

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22116002

研究課題名（和文）ロイコトリエン受容体と新規脂溶性リガンドの探索

研究課題名（英文）Leukotriene receptors and new lipid ligands

研究代表者

横溝 岳彦（Yokomizo, Takehiko）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：60302840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 115,200,000円

研究成果の概要（和文）：BLT2は上皮細胞に発現し、腸管バリア機能の維持や皮膚創傷治癒に必要な受容体であることが分かった。BLT2アゴニストは難治性皮膚潰瘍の治療薬候補と考えられた。アスピリンはBLT2リガンドである12-HHTの産生を抑制することで創傷治癒を遅延させた。BLT1、BLT2はゼブラフィッシュの胚発生に必須の遺伝子であった。遺伝子欠損マウスの解析から、BLT1が多発性硬化症を増悪させたり、脊髄損傷の回復を遅らせること、BLT2が気管支喘息の反応を抑制していることも分かった。

研究成果の概要（英文）：A G-protein coupled receptor BLT2 is expressed in epithelial cells, and important in interstitial barrier function and epidermal wound healing. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs including aspirin delays skin wound healing by inhibiting the production of 12-HHT, a BLT2 ligand. A synthetic BLT2 agonist is a drug candidate for intractable skin ulcer in the future. Zebrafish embryogenesis requires BLT1 and BLT2. Gene knockout studies showed that BLT1 augments multiple sclerosis, and delays the recovery from spinal injury. BLT2 seems to attenuate asthmatic responses.

研究分野：生化学、分生生物学、免疫学

キーワード：ロイコトリエン アラキドン酸 受容体 アスピリン 非ステロイド性消炎鎮痛剤 皮膚潰瘍

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、ヒトに約1,000種類の遺伝子が存在し、哺乳動物で最大の遺伝子ファミリーを形成している。臨床医学の現場で利用されている薬剤の約半数がGPCRを標的としていることからその重要性は明らかである。GPCRに結合するリガンドは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、アミン類、光など多岐にわたるが、本研究では脂溶性メディエーターとそのGPCRに焦点を当てて研究を遂行する。過去の研究で、研究代表者らは高親和性ロイコトリエンB4(LTB4)受容体BLT1、低親和性LTB4受容体BLT2を遺伝子同定した。さらに2008年に、LTB4よりも低濃度でBLT2を活性化する内在性脂質リガンドを生化学的に精製し、12-HHT(12-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸)であることを見いだした。12-HHTはこれまで生物学的に不活性な脂肪酸と考えられてきたが、研究代表者らはBLT2欠損マウスが炎症性大腸炎モデルで亢進した病態を示すこと、BLT2がゼブラフィッシュ初期胚の発生に必須の分子であることを見いだしており、12-HHTがBLT2を活性化することで上皮細胞のバリア機能を維持し、腸管における腸内細菌の侵入防止や、ゼブラフィッシュ臓器形成に重要な役割を有していると想定した。また、12-HHTの産生は非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAIDs)の標的であるシクロオキシゲナーゼに依存するため、NSAIDsの作用・副作用の一部が、12-HHT産生の抑制を介している可能性がある。申請者は、上記の研究を行うために、1)BLT1、BLT2を欠損したマウスの樹立、2)12-HHT産生に必要なCOX1,2欠損マウス、トロンボキササンA2合成酵素欠損マウスの入手、3)BLT1、BLT2拮抗薬の入手、4)抗BLT1、BLT2抗体作成の為に準備を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、1)申請者が作製したBLT2欠損マウスの表現型解析(腸炎、皮膚損傷治癒モデル、脳梗塞モデル)、2)ゼブラフィッシュBLT群の発現抑制による表現型解析を行うことで、BLT2受容体とそのリガンドである12-HHTの種を超えた役割を明らかにする。3)また、BLT1遺伝子欠損マウスの表現型解析も併せて行い、BLT1とBLT2の役割の違いについてもあきらかにする。さらに4)12-HHTを同定した手法を他の孤児受容体のリガンド探索に応用し、新規の生理活性脂質を同定することで、脂質メディエーターの研究領域を大きく拡大する。

