

令和元年6月15日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08316

研究課題名(和文)生理活性脂質受容体の上皮バリア機能における役割

研究課題名(英文)Protective roles of BLT2 receptor in epithelial barrier function

研究代表者

佐伯 和子 (Saeki, Kazuko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00553273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BLT2の上皮バリア機能における役割を調べた。アトピー性皮膚炎モデル：BLT2欠損マウスでは、経皮水分蒸散が亢進し、経皮的免疫応答が亢進した。BLT2は、G_iタンパク質-p38 MAPK依存的にクロロディン4の発現を上昇させ、上皮バリア機能を亢進させた。急性肺障害モデル：BLT2欠損マウスは、肺炎球菌毒素ニューモライシン(PLY)に対して感受性が高く急性致死となる。BLT2欠損マウスでは、システニルロイコトリエン依存的に気道抵抗値・血管透過性が上昇していた。12-HHT産生を阻害するNSAIDsもまたPLYによる致死率を上昇させた。CysLT1受容体拮抗薬の投与はこれらの個体死を回避させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)は世界中で広く使用されているものの、効能や副作用の発現メカニズムについては不明な点が多い。NSAIDsがシクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害することで多数の生理活性脂質の産生が同時に抑制される為である。本研究において、BLT2欠損マウスで観察されたPLY依存性の個体死が、野性型マウスへのNSAIDs投与でも観察されたことから、NSAIDsが肺炎致死の増悪因子となることを示した。更にこの個体死がCysLT1受容体拮抗薬の前投与で回避できたことから、気管支喘息治療薬として認可されているCysLT1受容体拮抗薬が肺炎球菌による肺炎治療へ応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the roles of BLT2 in epithelial barrier function, we used atopic dermatitis model and acute lung injury model.

Atopic dermatitis model: BLT2-deficient mice exhibited higher transepidermal water loss and were more sensitive to epicutaneous sensitization. Our data using BLT2-overexpressing cells and primary keratinocytes showed that 12-HHT/BLT2 enhances epithelial barrier function by increasing CLDN4 expression via the G_i protein-p38 MAPK pathway. Acute lung injury model: Intratracheal injection of PLY caused lethal acute lung injury in BLT2-deficient mice, with evident vascular leakage and bronchoconstriction. Large amounts of cysteinyl leukotrienes were detected in PLY-treated lungs. PLY-dependent vascular leakage, bronchoconstriction, and death were markedly ameliorated by treatment with a CysLT1 antagonist. Treatment of mice with NSAIDs inhibited the production of 12-HHT and increased the sensitivity toward PLY, which was also ameliorated by the CysLT1 antagonist.

研究分野：脂質生化学

キーワード：上皮細胞 バリア機能 生理活性脂質 細胞間接着

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

BLT2は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体であり、皮膚・腸管・角膜などの上皮細胞に高発現する。当研究室でBLT2のリガンド探索を行った結果、アラキドン酸からCOX依存的に産生される炭素数17の不飽和脂肪酸である12-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸(12-HHT)がBLT2の高親和性リガンドとして作用することをつきとめた。申請者は、12-HHTが血液凝固の際に血小板で大量に産生されること、BLT2が腸管上皮や皮膚の表皮に発現していることに着目し、12-HHT/BLT2シグナルが腸管炎症や皮膚の創傷治癒に関与している可能性を想定し、解析を行ってきた。その結果、BLT2がDSS誘導性大腸炎を抑制すること(Iizuka, *FASEB J*, 2010)、12-HHT/BLT2シグナルが皮膚表皮角化細胞の移動を亢進して創傷治癒を促進することを明らかにした(Liu, *J Exp Med*, 2014)。

