

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19032

研究課題名(和文)ロイコトリエンB4受容体BLT1の樹状細胞および好中球における免疫調節機構

研究課題名(英文)Elucidation of leukotriene B4 receptor 1, BLT1-dependent immune response by dendritic cells and neutrophils

研究代表者

古賀 友紹(KOGA, TOMOAKI)

熊本大学・大学院先導機構・助教

研究者番号：30615092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生理活性脂質LTB4と免疫応答の関わりを明らかにし、その受容体BLT1を免疫疾患の新たな創薬標的として提起することを目的として研究を行った。その結果、BLT1の新規結合分子としてRAGEを同定することができた。RAGEは糖尿病やアテローム性動脈硬化、アルツハイマー病など、様々な慢性炎症疾患と関わりがあり、また、RAGEは、加齢依存的に発現上昇することが報告されており、加齢依存的にBLT1シグナルが増強される可能性も考えられる。RAGEを阻害することでLTB4-BLT1経路を抑制することができれば、炎症部位への遊走などを止められる可能性があり、新規の創薬標的となりうるだろう。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of LTB4-BLT1 axis in neutrophils and dendritic cells. We found that BLT1 interacts with receptor for advanced glycation end products (RAGE), which is important receptor for the regulation of various chronic inflammatory diseases including diabetes, atherosclerosis, Alzheimer's diseases and etc. We also showed that RAGE enhances LTB4-BLT1-dependent neutrophil migration in vitro and in vivo through the activation of MEK-ERK signaling pathway. RAGE is known to be up-regulated by aging, so it might be possible that BLT1 signaling is exaggerated by aging through RAGE induction in vivo. If we can inhibit RAGE, we might also inhibit LTB4-BLT1 signaling, and subsequent infiltration of neutrophils into inflammatory area. We therefore propose RAGE as a novel therapeutic target for various inflammatory diseases by targeting LTB4-BLT1 signaling.

研究分野：脂質免疫学

キーワード：生理活性脂質 好中球 樹状細胞 GPCR ロイコトリエンB4 BLT1

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、 $LTB_4$  の高親和性受容体である BLT1 を世界に先駆けて遺伝子同定し (Yokomizo, *Nature* 1997)、その遺伝子欠損マウスの表現型解析を行ってきた。その結果、BLT1 欠損マウスでは、Th1、Th2、Th17 応答の全てが減弱するという興味深い知見を得た (Toda, *Biochimie*, 2010, Terawaki, *J Immunol*, 2005, Kihara, *BBRC*, 2009)。また BLT1 が、リンパ球に発現し免疫反応を制御するという知見も報告され (Tager, *Nat Immunol*, 2003)、 $LTB_4$ -BLT1 経路の免疫応答における役割が注目されている。

申請者は独自に樹立した抗マウス BLT1 単クローン抗体を用いて、DC における BLT1 の解析を行ってきた。その結果、BLT1 の発現量が異なる DC サブセット (BLT1<sup>hi</sup> DC、BLT1<sup>lo</sup> DC) を見出した (図 1)。

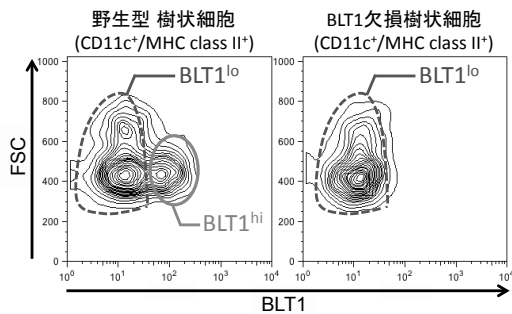


図1. 脾臓にはBLT1<sup>hi</sup>とBLT1<sup>lo</sup> DCが存在する  
CD11c、MHC class II両陽性で示されるDC集団にBLT1<sup>hi</sup> DCとBLT1<sup>lo</sup> DCが認められる。

