に肺への血流を大動脈へシャントするはたらきをする<sup>53)</sup>。通常、動脈管は出生直後に閉鎖するが、これは肺呼吸の開始に伴う動脈血酸素分圧の上昇による動脈管の収縮と出産に伴うPGE<sub>2</sub>の血中濃度の低下に基づく動脈管拡張作用の消失によると考えられている。動脈管が開存すると肺への血流が過剰となるため肺高血圧症を経て心不全に陥る。従来、アスピリン（PGE<sub>2</sub>を含めてプロスタノイドの産生を抑制する薬物）を妊婦に投与すると動脈管が胎生期に閉鎖することが知られており<sup>54)</sup>、この作用は動脈管開存症の治療に利用されている<sup>55)</sup>。一方、PGE<sub>2</sub>は動脈管の閉鎖を抑制することが知られており、

この作用を利用してある種の心奇形の治療に用いられている<sup>56)</sup>。最近、PGE<sub>2</sub>の動脈管拡張作用はEP4を介することが示された<sup>57)</sup>。実際に、EP4が野性型マウスの動脈管に多く発現しており、EP4欠損マウスでは欠損していることが *in situ* ハイブリダイゼーション法によって確認された。これらの結果は、EP4が胎生期に動脈管を開存させる役割をもつことを示唆しているが、EP4欠損マウスで認められた動脈管の開存の所見とは一見矛盾する。この結果の解釈は困難であるが、動脈を持続的に拡張しておき突然これを中止することによって血管の収縮が増強される現象<sup>58,59)</sup>が注目される。EP4欠損マウスでは胎生期に十分な動脈管の拡張が得られずそれに対抗する収縮力の増強が認められない、その結果出生直後の動脈管の収縮が相対的に弱まる可能性があげられる。いずれにせよ、EP4が出生直後の動脈管の開鎖にとって重要な役割をもつことが明らかにされた。

#### 4. EP3欠損マウスと発熱

発熱は疾患の主要な徴候であり、菌体成分であるLPSや無菌性炎症などの外因性発熱物質により引き起こされる。これらの外因性発熱物質はIL-1 $\beta$ ,  $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ などのサイトカインの産生を惹起し、これらが内因性発熱物質として脳に作用する<sup>60)</sup>。従来、発熱がプロスタノイドの産生を阻害するア

スピリンなどの抗炎症薬によって抑制される<sup>61)</sup>ことから、プロスタノイドが発熱にとって重要な役割を果たすと考えられてきた。なかでもPGE<sub>2</sub>が発熱のメディエーターとして重視されてきた<sup>62)</sup>が、この点に関しては多くの議論がなされてきた<sup>60,63-66)</sup>。また、PGE<sub>2</sub>の発熱作用がEP1, EP2, EP3, EP4のうちどのサブタイプ受容体を介して発揮されるのかについても不明であった。そこで4種類のEPサブタイプのおのおのを欠損したマウスを用いてPGE<sub>2</sub>の発熱作用が解析された<sup>67)</sup>。PGE<sub>2</sub>を野性型マウスの脳室内に投与すると25分後をピークとして約2°Cの一過性の発熱が出現する。EP1, EP2, EP4欠損マウスではPGE<sub>2</sub>の脳室内投与により野性型マウスと同様の発熱反応が出現したが、EP3欠損マウスではまったく反応が認められなかった(図5a)。この結果、PGE<sub>2</sub>の発熱作用はEP3を介することが明らかになった。ついで、代表的な内因性発熱物質であるIL-1 $\beta$ を野性型マウスの静脈内に投与すると20分後をピークとして約1°Cの一過性の発熱が出現し、脳室内に投与すると1時間後より数時間持続する発熱が認められた。この発熱反応もEP3欠損マウスにおいて特異的に消失しており、少なくとも一部の内因性発熱物質による発熱はEP3を介することが明らかになった。一方、LPSによる発熱はIL-1 $\beta$ を含む複数の内因性発熱物質(サイトカイン)の産生を介して発揮されている。実際、IL-1 $\beta$ 欠損マウスにおいてもLPSによる発熱反