2. 研究の目的

近年、生活環境の変化からアトピー性皮膚炎の発症は増加傾向にあるが、発症には皮膚表皮のバリア機能が深く関与している。肺もまた外界と接する臓器であり、気管支や肺胞の上皮細胞は外来微生物や外来抗原の侵入を防ぐバリア的役割を果たしている。本研究では、BLT2欠損マウスを用いて、(1)アトピー性皮膚炎モデル、(2)急性肺障害モデルを作成し、皮膚・肺の上皮バリア機能におけるBLT2の役割を明らかにするとともに、上皮バリア維持による疾患発症の抑制効果について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アトピー性皮膚炎モデル

MDCK細胞はイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株であり、単層培養をするとタイトジャンクションを形成することから、上皮細胞の細胞間接着の機能解析に汎用される。我々は、BLT2を過剰発現させたMDCK細胞を樹立して、12-HHTの添加やBLT2の発現が細胞間接着に与える影響を解析した。細胞間接着の評価方法として、トランスウェル上に単層培養した細胞のapical側とbasal側の間の電気抵抗値(TER)を測定する方法、apical側にFITCデキストランを添加してbasal側に漏出する量を測定する方法を用いた。TERの測定には、Millicell-ERS 2V ohmmeterを用いた。

BLT2の皮膚バリア機能における役割を調べる目的で、野性型およびBLT2欠損マウスの経皮水分蒸散量の比較を行った。バリカンを用いてマウス腹を剃毛し、Derma Unit SSC3およびTewameter TM300プローブを用いて、水分蒸散量を測定した。腹側3カ所を測定し、平均値をその個体の経皮水分蒸散量として解析に用いた。

経皮的免疫に対する応答性を比較する目的で、剃毛した野性型およびBLT2欠損マウスの背中皮膚に卵白アルブミン(OVA)を含ませたパッチテスターを2日間貼付し、1日外すというサイクルを計5回行った。5サイクル終了後、静脈採血を行い、血中に含まれるOVA特異的抗体価をELISA法にて測定した。

BLT2発現MDCK細胞を用いてDNAマイクロアレイ解析(GeneChip Canine Gene 1.0 ST Array)を行い、12-HHT刺激により発現が変動する分子を網羅的に解析した。

内因性BLT2の役割を調べる目的で、マウスおよびヒトの初代培養角化細胞を用いた解析を行った。マウス初代培養角化細胞は、既報(Lichti *Nat Protoc*, 2008)に従って野性型およびBLT2欠損新生仔マウスより単離し、CnT-PR培地を用いて培養した。90%コンフルエントでCnT-PR-D培地に交換し、24時間分化誘導を行った。ヒト角化細胞はLonzaから購入し、KBM-Gold singleQuotsを添加したKBM-Gold培地を用いて培養した。80%コンフルエントの時点で1.2 mM塩化カルシウムを添加すると同時に200 nM 12-HHTを添加し、12-HHT/BLT2の細胞間接着分子発現に与える影響を調べた。

(2) 急性肺障害モデル

野性型およびBLT2欠損マウスを用いて、50 ngのPLYを気道内に投与し、3日間の生存曲線を作成した。PLY投与後のマウス気道抵抗値の変化は、FlexiVentを用いて5分ごと60分間測定した。また、肺の血管透過性は、Evans blueをあらかじめ静脈内に投与したマウスに、PLYを気道内投与し(10分間)、還流により血管内のEvans blueを洗浄・除去したのち肺組織内に残存するEvans blueの量で評価した。

PLY気道内投与後10分間に肺内で産生されるエイコサノイドを調べる目的で、1 mlのPBS/EDTAで肺胞を洗浄し、Oasis HLB cartridgeを用いて前処理をした後、LC-MS/MS(Prominence HPLC system, Shimadzu; TSQ Quantum Ultra triple-stage quadrupole mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific)を用いてエイコサノイドの一斉定量を行った。

