

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 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：2015～2016

課題番号：15H06604

研究課題名(和文)急性肺傷害におけるロイコトリエンB4第二受容体BLT2の肺保護作用

研究課題名(英文)Protective role of leukotriene B4 receptor type 2 in acute lung injury

研究代表者

重松 美沙子 (Shigematsu, Misako)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤助手

研究者番号：60760303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ロイコトリエンB4第二受容体(BLT2)の肺における役割を明らかにする目的で、BLT2欠損マウスを用いた病態モデルとして肺炎球菌毒素ニューモライシン(PLY)誘導性急性肺傷害モデルを作成し、BLT2欠損マウスの表現型を解析した。肺におけるBLT2シグナルの存在がシステイニルロイコトリエン受容体CysLT1の肺血管内皮における発現を抑制し、PLYによって大量に産生されたシステイニルロイコトリエン類への感受性を低減させることにより保護的な役割を示すことを明らかにした。加えて、肺炎球菌性肺炎の早期における急性肺傷害の新たな治療戦略としてCysLT1拮抗薬の可能性を提起した。

研究成果の概要(英文)：In this study we explored the roles of leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) in the lung using an acute lung injury model induced by a pneumococcal toxin, pneumolysin (PLY). BLT2 signaling plays important role in protecting against the PLY-induced acute lung injury by suppressing cysteinyl leukotrienes receptor (CysLT1) expression in lung endothelial cells, and by attenuating the susceptibility to PLY-dependently produced cysteinyl leukotrienes. Additionally, CysLT1 antagonists that currently used as anti-asthmatic drugs will be beneficial to treat acute lung injury in the early phase of pneumococcal pneumonia.

研究分野：生化学

キーワード：急性肺傷害 脂質受容体 ロイコトリエン ニューモライシン モンテルカスト

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎は世界中で死因の上位に挙げられる疾患であり、日本においてもその死亡率は年々増加し、平成 23 年以降は死因の第 3 位を占めている(死亡者数、12 万人超/年)。肺炎球菌は感染性肺炎の主要な起因菌であり、その細胞質中に含まれる主な毒素タンパク質であるニューモライシン(PLY)は、肺炎の予後を増悪させる因子として知られる(Wheeler, *J Med Microbiol*, 1999)。PLY は肺胞上皮に対して直接的な細胞傷害作用を有しており、肺における局所炎症の増悪や菌体の血液内への侵入を促進することにより感染症の重篤化を引き起こす。また肺炎球菌を感染させたマウス病態モデルにおいて、アスピリン投与により致死率が増悪することが過去に報告されている(Esposito AL, *Am Rev Respir Dis*, 1984)が、その分子機序は不明である。

BLT2 は当初、生理活性脂質ロイコトリエン B4(LTB4)の低親和性受容体として当研究室において同定されたが(Yokomizo, *J Exp Med*, 2000)、のちに当研究室の奥野らにより、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)を介して産生される 12-HHT がより親和性の高い内在性リガンドであることが明らかとなった(Okuno, *J Exp Med*, 2008)。さらに当研究室では、BLT2 遺伝子を全身性に欠損するマウスを作製・解析し、腸管上皮におけるバリア機能の維持(Iizuka, *Faseb J*, 2010)、および皮膚における創傷治癒の促進(Liu, *J Exp Med*, 2014)に BLT2 が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。さらに近年、BLT2 遺伝子欠損マウスを用いたアレルギー性喘息モデルにおいて、病態が増悪することも報告した(Matsunaga, *Faseb J*, 2013)。これらの背景をもとに、急性肺傷害モデルを用

いて BLT2 の肺における役割を検討することにした。PLY 組換えタンパク質を大腸菌を用いて過剰発現し、精製後にマウスの気管内に投与したところ、BLT2 欠損マウスで野生型マウスに比して明らかな致死率の上昇が認められた(図 1. )。一方、PLY を血管内投与しても致死的影響は認められず(図 1. )、PLY が肺局所において傷害性を発揮し、BLT2 が欠損することにより致死的事となることが示唆された。こうした予備検討の結果から、マウス肺における PLY 誘導性急性肺傷害に対し BLT2 が保護的な役割を果たすことが推定された。

