

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22790

研究課題名（和文）ロイコトリエンB4第二受容体による気道上皮細胞保護機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of leukotriene B4 receptor 2 protected lung epithelial cells

研究代表者

遅 源 (CHI, Yuan)

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：30802871

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：上皮細胞や血管内皮細胞に高発現するBLT2というGタンパク質共役型受容体が、肺炎球菌毒素(PLY)による上皮細胞膜障害が引き起こす細胞死を抑制することを見いだした。BLT2は、毒素が形成した孔を介して流入してきたCa²⁺を引き金として細胞膜の修復を亢進させることで細胞死を抑制していると考えられる。BLT2発現細胞では、PLYによって形成された細胞膜上の孔を細胞外小胞(EVs)として切り出して放出する経路や細胞骨格分子の再編成が亢進していた。以上のことから、BLT2は速やかに障害された膜を取り除き修復することで細胞死を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内における侵襲性肺炎球菌感染は致命率が7.4%と報告されているが、肺炎球菌毒素による個体死に対する有効な治療法は明らかになっていない。上皮細胞に発現するBLT2受容体が肺炎球菌毒素による上皮細胞障害を抑制することを本研究で明らかにしたが、この発見はBLT2受容体作動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ている。

研究成果の概要（英文）：BLT2 is a G-protein-coupled receptor highly expressed on epithelial and vascular endothelial cells. In this study, we found that BLT2 suppresses cell death caused by PLY-induced cell membrane damage. The resistance depends on enhancement of plasma membrane repair triggered by Ca²⁺ influx through the toxin-formed pores. After PLY perforation, BLT2 signaling enhances the release of extracellular vesicles (EVs) and reorganization of cytoskeleton, suggesting that BLT2 suppresses cell death by removing and repairing damaged membranes.

研究分野：病態医化学

キーワード：肺炎球菌毒素 ロイコトリエンB4第二受容体 細胞障害 細胞膜修復

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

悪性新生物、心疾患に続いて肺炎は、H28 年における日本人の死亡原因の第 3 位となっている。Pneumolysin (PLY)は肺炎球菌が産生する毒素であり、肺炎致死の原因因子であることは明らかであるものの、個体死亡に至る詳細なメカニズムについては不明な点が多い。一方、研究代表者の研究室ではロイコトリエン B₄第二受容体 (BLT2) の分子同定と機能解析を行い、BLT2 が腸管炎症や皮膚創傷治療に保護的な機能を発揮することを明らかにしてきた(Yokomizo T. *J. Clin. Invest.*, 2018. Liu M. *Exp. Med.*, 2014)。近年、BLT2 が肺胞上皮細胞や肺血管内皮細胞にも発現していること、BLT2 の欠損マウスが PLY に対して感受性が高く、気管支収縮や血管透過性の亢進を呈し重篤な急性肺傷害を生じて早期に死に至ることに着目した(図 1)。これまでに、血管内皮細胞において、BLT2 がペプチドロイコトリエン受容体 (CysLT1) の発現を抑制することにより、PLY 誘導性急性肺傷害を保護していることを明らかにしてきたが(Shigematsu M. *Sci. Rep.*, 2016)、呼吸器の第一の防衛線である気管支や肺胞上皮細胞においても BLT2 が高発現していることから、研究代表者は PLY 依存的な上皮細胞障害を BLT2 が抑制する可能性を考えた。そこで、BLT2 を過剰発現するヒト肺胞上皮細胞株と BLT2 を内在性に発現する初代培養マウス皮膚角化細胞を用いて PLY の添加実験を行い、BLT2 の発現が PLY 依存的な上皮細胞死に与える影響を解析することにした。

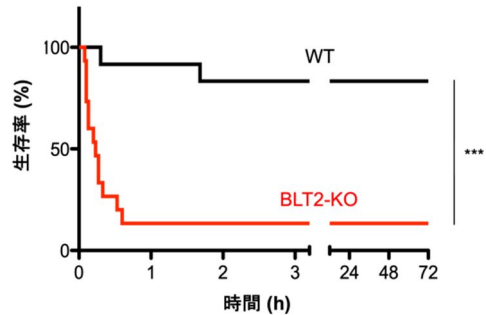


図 1：PLY毒素によるBLT2欠損マウスは高い致死率
PLYを気管内に投与し、マウスの生存率を観察した。
WTマウスはほとんどが生存できた、BLT2欠損マウスは非常に早期に80%個体が死に至りました。