これらの DC サブセットは、TLR9 リガンドに対するサイトカイン産生能、細胞内シグナル伝達経路、TLR9 の細胞内局在の点で異なっていた。TLR9 には endosome 型と endolysosome 型が存在し、どちらのタイプであるかによって下流の経路を変えることが報告されている (Ewald, *Nature*, 2008)。このような背景から申請者は、「 $LTB_4$ -BLT1 経路が DC において TLR9 の細胞内局在を変動させ、下流のシグナル伝達経路のスイッチングを行う」と考えた (図 2, 仮説 1)。

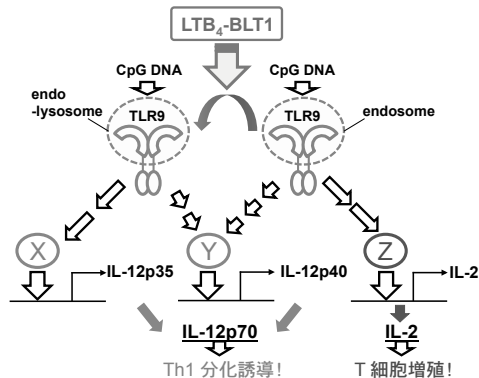


図2.  $LTB_4$ -BLT1 経路は TLR9 の細胞内局在を動かす DC において  $LTB_4$ -BLT1 経路は、TLR9 の細胞内局在を変化させ、下流のシグナル伝達経路および産生するサイトカインの種類を変える。

一方で古くから炎症細胞として知られてきた好中球は、近年の報告により免疫応答の

重要な調節細胞として考えられるようになってきた。好中球は、①ケモカインを産生し、T 細胞遊走を促進すること、②DC が取り込むべき抗原を貪食することで免疫抑制に働くこと、③Neutrophil Extracellular Traps (NETs) を放出することで、DC の TLR9 を活性化することが報告されている (Mantovani, *Nat Rev Immunol*, 2011)。BLT1 は好中球に発現し、遊走、活性化に関わることが知られているが (Lammermann, *Nature*, 2013)、好中球を介した免疫応答における  $LTB_4$ -BLT1 経路の役割についてはほとんどわかっていない。そこで申請者は、「 $LTB_4$ -BLT1 経路は好中球由来 NETs が DC の TLR9 を活性化するのに関与し、好中球を介した免疫応答制御に関与する」と考えた (図 3, 仮説 2)。

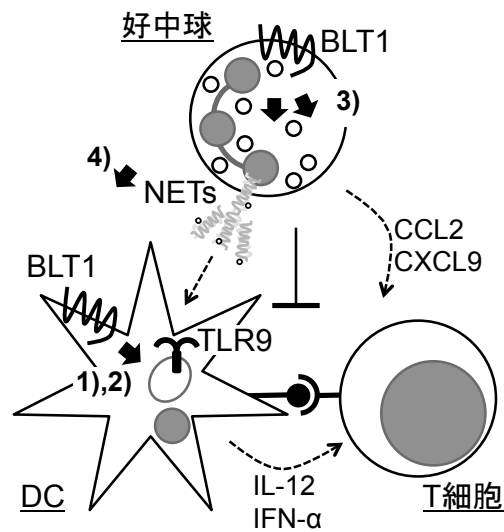


図3. 本研究の概略図

- 1.) & 2.)  $LTB_4$ -BLT1 経路は、DC において TLR9 の細胞内局在を変動させる。
- 3.)  $LTB_4$ -BLT1 経路は、好中球においてケモカイン (CCL2、CXCL9) の産生を促進し、Neutrophil Extracellular Traps (NETs) の放出を促進する。
- 4.)  $LTB_4$ -BLT1 経路は、好中球による NETs 放出を促進し、DC の TLR9 を刺激し、サイトカイン (IL-12、IFN- $\alpha$ ) の産生を誘導する。