3. 研究の方法

1)皮膚創傷治癒におけるBLT2の役割：マウ

ス皮膚に径3mmの創傷を施し、連日、創傷面積を測定することでin vivoの創傷治癒の過程を定量化する。また、新生児マウスの皮膚から初代培養ケラチノサイト培養し、スクラッチアッセイを行う事で、in vitroでの創傷治癒も観察する。その際、NSAIDs、BLT2遺伝子欠損、BLT2リガンドである12-HHT、BLT2阻害剤などの効果を検証する。ケラチノサイト株HaCaTにBLT2遺伝子を導入し、表現型を観察する。

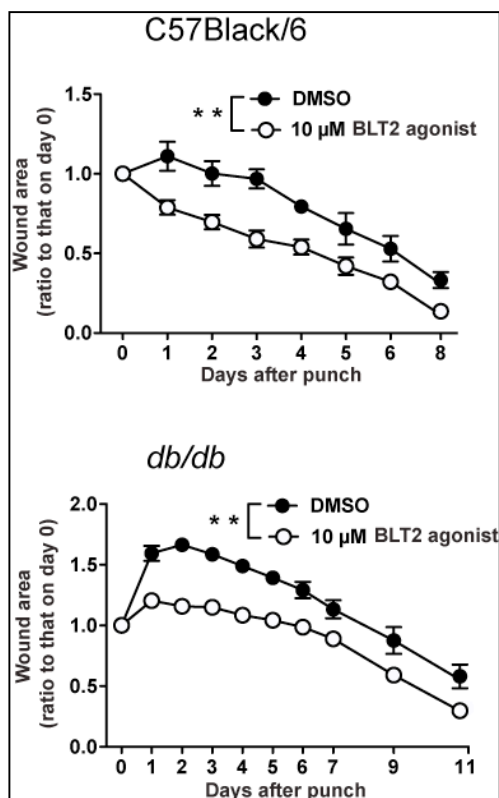
2)腸管上皮におけるBLT2の役割：マウスにデキストラン硫酸塩(DSS)を飲水から投与し、引き起こされる大腸炎の重症度を判定する。タイトジャンクション(TJ)研究に用いられるMDCK細胞にBLT2遺伝子を導入し、TJ形成やバリア機能におけるBLT2発現の影響を観察する。

3)ゼブラフィッシュBLT群の解析：遺伝子相同性を利用してゼブラフィッシュBLT遺伝子を単離、配列決定を行う。モルフォリノオリゴを用いて発生期にBLT1,2の発現を抑制した際の発生に与える影響を判定する。

4)孤児受容体のリガンド同定：孤児受容体の発現ベクターライブラリをさらに拡大し、生体材料からリガンドを精製・構造決定する。受容体の活性化を高感度で検出する実験系を構築する。

4. 研究成果

1)皮膚創傷治癒におけるBLT2の役割：BLT2欠損マウスの背部の皮膚に径3mmのパンチを行い、創傷治癒モデルを作製した。BLT2欠損マウスでは、野性型マウス、コントロールに用いたBLT1欠損マウスと比較して、創傷治癒が有意に遅延した。野性型マウスにNSAIDsであるアスピリンを投与すると、皮膚創傷治癒が遅延するが、この遅延がBLT2欠損マウスでは観察されなかった。全てのプロスタノイド受容体欠損マウスを用いて同様の実験を行ったが、創傷治癒の遅延を示すマウスは存在しなかったことから、NSAIDsによる皮膚創傷治癒の遅延は、COX代謝物である12-HHTの産生低下によるものであることが分かった。以下、そのメカニズムについて検討を行ったところ、BLT2がケラチノサイトに発現し、12-HHT刺激によって活性化されるNF- κ Bを通じて、TNF α 、メタロプロテイナーゼの発現を上昇させることで、細胞遊走を促進して創傷治癒を速めていることが分かった。BLT2アゴニストCP10583はin vitro、in vivoの両方で創傷治癒を促進し、特に糖尿病マウスdb/dbでその効果が顕著であった(図)ことから、難治性皮膚潰瘍の新規治