2. 研究の目的

日本国内での侵襲性肺炎球菌感染の致死率は7.4%と報告されているが、肺炎球菌が産生する PLY は肺炎球菌が死んだ際に漏出する毒素であり、特に治療目的で肺炎患者に抗生物質を投与した際に大量に放出され、肺炎予後の増悪因子として働くことが知られている。PLY は哺乳類の細胞膜上のコレステロールに結合し、細胞膜上で 38 量体を形成して 20-30 nm の細胞孔を形成する。この細胞孔の形成は、細胞溶解を引き起こすとともに、炎症因子の放出を介して、血管透過性の亢進・炎症の拡大を引き起こすとされている。しかしながら、PLY による肺胞上皮細胞障害を抑制する細胞内因子分子機序は不明で、PLY による致死を抑制する新規治療法の標的分子の同定が望まれる。本研究は、肺炎球菌毒素 PLY による肺の急性障害に対して BLT2 受容体が保護的に働くことに着目し、特に上皮細胞障害保護作用に焦点をあてて、その分子機構を明らかにすることを目的としている。将来的には肺炎球菌肺炎の新規治療法の基礎的基盤を築きたいと考えている。

3. 研究の方法

我々は、BLT2 を過剰発現させた肺胞上皮細胞株(A549 細胞)と BLT2 欠損マウスの皮膚から単離培養した角化細胞を用いて、BLT2 発現が PLY 依存的細胞障害に与える影響とそのメカニズムを調べた。

(1) PLY 依存的細胞膜障害の評価

- ①光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡によって PLY 添加による細胞の形態変化を観察した。
 - ②Calcein-AM/DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) staining assay によって細胞膜障害の程度を可視化した。
 - ③細胞膜が障害された際に放出される逸脱酵素(乳酸脱水素酵素: LDH)の量を測定し、細胞膜障害の程度を定量化した。
 - ④細胞生存率は WST-8 Assay Kit により評価した。
- 以上の方法により、BLT2 発現が PLY 依存的細胞膜障害に与える影響を調べた。

(2) PLY 結合能の比較

①PLY が細胞に結合する際にはコレステロール (CHOL) が必要である。Cholesterol assay kit を用いて BLT2 発現細胞と Mock 細胞の CHOL の量を比較した。

②Filipin III 染色-蛍光顕微鏡観察によって CHOL の細胞内局在を調べた。

③PLY 添加・洗浄後、ウェスタンブロッティングにより細胞に結合している PLY の量を比較した。

以上の方法により、BLT2 発現が細胞膜の CHOL の量や細胞内局在を変化させることで PLY への結合能を低下させている可能性を検証した。

(3) PLY 添加による細胞骨格分子動態の比較

Phalloidin を用いた F-actin 染色により、BLT2 発現が PLY 添加後の細胞骨格分子の再編成に与える影響を調べた。

(4) PLY 添加による細胞外小胞 (EVs) の放出の比較

①PLY の添加後の培養上清から超遠心により EVs を精製した。

②EVs の数は Videodrop を用いて測定した。

③EVs の透過型電子顕微鏡像は HT7700 (Hitachi) を用いて観察した。

④EVs に含まれるタンパク質は Western Blot を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) BLT2 は PLY 依存的な細胞膜障害を抑制する

BLT2 が PLY 依存的な細胞膜障害に与える影響を調べた。まず、BLT2 を過剰発現するヒト肺胞上皮細胞株 (A549 細胞) を樹立し、PLY 添加後の細胞の形態変化を走査型電子顕微鏡によって観察

