

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18390096

研究課題名（和文） 生理活性脂質受容体と免疫・炎症反応

研究課題名（英文） Roles of lipid mediators and receptors in inflammation and immun

研究代表者

横溝 岳彦 (YOKOMIZO TAKEHIKO)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60302840

研究成果の概要：LTB4 受容体 BLT1, BLT2 を対象に、受容体の分子解剖、生体内リガンドの同定、遺伝子欠損マウスの表現型解析を行った。BLT1 の G タンパク質認識部位の同定、BLT2 の形質膜発現におけるヘリックス 8 の役割の解明、BLT2 の生体内リガンドの同定に成功した。遺伝子欠損マウスの解析から、樹状細胞に発現する BLT1 が Th1 型免疫反応を促進すること、BLT2 が腸管炎症に保護的に作用することを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：生化学、分子生物学、免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アラキドン酸カスケード、ロイコトリエン、G タンパク質共役型受容体、遺伝子欠損マウス、病態モデル

1. 研究開始当初の背景

生理活性脂質の中でもロイコトリエン B4 (LTB4) は、強力な好中球走化性因子として知られていた。申請者は、LTB4 に対する受容体として、高親和性の BLT1 と低親和性の BLT2 を分子同定し、それぞれの遺伝子を欠損するマウスを作成した。BLT1 欠損マウスは、炎症反応の減弱に加えて、外来抗原に対する Th2 型の免疫反応が減弱しており、その結果、気管支喘息モデルが減弱することがわかった。一方、BLT2 欠損マウスは樹立には成功したものの、病態モデルにおける表現型の解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、様々な免疫系の細胞に発現している BLT1, BLT2 を主な研究対象として、受容体欠損マウスを用いた免疫・炎症反応におけるロイコトリエン受容体の機能とそのメカニズムを細胞レベルで解明することを目標に研究を遂行する。また、これらの受容体を用いて GPCR による G タンパク質活性化、受容体の細胞膜移行にかかわる分子メカニズムの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) GPCR の三量体 G タンパク質活性化のメカニズムの解明

BLT1 の細胞内ループに様々な変異を導入し、Gi と Gq タンパク質の活性化を、リガンド結合、GTPγS 結合、細胞内カルシウム上昇、細胞走化性の評価を行い、G タンパク質の認識の分子機序の解明を行った。

(2)GPCR の形質膜移行の分子機構

特に BLT2 の細胞内ループに注目し、種々の変異を導入した BLT2 遺伝子を用いて、BLT2 の形質膜移行をフローサイトメーター、蛍光免疫染色を用いて検討した。また、これらの変異受容体を用いて、細胞内シグナルの解析も行った。

(3)BLT1 受容体の樹状細胞活性化における役割の解明

野生型マウス、BLT1 欠損マウスの骨髄から分化培養した樹状細胞を用いて、リポポリサッカライド (LPS) 刺激時のサイトカイン産生を測定した。また混合リンパ球試験を行い、樹状細胞が T 細胞を刺激する際の、BLT1 の発現の意義を検討した。

(4)BLT2 の内在性リガンドの探索

BLT2 の活性化に必要な LTB4 の濃度が、生体内に存在すると考えられる濃度よりもはるかに高いことから、LTB4 以外の内因性リガンドの存在を想定し、これを同定することを試みた。ラットの諸臓器より脂質を抽出し、BLT2 過剰発現細胞に添加して細胞内シグナルを観察することを指標とした。活性画分を逆相の高速液体クロマトグラフィーで分離し、活性測定を行った結果、BLT2 活性化能を有するフラクションを部分精製し、質量分析計を用いてその構造を推定した。

(5)BLT2 欠損マウスの表現型解析

BLT2 を発現する腸管において BLT2 が何らかの役割を果たしていると考え、野生型マウス、BLT2 欠損マウスを用いて腸炎のモデルを作成した。腸炎の評価は、マウスの体重の経時的变化、腸管の免疫染色、DNA マイクロアレイ解析、定量的 PCR 法で、種々のサイトカイン、ケモカインの発現を観察することで行った。