2. 研究の目的

生理活性脂質ロイコトリエン  $B_4$  ( $LTB_4$ ) の高親和性受容体 BLT1 は、好中球やマクロファージに発現し、炎症反応惹起に重要であることが知られている。一方で BLT1 がエフェクター T リンパ球にも発現することが近年報告され、炎症反応だけでなく免疫応答における BLT1 の役割が注目されている。本研究では、①免疫応答の司令塔である「樹状細胞」と、②近年、免疫調節にも重要な働きをすることが示されている「好中球」に着目し、 $LTB_4$ -BLT1 経路の免疫反応における機能解析を行う。また、③「樹状細胞-好中球」の相互作用にも着目し解析する。本研究では、以上の研究を遂行する事により、生理活性脂質  $LTB_4$  と免疫応答の関わりを明らかにし、その

受容体 BLT1 を免疫疾患の新たな創薬標的として提起することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、1) 好中球における LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路の免疫調節機能に対する役割の解明 (*in vitro*, *in vivo*)、2) DC における LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路の TLR9 細胞内局在に与える影響の解析 (*in vitro*)、3) DC における LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路の TLR9 シグナルに与える影響の解析 (*in vivo*)、4) 好中球と DC の NETs-TLR9 経路を介した免疫応答制御機構における LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路の役割の解明 (*in vitro*, *in vivo*) を行う。

### 4. 研究成果

申請者は、免疫沈降によるスクリーニングを用いて、BLT1 の新規結合因子として終末糖化産物受容体 (RAGE) を見出した (図 4)。この際、BLT1 と同じく走化性 G タンパク質共役型受容体である CXCR4 は RAGE と相互作用しなかった (図 4C)。これは BLT1 が非 GPCR の受容体と結合することを初めて見出したものになる。

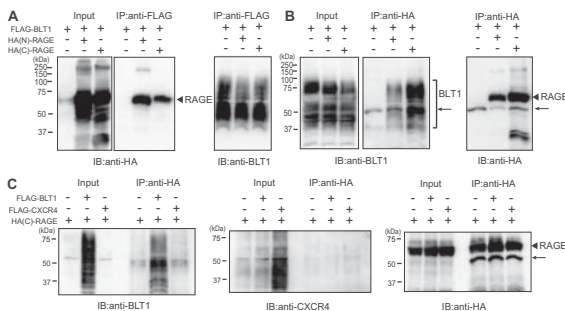
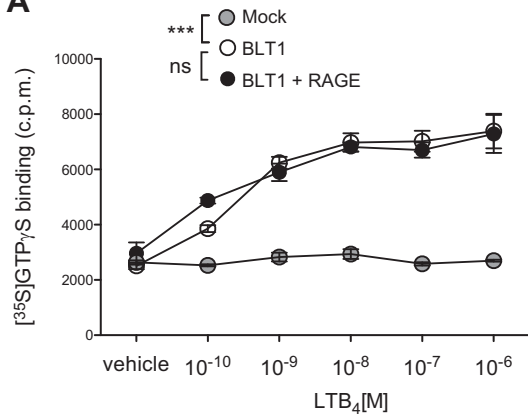


図 4. BLT1 は RAGE と相互作用する。A. FLAG-BLT1 を FLAG 抗体で免疫沈降し、HA-RAGE を HA 抗体で検出した。B. HA-RAGE を HA 抗体で免疫沈降し、FLAG-BLT1 を FLAG 抗体で検出した。C. HA-RAGE を HA 抗体で免疫沈降し、BLT1 と CXCR4 を検出した。

次にこれらの相互作用が、LTB<sub>4</sub> 依存的な GTPgammaS の結合および細胞内 Ca<sup>2+</sup>変動に影響を及ぼすか検証した。その結果、BLT1 過剰発現によって誘導された LTB<sub>4</sub> の容量依存的な GTPgammaS の結合および Ca<sup>2+</sup>動員は、RAGE をさらに過剰発現させても、全く影響されないことがわかった (図 5)。