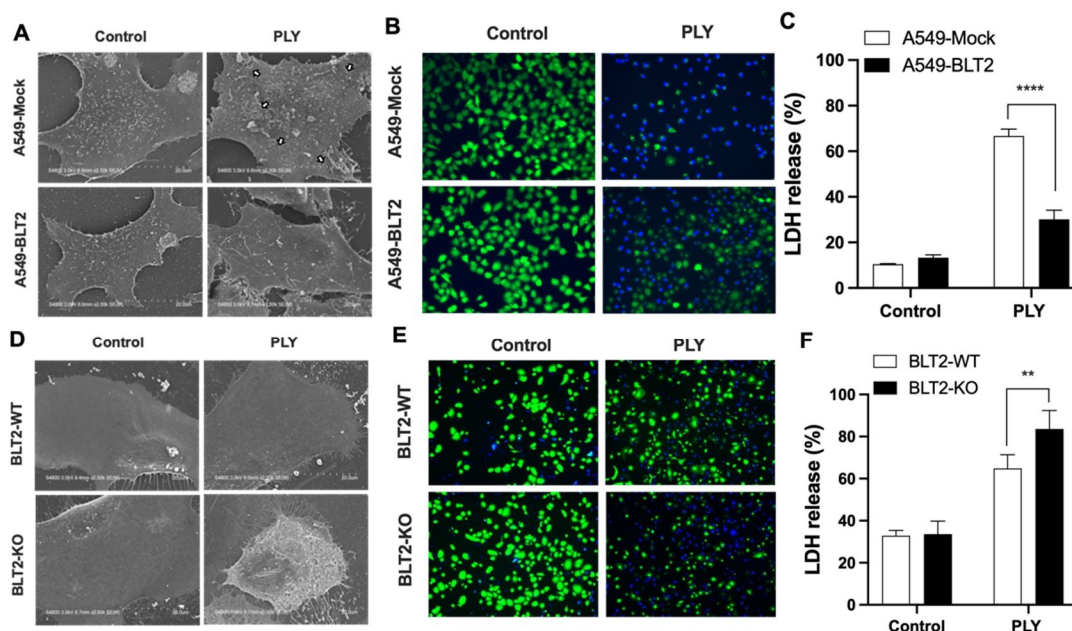


図2: (A-C) BLT2の過剰発現はヒト肺胞上皮細胞(A549)においてPLY依存的な細胞死を抑制する。(A)走査型電子顕微鏡写真: Mock細胞ではPLY添加後細胞が膨張し、細胞膜障害される像(矢印)が観察されたのに対し、BLT2過剰発現細胞では膜障害が抑制されていた。(B) Calcein-AM/DAPI共染色: 細胞質に取り込ませたCalcein(緑)は、細胞膜が障害されると細胞外に放出され蛍光が低下する。一方DAPI(青)は、細胞膜の障害された、細胞内に流入し核が染まる。BLT2の発現により細胞膜から漏れた緑の蛍光低下が抑制された。(C) LDHの漏出測定: BLT2の発現によりPLY添加によるLDHの漏出が抑制された。(D-F) BLT2欠損角化細胞ではPLY依存的な細胞障害が亢進する。(D) PLY添加によりBLT2欠損角化細胞膜が大きく障害されている様子が観察された。BLT2欠損によりPLY依存的な緑蛍光の低下(Calceinの漏出亢進)が観察され(E)、LDHの漏出が増加した(F)。

(図 2A)、Calcein-AM/DAPI 染色 (図 2B) や LDH の漏出測定 (図 2C) を用いて細胞膜障害を評価したところ、BLT2 発現によって PLY 依存性の細胞膜障害が抑制されることを見いだした。次に、内在性に発現する BLT2 も同様の細胞膜障害抑制を示すかを検証するため、BLT2 欠損マウスから単離培養した角化細胞を用いて同様の実験を行なったところ、BLT2 の欠損により PLY 依存性の細胞膜障害が亢進することが明らかとなった (図 2D-E)。さらに、BLT2 拮抗薬で前処理することによって、BLT2 発現細胞の PLY に対する抵抗性は完全に消失した。これらの結果から、BLT2 は PLY による細胞膜障害を抑制し、保護的に機能していると考えられる。