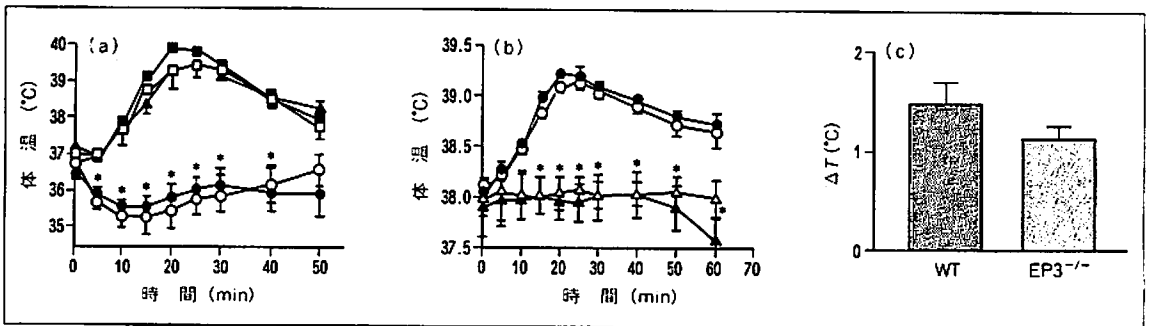


図5 EP3欠損マウスと発熱

(a) EP3欠損マウスでのPGE<sub>2</sub>誘発発熱: PGE<sub>2</sub> (1 nmol)を脳室内に投与し、直腸温を経時的に計測した。EP1 (■), EP2 (□), EP4 (▲)欠損マウスでは投与後20~25分をピークとして一過性の発熱を認める。しかし、EP3欠損マウス (●)はまったく発熱反応を示さない。○: ピークを投与したEP3欠損マウス, \* : p < 0.01 (PGE<sub>2</sub>投与した野性型マウスに対して)。

(b) EP3欠損マウスでのLPS誘発発熱: LPS (10 mg/kg 体重)を尾静脈より投与し、直腸温を経時的に計測した。野性型マウス (○)とEP1欠損マウス (●)では投与後20~25分をピークとして持続性の発熱を認める。しかし、EP3欠損マウス (▲)はまったく発熱反応を示さない。△: ピークを投与したEP3欠損マウス, \* : p < 0.01

(c) EP3欠損マウスでのストレス誘発発熱: マウスをホルダーに入れることで拘束性ストレスを加え、30分後の体温の上昇を測定した。この解析では、野性型マウスとEP3欠損マウスとでその体温上昇の程度に差は認められない。

応は野性型マウスと同様に認められ<sup>68,69)</sup>, IL-1 $\beta$  以外のサイトカインも LPS 発熱に重要な役割を果たすと考えられる。そこで、まず EP3 欠損マウスの腹腔マクロファージを用いて LPS 刺激による IL-1 $\beta$  と IL-6 の産生を検討し、これらの産生が正常であることが確認された。また、LPS を野性型マウスに静脈内投与すると 20 分後をピークとして約 1°C の持続性の発熱が出現した。ついで、LPS を EP3 欠損マウスに投与するとまったく発熱反応が認められなかった(図 5 b)。この結果、PGE<sub>2</sub> は EP3 を介して外因性発熱物質による発熱のメディエーターとしてはたらくことが明らかになった。一方、EP3 欠損マウスでは、マウスを拘束することによるストレス誘発発熱反応は正常であり(図 5 c)、発熱機構そのものは正常と考えられた。以上の結果、PGE<sub>2</sub> は外因性発熱物質や内因性発熱物質による発熱の最終メディエーターとして作用すること、およびその作用は EP3 受容体を介することが証明された。

## 5. EP2 欠損マウスと受精, 血圧

プロスタノイドは血管の収縮や弛緩作用を示す。たとえば、TXA<sub>2</sub> や PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  は血管平滑筋を収縮させ、PGI<sub>2</sub> がその弛緩にはたらくことはよく知られている。一方、PGE<sub>2</sub> は血管に対して EP1, EP3 を介して収縮作用を示し、EP2, EP4 を介して弛緩作用を示す。また、腎臓の血管や尿細管に多種類のプロスタノイド受容体が発現しており、腎血流量や糸球体濾過率の調節、水・電解質の再吸収に関与している。これらの結果、プロスタノイドは血圧の調節に重要な役割を果たすことが予想された。しかし、血管への作用が強い TXA<sub>2</sub> と PGI<sub>2</sub> の各受容体欠損マウスにおいては、平常時の血圧は野性型マウスと差を認めなかった。そこで、EP2 欠損マウスと血圧との関係が解析された<sup>70)</sup>。EP2 欠損マウスの平常時の血圧は、野性型マウスに比し軽度の上昇を認めた。一方、PGE<sub>2</sub> の静脈内投与によって野性型マウスでは血圧が低下し、EP2 欠損マウスでは逆に血圧が上昇することから、血管の EP2 は PGE<sub>2</sub> の血圧低下作用を仲介し、EP1 や EP3 が血圧の上昇を仲介することが示された。さらに、高塩分食の負荷によって EP2 欠損マウスでは著明な高血圧が出現し、この時野性型マウスの血圧上昇は認めなかった。また、塩分負荷に伴い野性型マウスと EP2 欠損マウスは同程度に尿中の PGE<sub>2</sub> 排泄量の増加を認めた。これらの結果、EP2 欠損