さらに他のシグナル伝達経路への影響を検証するべく、LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路は MEK-ERK 経路に影響することが知られているため、MEK-ERK 経路に対する RAGE の影響を調べた。その結果、RAGE は、LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的な ERK の活性化を 2 分をピークとして増強することがわかった (図 6A)。さらにこれら RAGE 依存的な ERK の増強効果は、Gi 阻害タンパク質 PTX と Gq/11 阻害剤 YM-254890 によって、Gi よりもむしろ Gq/11 を介したものであることがわかった (図 6C, 6D)。一方、LTB<sub>4</sub>-BLT1 を介した Akt の活性化は、Gq/11 よりも Gi 依存的であった (図 6C, 6D)。

### A



### B

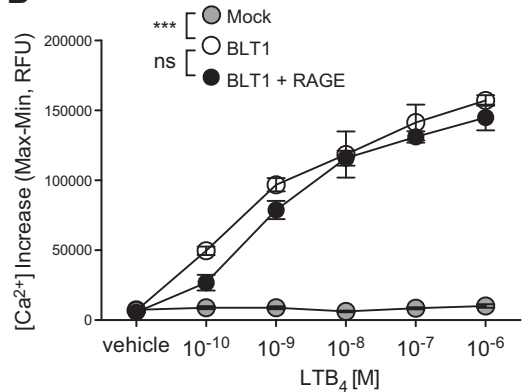


図 5. RAGE は BLT1 依存的な GTPgammaS の結合および細胞内 Ca<sup>2+</sup>動員に影響しない。A. LTB<sub>4</sub> の容量依存的な GTPgammaS の結合。RAGE 過剰発現の影響は見られない。B. LTB<sub>4</sub> の容量依存的な Ca<sup>2+</sup>動員。RAGE 過剰発現の影響は見られない。

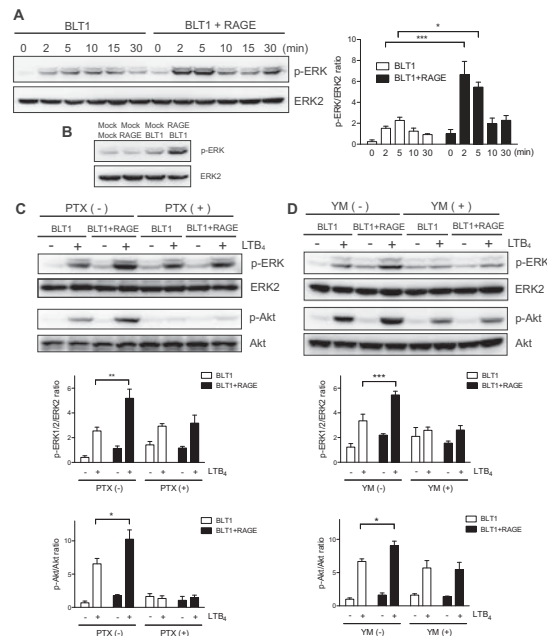


図 6. RAGE は BLT1 依存的な MEK-ERK 経路の活性化を増強する。A. LTB<sub>4</sub> による時間依存的な ERK のリン酸化。RAGE 過剰発現により増強されている。B. LTB<sub>4</sub> による ERK のリン酸化。RAGE 過剰発現により増強されるが、Gi 阻害薬 PTX により少しだけ抑制される。C. LTB<sub>4</sub> による ERK のリン酸化。RAGE 過剰発現により増強されるが、Gq/11 阻害剤である YM-254890 によりかなり抑制される。