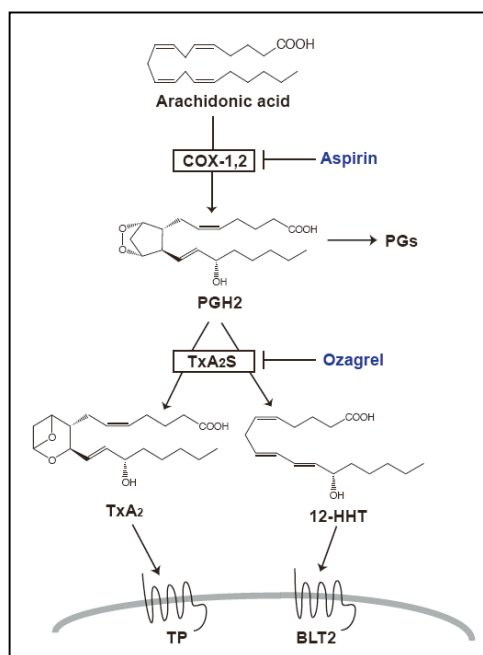
療薬として期待される(2014 *J Exp Med*).

2)腸管上皮における BLT2 の役割: BLT2 欠損マウスは、野性型マウスでは異常を来さない濃度である 1%のデキストラン硫酸塩(DSS)の飲水によって、重篤な大腸炎を引き起こした。BLT2 遺伝子を導入したモデル細胞 MDCK を用いた実験では、BLT2 過剰発現 MDCK 細胞では、培養細胞シート間の電気抵抗値(TER)が上昇すると共に、シート上に添加した FITC デキストランのシート下層への漏れ込みが減少した。異常のことから、BLT2 は何らかの機序で腸管上皮細胞のバリア機能を亢進させることで、腸内細菌の侵入を防いでいることが分かった(2010 *FASEB J*)。そこで、MDCK 細胞を用いてさらに詳細な検討を行った。MDCK 細胞培養系から一旦細胞外カルシウムを除去しタイトジャンクションを崩壊させた後にカルシウムを再添加し、タイトジャンクションを再構築させるカルシウムスイッチ法を樹立し、BLT2 発現、BLT2 刺激によってもたらされる変化を観察した。カルシウムスイッチ、あるいは、12-HHT による BLT2 刺激によって、TJ 形成に関わる接着因子の遺伝子発現が上昇することを見いだした。一連の接着因子の強制発現は、TER を上昇させ、siRNA による接着因子のノックダウンによって、TER は大きく減少した。阻害剤を用いた実験から、12-HHT/BLT2 軸は、百日咳毒素感受性の Gi タンパク質、p38 MAP キナーゼの活性化を介して、これらの接着因子の遺伝子発現を上昇させ、上皮のバリア機

能を亢進させていることが明らかとなった。BLT2 欠損マウスでは、皮膚のバリア機能も減弱しており、反復抗原感作によって Th2 免疫応答が亢進し、抗原に対する抗体価が上昇していることも分かり、BLT2 が様々な外界に面する臓器の上皮細胞においてバリア機能の維持に重要な分子であることを見いだした。(論文投稿中)

3)ゼブラフィッシュ BLT 群の解析:ゼブラフィッシュゲノムには、BLT1 遺伝子が1つと、BLT2 遺伝子が2つ存在した。哺乳動物の BLT とゼブラフィッシュの BLT の間のアミノ酸同一性は約 35%と高くは無かったが、両者ともに哺乳動物 BLT1, 2 と同様のリガンド特異性を示した。In situ hybridization による発現部位解析では、BLT1、BLT2 共に、血球細胞での発現が確認された。モルフォリノオリゴを用いたゼブラフィッシュ BLT1, 2 の発現抑制によって、ゼブラフィッシュ胚からの発生が停止したことから、BLT1,2 はゼブラフィッシュの発生に必須の遺伝子であることが分かった(2015 *PLoS One*)。