マウスの塩分感受性高血圧は、塩分負荷によって PGE<sub>2</sub> 産生が亢進し、これが血管に作用し血圧の上昇をきたしたものと考えられた。

一方、EP2 欠損マウスの出産直前の胎児数は平均すると 1.5 であり、野性型マウスの平均値 7.1 と比し極端に低下している<sup>71)</sup>。この胎児数の減少は、受精障害を大きな原因としており、一部排卵障害によっている。排卵から受精に至る過程において、卵子は卵丘細胞に取り囲まれている。この卵丘細胞は、最初細胞間の接着が緻密であるが、次第に expansion とよばれる現象によって細胞間の接着が脆弱となり、卵子が精子と受精しやすい状態へ移行する。この卵丘細胞の expansion は、卵胞刺激ホルモンと PGE<sub>2</sub> によって促進され、この PGE<sub>2</sub> の作用は、卵丘細胞に発現誘導された EP2 を介することが証明された。また、この現象は排卵後から受精に至る子宮内の過程においても進行するため、排卵後の卵胞刺激ホルモンが作用不能な状況下では PGE<sub>2</sub> の作用が必須となる。したがって、EP2 欠損マウスではとくに子宮内での卵丘細胞の expansion が障害され、著明な受精障害が出現することが明らかとなった。

**おわりに** 最近になって、プロスタノイド受容体のクローニングに伴い、受容体の構造、機能やその生体内分布の解析は飛躍的に進展した。本稿では、これらの結果の概略を示した。

また、それぞれのプロスタノイド受容体を欠損するマウスの作出と解析によって、プロスタノイドの生体内における役割の解明がなされつつあり、その現在までの成果について紹介した。これらの解析の結果、新たなプロスタノイドの作用や作用機構が解明され、それらが生体内でどの程度重要な役割を果たすかの評価が可能となってきた。これらの成果は、創薬の観点からも重要な情報を提供するものと考えられる。本稿で紹介した、PGI<sub>2</sub> の炎症や疼痛への関与、PGE<sub>2</sub> の EP3 を介した発熱や EP2 を介した血圧への関与などは、各プロスタノイド受容体に特異的なアゴニストやアンタゴニストの開発を促し、副作用の少ない新たな抗炎症薬、鎮痛薬、解熱薬あるいは高血圧薬の開発へと展開する根拠を与えるものである。今後さらに、プロスタノイドの炎症・免疫系、生殖器系、骨、腎臓、消化管、中枢神経、循環器など多くの臓器・器官で果たす