次に LTB4 依存的な炎症性サイトカイン産生への RAGE の影響を検証した。その結果、RAGE は LTB4-BLT1 依存的な炎症性サイトカインの発現を特異的に抑制することがわかった (図 7A, 7B)。この時、NF-kappaB の活性は抑制されており、サイトカインの抑制は、NF-kappaB の抑制によるものと推察された (図 7C)。次にこれらの細胞を MEK 阻害剤 PD を加えることで、RAGE による ERK の増強が NF-kappaB および炎症性サイトカインの抑制に寄与するか検証した。その結果、PD よりこれらの現象はキャンセルされた (図 7D, 7E)。さらに、内因性の RAGE も同様の現象を引き起こすか、RAGE KO から好中球を単離し、炎症性サイトカインの発現を見て見たところ、LTB4 依存的なサイトカインの発現は増強されていた (図 7F)。また、RAGE の阻害タンパク質である soluble RAGE (sRAGE) を加えたところ、やはり LTB4 依存的な炎症性サイトカインの産生を特異的に増強した (図 7G, 7H)。これらの結果は、RAGE が LTB4-BLT1 依存的な炎症性サイトカインの産生を MEK-ERK の増強を介して抑制することを示唆するものである。

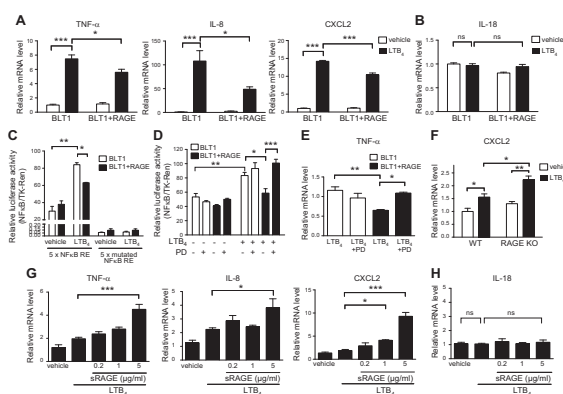


図 7. RAGE は BLT1 依存的な炎症性サイトカインの産生を抑制する。A. LTB4 による炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-8, CXCL2) の発現増強が RAGE 過剰発現によって抑制される。B. 炎症性サイトカインである IL-18 は LTB4 により発現誘導されず、RAGE 過剰発現による産生抑制も見られない。C. NF-kappaB プロモーターアッセイ。100 nM LTB4 を処理した 7 時間後の結果。D. MEK 阻害剤 PD を処理した NF-kappaB プロモーターアッセイ。E. 定量的 RT-PCR の結果。RAGE 依存的なサイトカイン抑制が PD によるキャンセルされる。F. RAGE 遺伝子欠損マウス由来好中球に 100 nM LTB4 を処理した。3 時間後に解析した。G, H. レチノイン酸刺激 HL-60 を用いて LTB4、soluble RAGE (sRAGE) の影響を定量的 RT-PCR を用いて解析した。\* $p < 0.5$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , 2-way ANOVA with Bonferroni post hoc tests (A-F), 1-way ANOVA with Dunnett post hoc tests (G, H)。

次に LTB4 依存的な好中球の走化性に対する RAGE の影響を検証した。野生型および RAGE 遺伝子欠損マウスから好中球を単離し、TaxiScan を用いて調べたところ、野生型に比べて RAGE 遺伝子欠損好中球は LTB4 に対する走化性が弱いことがわかった (図 8A)。これ

は、RAGE の阻害タンパク質である sRAGE を用いても容量依存的に阻害された (図 8B)。また、RAGE 阻害剤である FPS を用いても同様の現象を確認した (図 8C)。なお、FPS および sRAGE の効果は RAGE 遺伝子欠損好中球においては見られなかったため、それぞれの阻害効果は RAGE 特異的であると考えられる (図 8C)。さらにこの系は、LTB4-BLT1 経路に依存しており、BLT2 の内因性リガンドである 12-HHT は全く影響を及ぼさないことを確認している (図 8D, 8E)。