### 2. 研究の目的

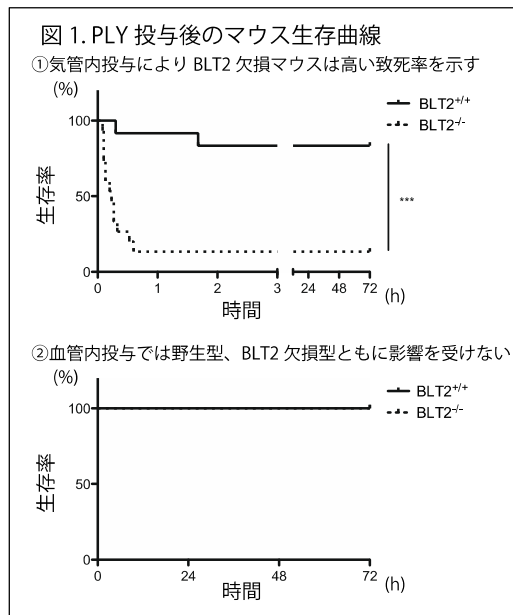
ロイコトリエン B4 第二受容体 BLT2 は、腸管や皮膚の上皮細胞に発現する G タンパク質共役型受容体である。BLT2 は、アラキドン酸から生合成される脂肪酸・12-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸(12-HHT)を内在性リガンドとし、これまでに腸管上皮のバリア機能維持や皮膚の創傷治癒の促進に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかしながら、その他の器官における BLT2 の役割については不明な点が多い。本研究では、腸管や皮膚と同様に外界と接する器官である肺に着目して 12-HHT/BLT2 経路の機能解析を行う。具体的には、病態モデルとして、肺炎球菌由来の毒素タンパク質であるニューモライシン(PLY)誘導性の急性肺傷害モデルを作成し、BLT2 欠損マウスの表現型を解析することで 12-HHT/BLT2 の肺における機能を明らかにする。

なお、これまでに急性肺傷害に着目した研究は数多く行われてきたが、その多くは発症から死亡までに数時間ないし数日を要するものである。本研究では、図 1. に示す通り PLY 投与後 BLT2 欠損マウスは数分から数十分程度と非常に短い経過時間で死亡に至っている一方、野生型マウスはほとんど死亡しておらず、12-HHT/BLT2 経路が PLY 誘導性急性肺傷害において甚だ重要な役割を占めることが示唆される。12-HHT の産生は NSAIDs により阻害されるため、12-HHT/BLT2 経路の遮断は我々の体内においても生じうるものと考えられる。

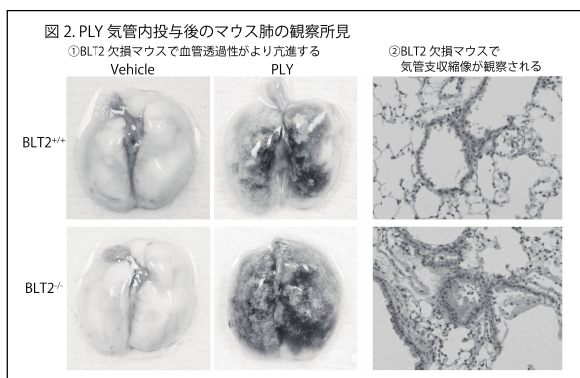
肺炎球菌を起因菌とする肺炎の罹患率および死亡率は高く、その重症度や進行への BLT2 および 12-HHT の関わりが明らかとなれば、創薬研究および臨床における治療法等への応用も期待できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

予備検討段階で、BLT2 欠損マウスにおいて PLY 誘導性急性肺傷害による致死率の著明な上昇が認められた(図 1. )ことに加え、PLY



投与後の BLT2 欠損マウスの肺において野生型と比較してより強い血管透過性亢進(図 2.)が認められた。さらに、BLT2 欠損マウスでは PLY 投与後の肺組織標本において気管支収縮(図 2.)が認められたが、野生型では気管支収縮像は認められなかった。これらの知見を踏まえ、以下に挙げる項目について研究を遂行する。



(1)野生型マウスと BLT2 欠損マウス肺の構造・機能の比較。

定常時および PLY 投与後の肺胞構造、肺における遺伝子発現、PLY 投与後の傷害の程度や PLY に対する反応性に着目し、定量的 PCR、組織染色(HE、PAS)、肺胞洗浄液の解析により比較検討する。また気道抵抗などの生理学的パラメータについても測定する。

(2)マウス肺における BLT2 発現細胞の同定。

肺を構成する種々の細胞(肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、気道平滑筋細胞など)のうち、BLT2 を発現する細胞を同定する。また BLT2 発現細胞のうち PLY 投与後の急性肺傷害の増悪に強く寄与する細胞を特定し、その働きについて検証する。

(3)BLT2 欠損マウスにおける PLY 投与後の強い血管透過性亢進および気管支収縮を説明しうるメカニズムの解明。

こうした気道の変化を生じさせる物質としてヒスタミンやシステイニルロイコトリエン類(cysLTs)が想定される。PLY 投与後の肺での産生量を測定し、感受性の差について検討する。

(4)PLY 誘導性急性肺傷害における 12-HHT 産生阻害の影響。

NSAIDs は臨床において一般的に使用されているが、これらはシクロオキシゲナーゼを阻害することにより 12-HHT 産生を阻害する。NSAIDs をあらかじめ野生型マウスに投与することにより 12-HHT/BLT2 シグナルを遮断した場合に、BLT2 欠損マウスと同様の PLY 感受性の亢進が認められるかどうか検証する。