生理的・病態生理的な役割の解明がなされ、新規薬物の開発に貢献することが期待される。

文 献

- 1) Coleman, R. A., Kennedy, I., Humphrey, P. P. A., Bunce, K., Lumley, P. : *in* Comprehensive Medicinal Chemistry (ed. Emmett, J. C.), Vol. 3, pp. 643-714, Pergamon Press, Oxford (1990)
- 2) Coleman, R. A., Grix, S. P., Head, S. A., Louttit, J. B., Mallett, A., Sheldrick, R. L. G. : *Prostaglandins*, **47**, 151-168 (1994)
- 3) Ushikubi, F., Hirata, M., Narumiya, S. : *J. Lipid Mediators*, **12**, 343-359 (1995)
- 4) Ushikubi, F., Nakajima, M., Hirata, M., Okuma, M., Fujiwara, M., Narumiya, S. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 16496-16501 (1989)
- 5) Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S., Narumiya, S. : *Nature*, **349**, 617-620 (1991)
- 6) Narumiya, S., Hirata, M., Namba, T., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Sugimoto, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. : *J. Lipid Mediators*, **6**, 155-161 (1993)
- 7) Nusing, R. M., Hirata, M., Kakizuka, A., Eki, T., Ozawa, K., Narumiya, S. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 25253-25259 (1993)
- 8) Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., Narumiya, S. : *Nature*, **365**, 166-170 (1993)
- 9) Takeuchi, K., Abe, T., Takahashi, N., Abe, K. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 885-891 (1993)
- 10) Regan, J. W., Bailey, T. J., Donello, J. E., Gil, D. W. *et al.* : *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 377-385 (1994)
- 11) Breyer, R.M., Emeson, R. B., Tarng, J. L., Breyer, M. D. L., Davis, S., Abromson, R. M., Ferrenbach, S. M. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 6163-6169 (1994)
- 12) Adam, M., Boie, Y., Rushmore, T. H., Muller, G., Bastien, L., Mckee, K. T., Metters, K. M., Abramovitz, M. : *FEBS Lett.*, **338**, 170-174 (1994)
- 13) Sugimoto, Y., Negishi, M., Hayashi, Y., Namba, T., Honda, A., Watabe, A., Hirata, M., Narumiya, S., Ichikawa, A. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 2712-2718 (1993)
- 14) Negishi, M., Sugimoto, Y., Irie, A., Narumiya, S., Ichikawa, A. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 9517-9521 (1993)
- 15) Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S., Ichikawa, A. : *Eur. J. Biochem.*, **217**, 313-318 (1993)
- 16) Kotani, M., Tanaka, I., Ogawa, Y., Usui, T., Tamura, N., Mori, K., Narumiya, S., Yoshimi, T., Nakao, K. : *Genomics*, **40**, 425-434 (1997)
- 17) Raychowdhury, M. K., Yukawa, M., Collins, L. J., Mcgrail, S. H., Kent, K. C., Ware, J. A. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 19256-19261 (1994)
- 18) Pierce, K. L., Bailey, T. J., Hoyer, P. B., Gil, D. W., Woodward, D. F., Regan, J. W. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 883-887 (1997)
- 19) Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M., Narumiya, S. : *J. Clin. Invest.*, **97**, 949-956 (1996)
- 20) Negishi, M., Sugimoto, Y., Irie, A., Narumiya, S., Ichikawa, A. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 9517-9521 (1993)
- 21) Hasegawa, H., Negishi, M., Ichikawa, A. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 1857-1860 (1996)
- 22) Negishi, M., Hasegawa, H., Ichikawa, A. : *FEBS Lett.*, **386**, 165-168 (1996)
- 23) Jin, J., Mao, G.F., Ashby, B. : *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 317-323 (1997)
- 24) Kiriya, M., Ushikubi, F., Kobayashi, T., Hirata, M., Sugimoto, Y., Narumiya, S. : *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 217-224 (1997)
- 25) Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C., Spiegel, A. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 9309-9313 (1991)
- 26) Knezevic, I., Borg, C., Le Breton, G. C. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 26011-26017 (1993)
- 27) Ushikubi, F., Nakamura, K., Narumiya, S. : *Mol. Pharmacol.*, **46**, 808-816 (1994)
- 28) Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K., Schultz, G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 504-508 (1994)
- 29) Djellas, Y., Manganello, J. M., Antonakis, K., Le Breton, G. C. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 14325-14330 (1999)
- 30) Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S., Ichikawa, A. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 20175-20178 (1993)
- 31) Namba, T., Oida, H., Sugimoto, Y., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 9986-9992 (1994)
- 32) Ito, S., Sakamoto, K., Mochizuki-Oda, N., Ezashi, T., Miwa, K., Okuda-Ashitaka, E., Shevchenko, V. I., Kiso, Y., Hayaishi, O. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 756-762 (1994)
- 33) Bunting, S., Moncada, S., Vane, J. R. : *Br. Med. Bull.*, **39**, 271-276 (1983)
- 34) Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Narumiya, S. *et al.* : *Nature*, **388**, 678-682 (1997)