4. 研究成果

(1)GPCR の三量体 G タンパク質活性化のメカニズムの解明

BLT1 受容体は Gi と G16 という薬理的に異なる三量体 G タンパク質を活性化することが知られているが、BLT1 のどのドメインが両者を区別しているのかは明らかではなかった。BLT1 の G タンパク質共役部位を同定する目的で、BLT1 の細胞内ループの 4 アミノ酸を一単位として、全てアラニンに置換した変異

受容体を合計 14 個作成し、おのおの変異型受容体の細胞内シグナル伝達を観察した。第三細胞内ループのアミノ末端に存在する i3-1 に変異を加えた BLT1 は、G16 を正常に活性化するが、Gi は全く活性化出来ず、この部位で Gi タンパク質を認識していることが明らかとなった。i3-1 変異型 BLT1 は細胞内カルシウム上昇は正常であるが、アデニル酸シクラーゼの抑制と LTB4 に対する細胞走化性を消失しており、Gi タンパク質の活性化ができないことを裏付けている。興味深いことに Gi を活性化出来ない変異 BLT1 は、高親和性の LTB4 結合能を失っており、Gi タンパク質との共役によって高親和性の構造をとることが明らかとなった。(文献 9)

(2)GPCR の形質膜移行の分子機構

BLT2 の C 末端を欠損した変異型 BLT2 は形質膜へ移行できず、小胞体に貯留した。同様の表現型が C 末端 Helix8 の疎水性アミノ酸をアラニンに置換した変異 BLT2 でも観察された。興味深いことに、BLT2 作動薬、拮抗薬を加えると、これらの変異 BLT2 が形質膜に発現したことから、BLT2 のヘリックス 8 は小胞体からの脱出に必須のドメインであり、GPCR リガンドは分子シャペロンとして機能することが明らかとなった。(文献 26)

(3)BLT1 受容体の樹状細胞活性化における役割の解明

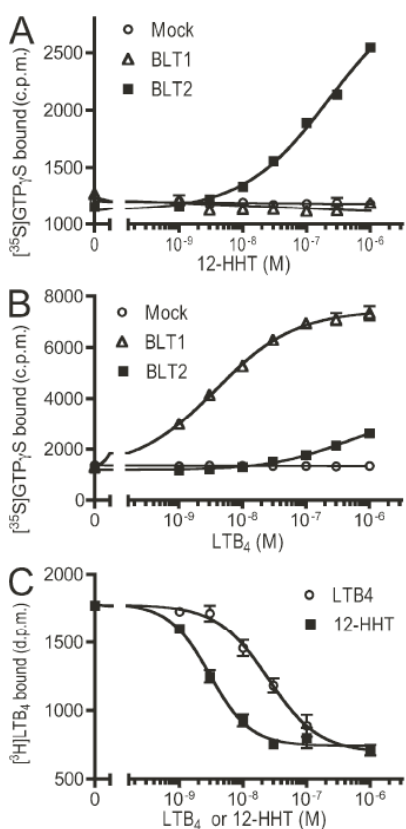
マウス樹状細胞に BLT1 の発現が認められた。骨髄由来の樹状細胞 (BMDC) は LTB4 に対して、ベル型の走化曲線を有する走化性を示したが、この走化性は BLT1 欠損マウスの樹状細胞で消失していたため、BLT1 を介しているものと考えられた。ヒト単球由来樹状細胞にも BLT1 が発現していた。BMDC の培養上清中のサイトカイン産生を定量したところ、BLT1 欠損 BMDC では IL-12 の産生が低下しており、混合リンパ球培養試験における T 細胞の活性化が、BLT1 欠損樹状細胞を用いた場合に減弱していた。また、外来抗原感作・惹起による遅延型過敏反応が BLT1 で大きく減弱していた。以上から、樹状細胞に発現する BLT1 は Th1 型の免疫反応を亢進させる役割を有していることが示唆された。

(4)BLT2 の内在性リガンドの探索

ラットの様々な臓器より脂質抽出を行い、BLT2 過剰発現細胞に添加して BLT2 の活性化能を検討した。小腸から抽出したアセトン可溶性の脂質画分を HPLC にて展開したところ、LTB4 とは異なるフラクションに BLT2 活性化能を検出し、これを精製・質量分析系にて構造を決定したところ、12-HHT