(2) BLT2 発現は細胞の PLY 結合能に影響を与えない

肺炎球菌が産生する毒素である PLY は、肺炎球菌が死んだ際に漏出し、細胞膜の CHOL に結合して多量体を形成し、細胞膜を穿孔して細胞死を引き起こすことが試験管内の実験で確かめられている。BLT2 の発現により、細胞膜の CHOL 量や局在が変化している可能性を考えた。Amplex red cholesterol assay によって A549 細胞の CHOL を定量したところ、BLT2 を過剰発現しても CHOL の量は変化しないことが明らかとなった。また、Filipin III で染色した後に蛍光顕微鏡観察を行ったが、BLT2 の発現は CHOL の細胞内局在にも影響を与えないことが明らかとなった。また、PLY 添加して洗浄した後の細胞に結合している PLY の量をウェスタンブロッティングにて定量したが、BLT2 発現細胞の PLY の結合能にも影響を与えないことが明らかとなった。これらの結果から、BLT2 は CHOL の量や分布に影響を与えないこと、BLT2 の保護作用は PLY への結合低下によるものではないことが明らかとなった。

(3) BLT2 の細胞障害保護作用にはカルシウムの流入が必要である

PLY によって細胞膜が穿孔されると、PLY の孔を介して細胞外の Ca^{2+} が細胞内へ流入することが知られている。そこで、BLT2 の細胞膜障害保護作用に、細胞外から Ca^{2+} の流入が必要か否かを調べた。 Ca^{2+} 不含培地もしくは EGTA を添加した通常の培地を用いて PLY 依存性の細胞障害の程度を比較した。その結果、 Ca^{2+} 含有培地で観察された BLT2 の保護作用は Ca^{2+} を枯渇させると消失することが明らかとなった。さらに、Phalloidin を用いて細胞骨格分子である F-actin を染色したところ、BLT2 発現細胞では PLY 添加によって F-actin の再重合が亢進する様子が観察された。また、細胞外の Ca^{2+} を枯渇させると、この F-actin の再重合は消失した。これらの結果から、BLT2 発現細胞では Ca^{2+} 流入依存性の細胞骨格分子の再重合が亢進することによって細胞膜障害の修復を促進することが明らかとなった。

(4) BLT2 は EVs の放出亢進により細胞膜の修復を促進し、PLY 依存性の細胞死を抑制している

細胞膜障害を受けた場所では細胞外の Ca^{2+} が流入するため、それが引き金となって障害された細胞膜が除去されて修復されることが知られている。そこで、PLY により障害された細胞膜を BLT2 が積極的に EVs に乗せて放出し、修復しているのではないかと考えた。Mock 細胞と比較して BLT2 過剰発現細胞では EVs の放出数が多く、EVs には PLY の形成する孔が多数観察された。また、阻害剤により EVs の放出を抑制すると、BLT2 の保護作用は消失した。これらの結果から、BLT2 は PLY によって障害された細胞膜を EVs として放出することで細胞膜の修復を促進し、細胞膜障害を抑制していることが明らかになった。

本研究では、上皮細胞に高発現する BLT2 が、PLY 依存性の上皮細胞膜障害による細胞死を抑制することを見いだした。BLT2 による細胞膜障害への抵抗性は、PLY の細胞表面への結合低下によるのではなく、毒素が形成した孔からの Ca^{2+} の流入を引き金とする細胞膜修復の亢進に依存していた。PLY による膜孔形成後、BLT2 の発現細胞では PLY 孔を含む EVs の放出や細胞骨格分子の再編成が促進されており、BLT2 は創傷膜を切り取って修復する機構を亢進させることで、細胞死を抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuan Chi, Kazuko Saeki and Takehiko Yokomizo
2. 発表標題 Leukotriene B4 receptor type 2 enhances cell membrane repair and protects cell death caused by pore forming agent
3. 学会等名 The 8th annual meeting of the Japanese society for extracellular vesicles
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuan Chi, Kazuko Saeki and Takehiko Yokomizo
2. 発表標題 Protective roles of leukotriene B4 receptor type 2 on pore forming toxin-induced cell membrane damage
3. 学会等名 The 94th annual meeting of the Japanese biochemical society
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------