- 35) Kurz, K. D., Main, B. W., Sandusky, G. E. : *Thromb. Res.*, **60**, 269-280 (1990)
- 36) Vadas, P., Wasi, S., Movat, H. Z., Hay, J. B. : *Nature*, **293**, 583-585 (1981)
- 37) Ueno, A., Tokumasu, T., Naraba, H., Oh-ishi, S. : *Eur. J. Pharmacol.*, **284**, 211-214 (1995)
- 38) Winter, C. A., Flataker, L. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **150**, 165-171 (1965)
- 39) Koster, R., Anderson, M., deBeer, E. J. : *Fed. Proc.*, **18**, 412 (1959)
- 40) Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Narumiya, S. *et al.* : *Science*, **277**, 681-683 (1997)
- 41) McCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J. R., Baird, D. T., Green, K., Samuelsson, B. : *Nature New Biol.*, **238**, 129-134 (1972)
- 42) Moeljono, M. P., Bazer, F. W., Thatcher, W. W. : *Prostaglandins*, **11**, 737-743 (1976)
- 43) Sugimoto, Y., Hasumoto, K., Namba, T., Irie, A., Katsuyama, M., Negishi, M., Kakizuka, A., Narumiya, S., Ichikawa, A. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 1356-1360 (1994)
- 44) Hasumoto, K., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Morimoto, K., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A. : *J. Reprod. Fertil.*, **109**, 45-51 (1997)
- 45) Soloff, M. S., Alexandrova, M., Fernstrom, M. J. : *Science*, **204**, 1313-1315 (1979)
- 46) Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J., Okayama, H. : *Nature*, **356**, 526-529 (1992)
- 47) Thorburn, G. D., Challis, J. R. : *Physiol. Rev.*, **59**, 863-918 (1979)
- 48) Fuchs, A. R., Periyasamy, S., Alexandrova, M., Soloff, M. S. : *Endocrinology*, **113**, 742-749 (1983)
- 49) Lewis, R. B., Schulman, J. D. : *Lancet*, **2**, 1159-1161 (1973)
- 50) Soloff, M. S. : *in* The Onset of Labor (ed. McNelis, D.), pp. 87-123, Perinatology Press (1988)
- 51) 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)
- 52) Segi, E., Sugimoto, Y., Narumiya, S. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 7-12 (1998)
- 53) Heymann, M. A., Rudolph, A. M. : *Physiol. Rev.*, **55**, 62-78 (1975)
- 54) Levin, D. L., Fixler, D. E., Morriss, F. C., Tyson, J. : *J. Pediatr.*, **92**, 478-483 (1978)
- 55) Yeh, T. F., Luken, J. A., Thalji, A., Raval, D., Carr, I., Pildes, R. S. : *J. Pediatr.*, **98**, 137-145 (1981)
- 56) Moulart, A., Senders, R., Ertbruggen, I., Huysmans, H., Harinck, E. : *Eur. J. Cardiol.*, **5**, 321-325 (1977)
- 57) Smith, G. C., Coleman, R. A., McGrath, J. C. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 390-396 (1994)
- 58) Pollock, D., Muir, T. C., MacDonard, A., Henderson, G. : *Eur. J. Pharmacol.*, **20**, 321-328 (1972)
- 59) McCulloch, C. R., Pollock, D. : *Eur. J. Pharmacol.*, **118**, 253-261 (1985)
- 60) Kluger, M. J. : *Physiol. Rev.*, **71**, 93-127 (1991)
- 61) Vane, J. R. : *Nature New Biol.*, **231**, 232-235 (1971)
- 62) Milton, A. S., Wendlandt, S. A. : *J. Physiol. (London)*, **207**, 76P-77P (1970)
- 63) Stitt, J. T. : *Yale J. Biol. Med.*, **59**, 137-149 (1986)
- 64) Mitchell, D., Laburn, H. P., Cooper, K. E., Hellon, R. F., Cranston, W. I., Townsend, Y. : *Yale J. Biol. Med.*, **59**, 159-168 (1986)
- 65) Milton, A. S. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **559**, 392-410 (1989)
- 66) Saper, C. B., Breder, C. D. : *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1880-1886 (1994)
- 67) Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Narumiya, S. *et al.* : *Nature*, **395**, 281-284 (1998)
- 68) Zheng, H., Fletcher, D., Kozak, W., Jiang M., Hofmann, K. J., Conn, C. A., Soszynski, D., Grabiec, C., Trumbauer, M. E., Shaw, A. : *Immunity*, **3**, 9-19 (1995)
- 69) Kozak, W., Zheng, H., Conn, C. A., Soszynski, D., van der Ploeg, L. H., Kluger, M. J. : *Am. J. Physiol.*, **269**, R969-R977 (1995)
- 70) Kennedy, C. R. J., Zhang, Y., Brandon, S., Guan, Y., Coffee, K., Funk, C. D., Magnuson, M. A., Oates, J. A., Breyer, M. D., Breyer, R. M. : *Nature Med.*, **5**, 217-220 (1999)
- 71) Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 10501-10506 (1999)