4)12-HHT 産生経路の解析:ヒトとマウスの血液、血小板を用いて、12-HHT の産生経路を検証した。ヒト、マウスの血液凝固に伴って大量の(約 200~600 nM)の 12-HHT が産生されたが、NSAIDs あるいはヘパリンの共存下では、12-HHT の産生は観察されなかった。一方、これまで想定されてきたトロンボキサン合成酵素への依存性を検討した。トロンボキサン合成酵素阻害剤オザグレルは、血液凝固に伴う 12-HHT 産生を抑制したが、その抑制は約 50%にとどまった。トロンボキサン合成酵素欠損マウスの血液凝固に伴う 12-HHT



産生も、野性型マウスと比較して減少したものの、完全には抑制されず、トロンボキサン合成酵素に依存しない 12-HHT の産生経路が存在することが明らかになった。この PGH2 から 12-HHT への変換には酵素は不要で、おそらくヘム依存性の変換であることが示唆された。トロンボキサン合成酵素阻害剤オザグレル投与、あるいは、トロンボキサン合成酵素欠損マウスの血液凝固では、通常は観察されない PGE2 や PGD2 の産生が観察された。これはトロンボキサン合成酵素阻害剤やトロンボキサン合成酵素欠損によって余剰となった PGH2 がシヤンティングによって PGE2 や PGD2 へと変換されたものと推定され、頭痛や発熱といった、トロンボキサン合成酵素オザグレルの副作用の発現機序と考えられた(*J Lipid Res* 2013)。

5)孤児受容体のリガンド同定:約 40 種類の受容体遺伝子発現ベクターを作成し、ライブラリに追加した。「脂質マシナリー」班員の青木淳賢教授の研究室で開発された TGF α 切断アッセイを導入し、スクリーニングを行ったところ、一つの受容体に対する小分子リガンドの同定に成功した。(研究継続中)

6)その他:BLT1 が関与すると考えられた疾患について疾患モデルを作製し、BLT1 欠損マウスの表現型を観察した。多発性硬化症のモデルとされる実験的アレルギー性脳脊髄炎モデル(EAE モデル)において、BLT1 欠損マウスは大きく減弱した表現型を示した。脊髄の染色によって、BLT1 欠損マウスの病変部位では、活性化好中球、活性化マクロファージ、ヘルパーT 細胞のいずれの浸潤も低下していたことから、BLT1 はこれらの炎症細胞を活性化し、脊髄に浸潤させることで、EAE を悪化させていることが示された。従って、BLT1 拮抗薬は多発性硬化症の新規治療薬として期待される(*BBRC* 2010)。BLT1 は好中球やマクロファージの異物貪食を促進することが知られていたが、その細胞内シグナル伝達は明らかでは無かった。骨髄細胞を GM-CSF 存在下で培養することで得られたマクロファージ(BMDM)に FITC-Zymozan を添加し、蛍光顕微鏡で観察することで、マクロファージの貪食能を定量化する系を樹立した。LTB4 刺激は、IgG でコーティングしたオプソニン化 Zymozan の貪食を促進した。種々の阻害剤を用いた検討から、LTB4 刺激による貪食能の亢進はチロシンキナーゼ阻害剤 PP2 や、PI3Kinase 阻害剤、Rac 阻害剤で抑制された。LTB4 刺激は Fyn や Lyn のチロシンリン酸化を促進しなかったが、Rac の活性化を引き起こしたことから、Rac の上流でチロシンリン酸化経路とクロストークしていることが示唆