(12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid)であることがわかった。合成 12-HHT を用いて詳細な解析を行ったところ、12-HHT は LTB₄ よりも低濃度で BLT2 に結合し、細胞内カルシウム上昇を引き起こすことが明らかとなった。これまで 12-HHT はトロンボキサン A₂ 産生に伴うバイプロダクトであり、生物活性は無い不飽和脂肪酸と考えられてきたが、強力な BLT2 活性化能を有する新規生理活性脂質であると考えられた。(文献 18)

(図)12-HHT は BLT2 の生体内リガンドである。(A)12-HHT は BLT2 発現 CHO 細胞膜画分における GTPγS 取り込みを亢進させた。(B)LTB₄ による BLT2 を介した G タンパク質の活性化には 12-HHT よりも高濃度の LTB₄ を必要とした。(C)12-HHT は LTB₄ よりも低い濃度で BLT2 に結合した。



(5)BLT2 欠損マウスの表現型解析

ロイコトリエン B₄(LTB₄)第一受容体 BLT1, 第二受容体 BLT2 を欠損するマウスを用いて炎症反応における役割の解明を試みた。デキストララン硫酸投与による大腸炎モデルにおいて BLT2 欠損マウスは亢進した炎症反応を示し、IFN-γ, IL-6 の発現の亢進を認めた。一方で、BLT1 欠損マウスは野性型マウスと同様の表現型を示した。以上から BLT2 は炎症反応に抑制的に働いていることが示唆され

た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 26 件)

- Chiang N, 他 6 名, Yokomizo, T., Brink, C. The Lipoxin receptor ALX: Potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol. Rev.* 58, 463-487, 2006, 査読あり
- Doi, K., 他 6 名, Yokomizo, T., 他 5 名. Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor deficient mice. *Am. J. Pathol.* 168, 1413-1424, 2006, 査読あり
- Hori, T., Ishijima, J., Yokomizo, T., 他 3 名. Crystal structure of anti-configuration of indomethacin and leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase complex reveals the structural basis of broad spectrum indomethacin efficacy. *J. Biochem.* 140, 457-466, 2006, 査読あり
- Iizuka, Y., Yokomizo, T., 他 4 名, T. Characterization of mouse second leukotriene B₄ receptor, mBLT2. *Prostaglandins & other lipid mediators.* 79, 163-164, 2006, 査読あり
- 横溝岳彦:進展する脂質膜受容体研究-最近のトピックス シグナル受容機構と生理機能の解明(実験医学増刊号), 24, 624-629, 2006, 査読無し
- 横溝岳彦:生理活性脂質ロイコトリエン B₄ とその受容体, *福岡医学*, 97, 183-191, 2006, 査読無し
- 横溝岳彦:脂質因子による免疫反応の制御, *感染・炎症・免疫*, 36, 196-205, 2006, 査読無し
- Ando K, Akai Y, Kunitomo J, Yokomizo, T., 他 6 名. Synthesis and biological activities of novel furo[2, 3, 4-jk][2]benzazepin-4(3H)-one derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 5, 655-663, 2007, 査読あり
- Kunieda, K., Okuno, T., Terawaki, K., Miyano, M., Yokomizo, T., and Shimizu, T. Identification of the Intracellular Region of the