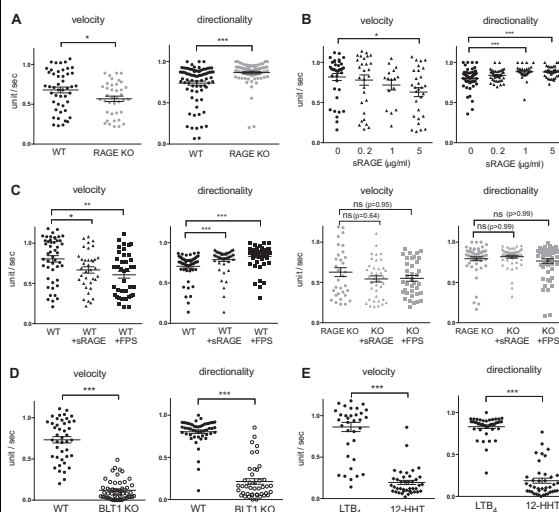


図 8. RAGE は LTB4-BLT1 依存的な走化性を促進する。A-C. RAGE 遺伝子欠損、sRAGE、FPS、3 種類の阻害様式を用いて、LTB4 依存的な走化性を検証した。D. LTB4 依存的な走化性は、BLT1 遺伝子欠損マウス由来好中球では全く起きなかった。E. 12-HHT (100 nM) は好中球の走化性を起こさなかった。

さらに図 8 で見られた RAGE の LTB4 依存的な走化性に対する影響を *in vivo* で検証するために、LTB4 腹腔内投与による腹膜炎モデルを用いて検証した。その結果、野生型では、Gr-1+CD11b+ で示される成熟好中球の腹腔内浸潤が LTB4 依存的に起きるのに対し、RAGE 遺伝子欠損マウスでは、引き起こされなかった (図 9A, 9B)。なお、この走化性は、BLT1 遺伝子欠損マウスにおいては完全に消失したため、*in vitro* と同じく、LTB4-BLT1 経路に依存したモデルであることを確認している (図 9C, 9D)。

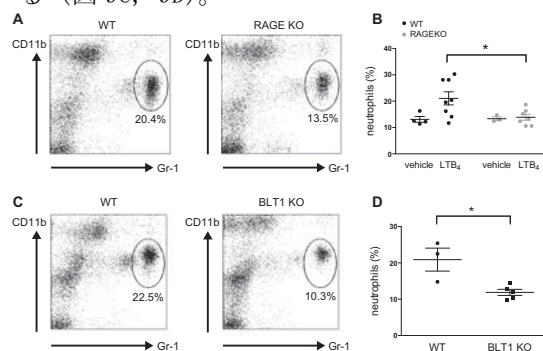


図 9. LTB4 依存的な腹腔内好中球浸潤は、RAGE により促進される。A-D. 15  $\mu$ g LTB4 を腹腔内投与し、4 時間後の腹腔浸潤細胞を解析した。



さらに、RAGE 遺伝子欠損マウスにおける好中球の遊走促進と RAGE による LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的な MEK-ERK 経路の増強によるものか否か検証するため、検証を行った。野生型および RAGE 遺伝子欠損マウス由来骨髄から好中球を単離し、LTB<sub>4</sub> を用いて刺激し、ERK の活性化を検討したところ、野生型に比べて、RAGE 遺伝子欠損好中球では、活性化が減弱していた (図 10A)。さらに、LTB<sub>4</sub> 依存的な野生型好中球の遊走は、MEK 阻害剤である PD および U0126 によって阻害されたが、RAGE 遺伝子欠損好中球において見られた遊走の減弱は、さらに MEK 阻害剤を添加しても変動しなかった (図 10B)。これらの結果は、RAGE が MEK-ERK 経路の増強を介して、LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的な走化性を増強することを示唆した。