NSAIDs の PLY 依存的なマウス個体死に与える影響を調べる目的で、0.18 mg/ml アスピリンまたは 30 µg/ml ロキソプロフェンを含む飲料水を野性型マウスに 1 週間投与し、その後 PLY を気道内投与した。CysLT1 拮抗薬の効果調べる目的で、モンテルカストを 1%メチルセルロースと混合し、PLY 気道内投与の 1 日前および 4 時間前に、5 mg/kg BW になるように計 2 回経口投与した。

4. 研究成果

(1) アトピー性皮膚炎モデル

BLT2 の過剰発現により、MDCK 細胞の TER が上昇し(図 1A)、FITC デキストランの漏出が低下したことから(図 1B)、BLT2 は細胞間接着能を亢進させることが示唆された。

そこで、BLT2 の皮膚バリア機能における役割を調べる目的で、野性型および BLT2 欠損マウスの経皮水分蒸散量を比較したところ、BLT2 欠損マウスでは水分蒸散が亢進していることが明らかとなった(図 1C)。また、OVA の経皮的反復投与による抗原特異的抗体の産生を調べたところ、BLT2 欠損マウスでは血清中の抗体価が上昇しており(図 1D)、Th2 サイトカインの産生も亢進していた。一方、腹腔内に OVA を投与する方法では、抗原特異的抗体産生や Th2 サイトカインの産生に違いは見られなかった。以上のことから、BLT2 欠損マウスでは皮膚バリア機能が低下している可能性が示唆された。

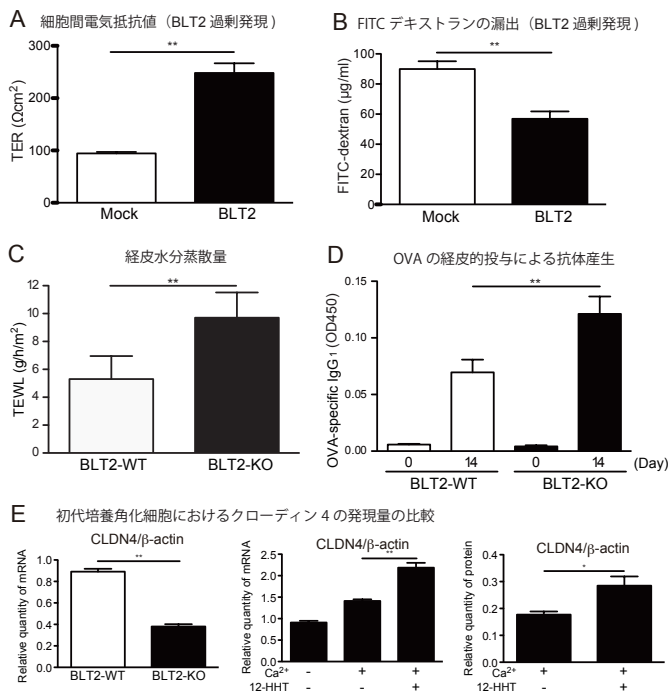


図 1：皮膚バリア機能における BLT2 の役割

次に、BLT2 を過剰発現させた MDCK 細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、12-HHT 刺激依存的に CLDN4・MLLT4・DSG3 をはじめとする細胞間接着因子群の発現が上昇することが明らかとなった。そこで、初代培養角化細胞を用いて、内因性 BLT2 がこれらの遺伝子発現に与える影響を調べた。BLT2 欠損マウスの角化細胞では、CLDN4 の発現が低下しており(図 1E 左)、ヒト初代培養角化細胞において 12-HHT 依存的に CLDN4 の mRNA(図 1E 中)とタンパク質(図 1E 右)の発現が上昇することが明らかとなった。更に阻害剤を用いた解析から、12-HHT 刺激による CLDN4 の発現上昇には Gαi タンパク質および p38 MAPK の活性化が必須であることも明らかとなった。