- Leukotriene B4 receptor type-1 that Specifically Involves in Gi-Activation. *J. Biol. Chem.* 282, 3998-4006, 2007, 査読あり
10. Sakata Y, 他 5 名, Yokomizo, T., Ohishi Y. Preparation of 3-(4-chlorophenyl)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-5-methoxybenzo[b]furan derivatives and their leukotriene B(4) inhibitory activity. *Org. Biomol. Chem.* 5, 3083-3086, 2007, 査読あり
 11. 奥野利明, 横溝岳彦: ロイコトリエン B4 と呼吸器疾患 呼吸と循環, 55, 423-428, 2007, 査読無し
 12. 横溝岳彦: 臨床検査と脂質: これからの脂質研究への期待, 臨床検査, 51, 457-458, 2007, 査読無し
 13. 横溝岳彦: 細胞膜受容体の脂質性リガンド: エイコサノイド, スフィンゴ脂質と新規抗炎症脂質, 臨床検査, 51, 459-468, 2007, 査読無し
 14. 横溝岳彦: ロイコトリエン B4 と免疫・アレルギー反応, 日本アレルギー協会支部ニュース, 12 号, 2007, 査読無し
 15. 横溝岳彦: LTB4 受容体の同定とその後の進展, 日本薬理学会雑誌, 130, 29-33, 2007, 査読あり
 16. 横溝岳彦: ロイコトリエンによる免疫制御, 細胞工学, 26, 1236-1240, 2007, 査読無し
 17. Ando, K., Kawamura, Y., Akai, Y., Kunitomo, J., Yokomizo, T., 他 4 名. Preparation of 2-, 3-, 4- and 7-(2-alkylcarbonyl-1-alkylvinyl)benzo[b]furans and their BLT(1) and/or BLT(2) inhibitory activities. *Org. Biomol. Chem.* 6, 296-307, 2008, 査読あり
 18. Okuno, T., Iizuka Y, Okazaki H, Yokomizo, T., Taguchi R, Shimizu T: 12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid is a natural ligand for leukotriene B4 receptor 2. *J. Exp. Med.* 205, 759-766, 2008, 査読あり
 19. Hase M, Yokomizo, T., Shimizu T, Nakamura M. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor, GPR20, that constitutively activates Gi proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 12747-12755, 2008, 査読あり
 20. Ito S, 他 4 名, Yokomizo, T., Shimizu T, Majima M. Leukotriene B4/Leukotriene B4 receptor pathway is involved in hepatic microcirculatory dysfunction elicited by endotoxin. *Shock* 30, 87-91, 2008, 査読あり
 21. Kuramoto M, 他 5 名, Yokomizo, T., Takeda S, Tanaka S, Ohishi Y. Preparation of leukotriene B(4) inhibitory active 2- and 3-(2-aminothiazol-4-yl)benzo[b]furan derivatives and their growth inhibitory activity on human pancreatic cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* 6, 2772-2781, 2008, 査読あり
 22. Hennig R, 他 7 名, Yokomizo, T., Friess H, Adrian TE. BLT2 is expressed in PanINs, IPMNs, pancreatic cancer and stimulates tumour cell proliferation. *Br. J. Cancer* 99, 1064-1073, 2008, 査読あり
 23. Irukayama-Tomobe Y, Tanaka H, Yokomizo, T., 他 3 名 Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor, GPR109B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3930-3934, 2009, 査読あり
 24. 奥野利明: ロイコトリエン B4 第二受容体 (BLT2) の生体内リガンドは 12-HHT である, 実験医学, 26, 1752-1753, 2008, 査読無し
 25. 横溝岳彦: ロイコトリエン受容体, 日本薬理学会雑誌, 133, 230-232, 2009, 査読あり
 26. Yasuda D, Okuno, T., Yokomizo, T., 他 6 名 Helix 8 of leukotriene B4 type-2 receptor is required for the folding to pass the quality control in the endoplasmic reticulum. *Faseb J*, In press, 査読あり
- [学会発表] (計 45 件)
1. Hase, M: Roles of leukotriene B4 receptor, BLT1 in chronic asthma model. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, 2006 年 6 月 21 日
 2. Yokomizo, T.: Roles of leukotriene B4 receptors in immunological reactions, 15th World Congress of Pharmacology,