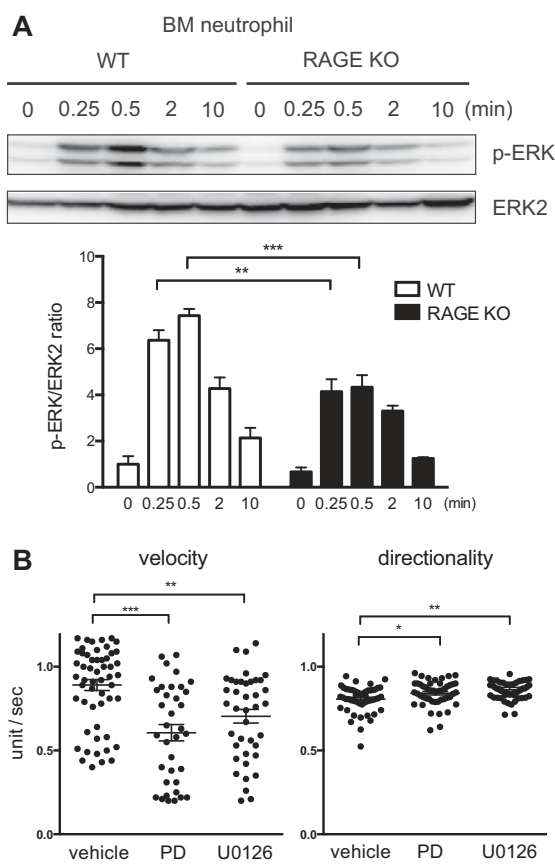


図 10. RAGE は MEK-ERK 経路の増強を介して、LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的な遊走を促進する。A. LTB<sub>4</sub> 処理後の好中球タンパク質のウェスタンブロッティング解析。野生型と RAGE 遺伝子欠損好中球を単離して与した。B. 野生型と RAGE 遺伝子欠損マウス由来好中球の MEK 阻害剤 (PD、U-0126) 下での走化性を検証した。

本研究では、生理活性脂質 LTB<sub>4</sub> と免疫応答の関わりを明らかにし、その受容体 BLT1 を免疫疾患の新たな創薬標的として提起することを目的として研究を行ってきた。その結果、BLT1 のこれまで発見されていなかった新規結合分子として RAGE を同定することができた。RAGE は糖尿病やアテローム性動脈硬化、アルツハイマー病など、様々な慢性炎症疾患と関わりがあり、BLT1 が関与する疾患とも相関がある。また、RAGE は、加齢依存的に発現

上昇することが報告されており、加齢依存的に BLT1 シグナルが増強される可能性も考えられる。RAGE を阻害することで LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路を抑制することができれば、炎症部位への遊走などを止められる可能性があり、新規の創薬標的となりうるだろう (図 12)。

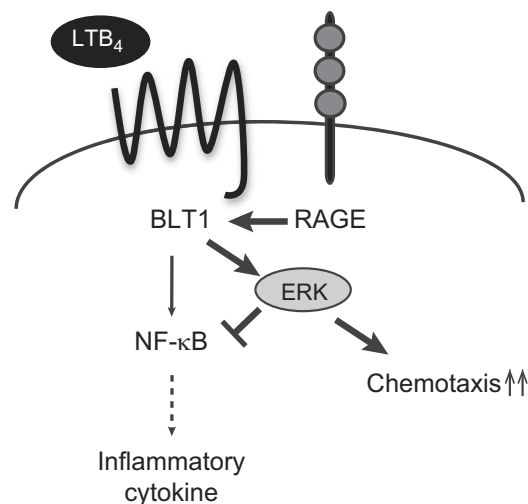


図 12. BLT1-RAGE の相互作用概略図。RAGE は、LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的に ERK を増強し、下流で起きるイベントの内、NF-kappaB は抑制し、遊走は促進する