以上の研究結果は雑誌論文の⑤で報告した。

(2) 急性肺障害モデル

野性型マウスが死亡しない低容量の PLY を BLT2 欠損マウスに気道内投与したところ、ほとんどの個体が 30 分以内に死亡した。PLY 投与による BLT2 欠損マウスの死因を明らかにする目的で、肺の組織学的解析を行ったところ、BLT2 欠損マウスでは PLY 投与に伴う気管支の収縮像が観察された。そこで、PLY 投与後の気道抵抗値の変化を経時的に測定したところ、BLT2 欠損マウスでのみ気道抵抗値が上昇する様子が観察された(図 2A)。また、BLT2 欠損マウスでは PLY 投与により血管透過性が亢進することも明らかとなり(図 2B)、重度の喘息様症状を起こして死亡している可能性が示唆された。

これらの現象を引き起こしている原因分子を突止める目的で、肺胞洗浄液中に含まれるエイコサノイドを質量分析計にて一斉定量したところ、PLY 投与後すぐに野性型および BLT2 欠損マウス肺で大量のシステニルロイコトリエン類(cysLTs)が産生されていることが明らかとなった。そこで、CysLT1 拮抗薬の前投与を行ったところ、野性型と BLT2 欠損の両マウスで PLY 依存的な気道抵抗値の上昇(図 2A)および血管外漏出が完全に消失し(図 2B)、BLT2 欠損マウスの致死率も改善された(図 2C)。

次に、NSAIDs 投与による 12-HHT 産生阻害が PLY 依存的個体死に与える影響を調べた。ア

スピリンおよびロキソプロフェンを1週間前から投与していた野性型マウスでは、PLY 依存的な致死が増悪し、この個体死は CysLT1 拮抗薬を前投与することで回避できた (図 2D)。

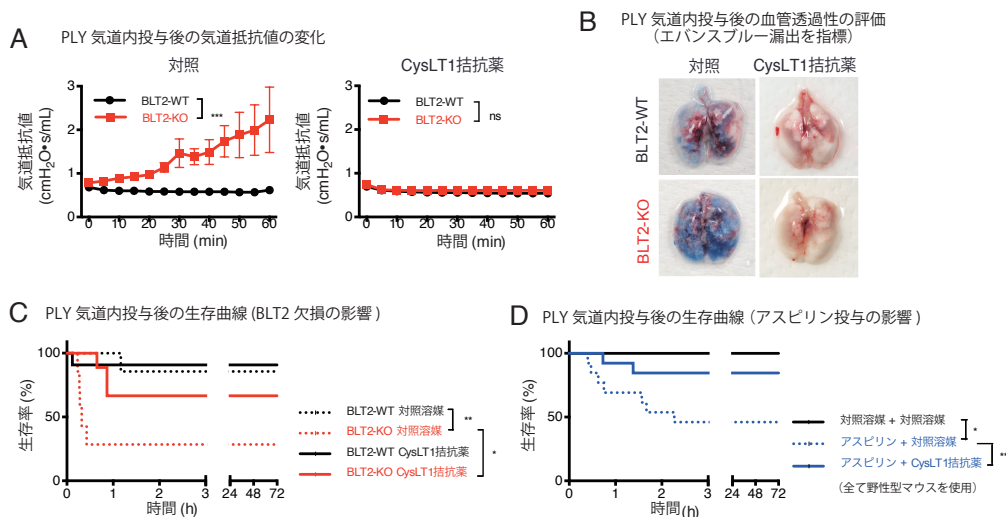


図 2: PLY による急性肺障害における BLT2 の役割

また、マウス肺血管内皮細胞やヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた解析から、12-HHT/BLT2 シグナルを抑制すると CysLT1 受容体の発現量が上昇し、cysLT 刺激による血管透過性上昇が亢進することを明らかにした。以上の結果から、BLT2 シグナルが CysLT1 受容体の発現量を抑制することで cysLTs への感受性を低下させ、PLY による個体死を回避させているものと考えられる。