- Beijing, 2006年7月3-7日
3. 横溝岳彦:生理活性脂質受容体の構造と機能, 第32回日本微小循環学会総会特別講演, 京都, 2007年2月23日
 4. 横溝岳彦:Gタンパク質共役型受容体-ラボベンチから創薬へ, 「魅力ある大学院教育」イニシアティブ事業シンポジウム, 北九州, 2007年3月3日
 5. 横溝岳彦:生理活性脂質受容体の解析: in vitro と in vivo, 第80回日本薬理学会年会シンポジウム, 名古屋, 2007年3月14日
 6. Yokomizo, T:Leukotriene B4 receptors, 3rd International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Sorrento, 2007年5月10日
 7. 吉本瑛梨:ロイコトリエン B4 12 水酸基脱水素酵素に結合する新規タンパク質の同定, 平成 19 年度日本生化学会九州支部例会, 宮崎, 2007年5月19-20日
 8. 奥野利明:ロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) のヘリックス8の機能解明と Gi タンパク質選択的共役部位の同定, 平成 19 年度日本生化学会九州支部例会, 宮崎, 2007年5月19-20日
 9. 奥野利明:ロイコトリエン B4 受容体のヘリックス8の役割, 九州大学第11回感染症リサーチコアセミナー, 福岡, 2007年6月15日
 10. Yokomizo, T:Leukotriene B4 receptors: from cloning to clinic, 5th Korea-Japan Conference on Cell Signaling for Young Scientists, Geongju (Korea), 2007年7月9-11日
 11. Okuno, T:Roles of helix 8 and intracellular regions of the leukotriene B4 receptor type 1, 5th Korea-Japan Conference on Cell Signaling for Young Scientists, Geongju (Korea), 2007年7月9-11日
 12. Onohara N.:Diacylglycerol-induced Ca²⁺ influx mediates NFAT activation. Role of TRPC3 and TRPC6, 5th Korea-Japan Conference on Cell Signaling for Young Scientists, Geongju (Korea), 2007年7月9-11日
 13. Yoshimoto, E. Identification of binding proteins of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase, 5th Korea-Japan Conference on Cell Signaling for Young Scientists, Geongju (Korea), 2007年7月9-11日
 14. Moroishi K. Rapid and convenient method for isolating cells overexpressing orphan GPCRs using autoMACS, 5th Korea-Japan Conference on Cell Signaling for Young Scientists, Geongju (Korea), 2007年7月9-11日
 15. 横溝岳彦:ロイコトリエン B4 受容体の生体内での役割, 第27回日本炎症・再生医学会, 東京, 2007年8月2日
 16. 横溝岳彦:ロイコトリエン B4 受容体と免疫・炎症反応, 第16回日本脂質栄養食糧学会, 島根, 2007年9月1日
 17. 馳桃子:脂質認識 GPCR に近縁なオーファン GPCR, GPR20 の細胞内シグナル伝達解析, 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム, 2007年9月15日
 18. 伊藤伸子:マウス下肢虚血再灌流後の肝障害におけるロイコトリエン B4 受容体の役割, BMB2007, 2007年12月13日
 19. 吉本瑛梨:LTB4-12 水酸基脱水素酵素に結合する新規タンパク質の同定, BMB2007, 横浜, 2007年12月13日
 20. 馳桃子:オーファン GPCR, GPR20 の機能解析, BMB2007, 2007年12月11日
 21. Okuno, T:Screening of a natural lipid ligand of orphan GPCR, Keystone Symposia, Montana, 2008年1月9日
 22. 荒武良総:Gタンパク質共役型受容体の細胞内移行のメカニズムに関する研究, 九州大学21世紀COEプログラム 平成19年度若手研究者研究成果発表会, 福岡, 2008年1月25日
 23. 岡崎寛士:癌転移における LTB4 及びその受容体 BLT1, BLT2 の意義に関する研究, 九州大学21世紀COEプログラム 平成19年度若手研究者研究成果発表会, 福岡, 2008年1月25日
 24. 奥野利明:ロイコトリエン B4 受容体の細胞内領域の役割, Gタンパク質特定領域・膜輸送複合体特定領域合同若手ワークショップ, 箱根, 2008年1月26日
 25. 奥野利明:ロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) の細胞内ループと C 末端の役割, グローバル COE 若手研究者発表会, 別府, 2008年2月1日
 26. 横溝岳彦:生理活性脂質研究のこれまでとこれから, 第49回日本生化学会中国四国支部例会, 高松, 2008年5月16日
 27. 奥野利明:ロイコトリエン B4 第二受容体 (BLT2) の生体内リガンドはシクロオキシゲナーゼ産物 12-HHT である, 日本生化学会九州支部例会, 福岡, 2008年5月18日