された。そこで、Fc γ 受容体のシグナル伝達を欠損した common γ 鎖を欠損したマウスから BMDM を作製し、恒常的活性化型 Rac をレトロウイルスで戻す系を用いて解析を行った。興味深いことに、Fc γ 受容体シグナルの欠損下でも、LTB4/BLT1 刺激で Rac が活性化されるだけでオプソニン化 Zymozan の貪食は亢進した。以上より、LTB4/BLT1 刺激は PI3Kinase と Rac の活性化のステップで Fc γ 受容体シグナルとクロストークし、異物貪食を促進していることが明らかとなった(*JBC* 2010)。LTB4/BLT1 は主として好中球の浸潤と組織障害を通じて、脊髄損傷(*J. Neurochem* 2013)、肝虚血再灌流障害(*FASEB J* 2013)、などを悪化させていることをあきらかにし、BLT1 拮抗薬の新規治療標的として期待される。また、BLT2 が Th2 細胞からの Th2 サイトカイン産生を抑制することで、気管支喘息の発症に抑制的に関与していることも見いだした(*Faseb J* 2013)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 49 件中、5 件を記載)

1. Okuno T, Ishitani T, Yokomizo T. Biochemical Characterization of Three BLT Receptors in Zebrafish. *PLoS One* 10, e0117888, (2015), 10.1371/journal.pone.0117888, 査読有
2. Liu M, Saeki K, Matsunobu T, Okuno T, (7 名), Yokomizo T. 12-hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J Exp Med* 211, 1063-1078, (2014), 10.1084/jem.20132063, 査読有
3. Matsunobu T, Okuno T, Yokoyama C, Yokomizo T. Thromboxane A synthase-independent production of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid, a BLT2 ligand. *J Lipid Res* 54, 2979-2987, (2013), 10.1194/jlr.M037754, 査読有
4. Aratake Y, Okuno T, Matsunobu T, Saeki K, Takayanagi R, Furuya S, Yokomizo T. Helix 8 of leukotriene B4 receptor 1 inhibits ligand-induced internalization. *FASEB J* 26, 4068-4078, (2012), 10.1096/fj.12-212050, 査読有
5. Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, Yamasaki S, Yokomizo T. Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 285, 41113-41121, (2010), 10.1074/jbc.M110.175497, 査読有

[学会発表] (計 130 件中 5 件を記載)

1. Yokomizo T. Distinct roles of two leukotriene B4 receptors. 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (Symposium), 2015/2/10-12, 2015, Tokyo
2. 横溝岳彦. 生理活性脂質と免疫・炎症・組織修復. 第35回日本炎症・再生学会(教育講演), 2014年7月1-4日, 2014, 沖縄
3. Yokomizo T. Receptors for leukotriene B4. Lipid mediators in health and disease - a tribute to Bengt Samuelsson, 2014/8/27-29, 2014, Stockholm
4. Yokomizo T. Leukotriene B4 receptors: BLT1 and BLT2. Faseb SRC: Lysophospholipid and Other Related Mediators-From Bench to Clinic, 2013/8/4-9, 2013, Niseko
5. 横溝岳彦. ロイコトリエン受容体と新規生理活性脂質12-HHT. 千里ライフサイエンスセミナー D5 脂質メディエーターと疾患, 2012年11月15日, 2012, 大阪

〔図書〕(計2件)

1. 横溝岳彦, 青木淳賢, 杉本幸彦, 村上誠: 最新生理活性脂質研究, 遺伝子医学MOOK24, 304 ページ, 2013、メディカルドゥ社
2. Yokomizo T and Murakami M: Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols. 印刷中 Springer 社

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 加齢黄斑変性症予防治療剤
 発明者: 佐々木文之、横溝岳彦
 権利者: 学校法人順天堂
 種類: 特許権
 番号: 特願 2014-228828
 出願年月日: 2014-11-11
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
 順天堂大学生化学第一講座 HP
http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/

脂質マシナリーHP
<http://plaza.umin.ac.jp/lipids/>

BLT2 と皮膚創傷に関するプレスリリース
http://www.eurekalert.org/pub_releases/2014-05/rup-uae050714.php

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/pdf/news08.pdf>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
 横溝 岳彦 (YOKOMIZO, Takehiko)
 順天堂大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号: 60302840
- (2) 研究分担者
 佐伯 和子 (SAEKI, Kazuko)
 順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号: 00553273
- (3) 連携研究者
 奥野 利明 (OKUNO, Toshiaki)
 順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号: 60361466