以上の研究結果は雑誌論文の④で報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Sasaki F, Koga T, Ohba M, Saeki K, Okuno T, Ishikawa K, Nakama T, Nakao S, Yoshida S, Ishibashi T, Ahmadieh H, Kanavi MR, Hafezi-Moghadam A, Penninger JM, Sonoda KH, Yokomizo T.
Leukotriene B4 promotes neovascularization and macrophage recruitment in murine wet-type AMD models.
JCI Insight 3(18) (2018) pii: 96902. doi: 10.1172/jci.insight.96902.
- ② Ohba M, Saeki K*, Koga T, Okuno T, Kobayashi Y, Yokomizo T.
Profiling of bioactive lipids in different dendritic cell subsets using an improved multiplex quantitative LC-MS/MS method.
Biochem Biophys Res Commun 504(3):562-568 (2018) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.026.
- ③ Saeki K, Yokomizo T.
Identification, signaling, and functions of LTB4 receptors.
Semin Immunol 33, 30-36 (2017) doi: 10.1016/j.smim.2017.07.010.
- ④ Shigematsu M, Koga T, Ishimori A, Saeki K, Ishii Y, Taketomi Y, Ohba M, Jo-Watanabe A, Okuno T, Harada N, Harayama T, Shindou H, Li JD, Murakami M, Hoka S, Yokomizo T.
Leukotriene B4 receptor type 2 protects against pneumolysin-dependent acute lung injury.
Sci Rep 6:34560 (2016) doi: 10.1038/srep34560.
- ⑤ Ishii Y, Saeki K*, Liu M, Sasaki F, Koga T, Kitajima K, Meno C, Okuno T, Yokomizo T.
Leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) enhances skin barrier function by regulating tight junction proteins.
FASEB J 30(2), 933-947 (2016) doi: 10.1096/fj.15-279653.

〔学会発表〕（計 25 件）

- ① 佐伯和子, 重松美沙子, 古賀友紹, 奥野利明, 横溝岳彦
生理活性脂質 12-HHT の BLT2 受容体を介した生体保護的役割
第 91 回日本生化学会 シンポジウム, 2018 年 9 月 24-26 日 京都
- ② Saeki K, Shigematsu M, Koga T, Ohba M, Okuno T, Yokomizo T
12-HHT/BLT2 axis protects against pneumolysin-dependent acute lung injury.
Keystone Symposia Conference, Integrating Metabolism and Immunity, 2017/5/29-6/2
Dublin, Ireland
- ③ 佐伯和子, 石井由美子, 横溝岳彦
上皮バリア機能維持における 12-HHT 受容体 BLT2 の役割
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会 ワークショップ,
2015 年 12 月 1-4 日 神戸
- ④ Saeki K, Liu M, Yokomizo T
Platelet-derived lipid mediator, 12-HHT promotes epidermal wound healing by
accelerating keratinocyte migration *via* the BLT2 receptor.
The 37th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis,
2015/5/21-23 山梨 招待講演 (シンポジウム)

〔図書〕（計 4 件）

- ① 古賀友紹, 佐伯和子, 横溝岳彦
生理活性脂質ロイコトリエン B4 とその受容体による免疫調節機構
臨床免疫・アレルギー科 Vol.70 pp209-215, 2018
- ② 石井由美子, 劉珉, 佐伯和子, 横溝岳彦
皮膚保護作用を有する脂質メディエーター12-HHT
臨床免疫・アレルギー科 Vol.67 No.1 pp106-114, 2017
- ③ 佐伯和子, 劉珉, 横溝岳彦
血小板由来の脂質メディエーター12-HHT は角化細胞の移動を亢進させ皮膚創傷治癒を促
進する
日本血栓止血学会誌, Vol.26 No.6 pp611-618, 2015
- ④ 佐伯和子, 劉珉, 横溝岳彦
12-HHT-皮膚創傷治癒に働く新しい COX 代謝物
医学のあゆみ Vol.254 pp1121-1125, 2015

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/

6. 研究組織

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。