## 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 11 件)

- Ikeda K, Koga T, Sasaki F, Ueno A, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. Generation and characterization of a human-mouse chimeric high-affinity antibody that detects the DYKDDDDK FLAG peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 486(4):1077-1082, 2017.
- Yano A, Takahashi Y, Moriguchi H, Inazumi T, Koga T, Otaka A, Sugimoto Y. An aromatic amino acid within intracellular loop 2 of the prostaglandin EP2 receptor is a prerequisite for selective association and activation of G $\alpha$ s. *Biochim Biophys Acta*, 1862(6):615-622, 2017.
- Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, Yoshimoto S, Kanda H, Arai Y, Nakajima-Takagi Y, Iwama A, Koga T, Sugimoto Y, Ozawa T, Nakamura M, Kumagai M, Watashi K, Taketo MM, Aoki T, Narumiya S, Oshima M, Arita M, Hara E, Ohtani N. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through PGE2-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Discov*, 7(5):522-538, 2017.
- Koga T, Shiraki N, Yano S, Suico MA, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Kume S, Kai H. Mild electrical stimulation with heat

- shock guides differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing cells within the definitive endoderm. *BMC Biotechnol*, 17(1):14, 2017.
5. Hijioka M, Anan J, Ishibashi H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, **Koga T**, Yokomizo T, Shimizu T, Katsuki H. Inhibition of leukotriene B4 action mitigates intracerebral hemorrhage-associated pathological events in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 360(3):399-408, 2017.
  6. Ichiki T, **Koga T\***, Yokomizo T. Receptor for advanced glycation end products regulates leukotriene B4 receptor 1 signaling. *DNA Cell Biol*, 35(12):747-750, 2016.
  7. Shigematsu M, **Koga T**, Ichimori 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 penumolysin-dependent acute lung injury. *Sci Rep*, 6:34560, 2016.
  8. Ichiki T, **Koga T\***, Okuno T, Saeki K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Sakaguchi M, Yokomizo T\*. Modulation of leukotriene B4 receptor 1 signaling by receptor for advanced glycation end products (RAGE). *FASEB J*, 30(5):1811-1822, 2016.
  9. 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.
  10. Fukuda R, Suico MA, Kai Y, Omachi K, Motomura K, **Koga T**, Komohara Y, Koyama K, Yokota T, Taura M, Shuto T, Kai H. Podocyte p53 limits the severity of experimental Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 27(1):144-157, 2016.
  11. **Koga T**, Suico MA, Shimasaki S, Watanabe E, Kai Y, Koyama K, Omachi K, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Mori K, Hino S, Nakao M, Kai H. Endoplasmic reticulum (ER) stress induces sirtuin 1 (SIRT1) expression via the PI3K-Akt-GSK3 beta signaling pathway and promotes hepatocellular injury. *J Biol Chem*, 290(51):30366-30374, 2015.

[学会発表] (計 2 件)

1. 古賀友紹、奥野利明、佐伯和子、横溝岳彦. CRISPR/Cas9 を用いた Leukotriene A4 hydrolase 欠損マウスの作製. 第 40 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シ・ポジウム 指宿、鹿児島、2016 年 8 月 26 日～8 月 28 日.

2. **Koga T**, Okuno T, Saeki K, Nakamura E, Tada N, Yokomizo T. Generation of Leukotriene A4 hydrolase knockout mouse by CRISPR/Cas9 system. *The 38<sup>th</sup> Japan Society of Molecular Biology and the 88<sup>th</sup> Japan Society of Biochemistry Meeting*, Kobe, Japan, Dec 1-4, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[http://plaza.umin.ac.jp/j\\_bio/Biochem1/Top.html](http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/Biochem1/Top.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀友紹 ( Koga, Tomoaki )  
 熊本大学・大学院先導機構・助教  
 研究者番号： 30615092

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

横溝岳彦 ( Yokomizo, Takehiko )  
 順天堂大学医学部・生化学第一講座・教授  
 研究者番号： 60302840

(4) 研究協力者

( )