28. 奥野利明:ロイコトリエン B4 第二受容体(BLT2)の生体内リガンドは12-HHTである,第50回日本脂質生化学会,徳島,2008年6月6日
29. 岡崎寛士:2つのLeukotrieneB4受容体と癌の転移・浸潤,九州大学G-COEプログラム平成20年度若手研究者発表会,熊本,2008年8月9日
30. 荒武良総:Gタンパク質共役型受容体の脱感作と細胞内移行の分子機序,第2回G-COE理医連携リトリート,熊本,2008年8月9日
31. 奥野利明:ロイコトリエン B4 第二受容体(BLT2)の生体内リガンドはシクロオキシゲナーゼ産物12-HHTである,第2回G-COE理医連携リトリート,熊本,2008年8月10日
32. 横溝岳彦:ロイコトリエン B4 第二受容体の内因性リガンドの同定,第30回薬学会九州支部コロキウム「生命機能をつかさどるGタンパク質シグナリング」,福岡,2008年10月25日
33. 奥野利明:ロイコトリエン B4 第二受容体(BLT2)の生体内リガンドの同定,第5回東京呼吸器リサーチフォーラム,東京,2008年11月1日
34. Yokomizo, T.: Receptors for bioactive lipid mediators, G-COE International symposium, Fukuoka, 2008年11月9日
35. Okazaki: DIFICIENCY OF LEUKOTRIENE B4 RECEPTORS AFFECTS TUMOR METASTASIS, G-COE International symposium, Fukuoka, 2008年11月9日
36. Okuno, T.:シクロオキシゲナーゼ代謝物12-HHTはBLT2の内因性リガンドである,日本免疫学会,京都,2008年12月2日
37. Sasaki, F.: Generation and characterization of a novel high-affinity monoclonal antibody for FLAG tag. 第81回日本生化学会大会合同大会,神戸,2008年12月9日
38. 荒武良総:ロイコトリエン B4 第一受容体BLT1と血小板活性化因子受容体PAFRの脱感作機構,第81回日本生化学会大会合同大会,神戸,2008年12月12日
39. 奥野利明:ロイコトリエン B4 第二受容体 BLT2 の生体内リガンドの同定,第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム,神戸,2008年12月11日
40. Okuno, T.:12-HHT, a Metabolite of Cyclooxygenase, is a Natural Ligand for Leukotriene B4 Receptor 2, BLT2, Japan/Korea Conference on Cellular Signaling, 福岡,2008年12月19日
41. 奥野利明:ロイコトリエン B4 第二受容体BLT2の生体内リガンドの同定,Gタンパク質特定領域・膜輸送複合体特定領域合同若手ワークショップ,神戸,2009年1月30日
42. 安田大恭:GPCRが有するHelix 8の小胞体搬出における意義,Gタンパク質特定領域・膜輸送複合体特定領域合同若手ワークショップ,神戸,2009年1月30日
43. 奥野利明:ロイコトリエン B4 第二受容体 BLT2 の内因性リガンドの同定,生命科学系GCOEネットワーク・フォーラム2009,東京,2009年2月14日
44. 横溝岳彦:Gタンパク質共役型受容体の構造機能相関とリガンド探索,Gタンパク質シグナル公開シンポジウム,2009年3月14日,福岡
45. 横溝岳彦:ロイコトリエン B4 第二受容体 BLT2 の内因性リガンドの同定,日本薬学会第129年会シンポジウム,2009年3月26日,京都
- [図書] (計1件)
1. 横溝岳彦:プロスタグランジン・トロンボキサン・ロイコトリエン,炎症・再生医学事典,朝倉書店,印刷中,査読無し
- [その他]
ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/biochem1/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
横溝 岳彦 (YOKOMIZO TAKEHIKO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号:60302840
- (2)研究分担者
奥野 利明 (OKUNO TOSHIAKI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号:60361466
中村 崇規 (NAKAMURA TAKANORI)
九州大学・大学院医学研究院・技術専門職員
研究者番号:10380643
- (3)連携研究者
なし