#### 4. 研究成果

(1)野生型マウスと BLT2 欠損マウスの定常状態における比較では、肺の構造については光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察で明らかな変化は認められなかった。肺サーファクタントタンパク質について、マウス肺より単離した肺胞上皮 II 型細胞におけるサーファクタントタンパク質 A, B および C の mRNA 発現に野生型、BLT2 欠損マウス間で差を認めなかった。主なサーファクタント脂質であるホスファチジルコリンの気管支肺胞洗浄液中の濃度にも、野生型、BLT2 欠損マウス間で差を認めなかった。また、ムチン、接着因子、増殖・分化に関わる細胞内シグナル分子の発現についても、肺組織染色、定量的 PCR 法、マイクロアレイ法を用いた検討の結果、差を認めなかった。

PLY 投与後の肺胞出血の有無について組織切片の観察を行ったが、野生型、BLT2 欠損マウスともに明らかな出血は認められず、本研究で採用した PLY 投与量(50 ng/mouse)では、予備検討で観察された気管支収縮像(図 2.)は BLT2 欠損マウスでのみ認められたものの、肺胞出血は生じなかった。一方、PLY 投与後の気管支肺胞洗浄液の解析により、野生型と比較して BLT2 欠損マウスで総タンパク質、アルブミン濃度および LDH 活性値が上昇しており、より重篤な肺傷害を生じていることが認められた。さらに、気道の変化を flexiVent を用いて定量的に測定すると、PLY 投与後、BLT2 欠損マウスにおいてのみ、継続的な気道抵抗値および弾性抵抗値の上昇が認められた。これらの抵抗値の上昇は、PLY 投与後の BLT2 欠損マウス肺で認められた血管透過性亢進(図 2.)および気管支収縮像(図 2.)に伴う変化として矛盾しないものである。

(2)マウス肺切片を用いて免疫組織染色を行ったところ、BLT2 は抗 proSP-C 抗体陽性の肺胞上皮 II 型細胞および抗 CD31 抗体陽性の血管内皮細胞において発現が認められた。一方、抗 T1 $\alpha$ 抗体陽性の肺胞上皮 I 型細胞では発現を認めなかった。本研究に用いた抗マウス BLT2 抗体は当研究室で作製したものであるが、肺胞上皮 II 型細胞、血管内皮細胞ともに BLT2 欠損マウスの肺組織標本では BLT2 染色が陰性であったことより、抗マウス BLT2 抗体の特異性も確認された。肺胞上皮 II 型細胞の主な働きであるサーファクタント産生には BLT2 欠損の影響は認められなかった一方、PLY 投与後の BLT2 欠損マウスにおいて強い血管透過性亢進が認められたことより、BLT2 欠損による急性肺傷害の増悪には血管内皮細胞がより深く関与していることが示唆される。

(3)マウスの気管支肺胞洗浄液および肺組織中に含まれる、エイコサノイドを中心とした

生理活性脂質について、液体クロマトグラフィ質量分析法(LC-MS/MS)を用いて一斉定量した結果、対象実験と比較してPLY投与により大量のロイコトリエン C4、ロイコトリエン D4、ロイコトリエン E4(LTC4, LTD4, LTE4、総称としてシステニルロイコトリエン類、cysLTs)が産生されることが明らかとなった。cysLTsは強い気管支収縮作用および血管透過性亢進作用を示し、喘息発作への関与がよく知られている生理活性脂質であり、PLY投与後の産生量はcysLTs受容体を活性化できる濃度を十分に超えていた。LTB4および12-HETEもPLY投与後の増加が認められたが、その産生量はcysLTsに比して非常に少なかった。プロスタグランジン、12-HHTは対象実験でも検出されており、PLY投与後の産生量の上昇は認めなかった。なお、野生型マウスおよびBLT2欠損マウス間におけるcysLTs産生量の差は認められなかった。

cysLTsを産生する細胞の条件として5-リポキシゲナーゼおよびLTC4産生酵素をとともに発現することが必要であるが、*in vitro*で骨髄由来マスト細胞をPLYで刺激すると大量のLTC4を産生したことより、PLY投与後のマウス肺における主なcysLTs産生細胞は肺マスト細胞であることが示唆された。マスト細胞はBLT2を発現することが過去の報告により明らかとなっているが、肺組織中のマスト細胞の細胞数、局在に野生型マウス、BLT2欠損マウス間で差は認められず、マスト細胞マーカー遺伝子(ヒスチジン脱炭酸酵素、キマーゼ、トリプターゼ、カルボキシペプチダーゼ、幹細胞因子受容体)のmRNA発現量にもBLT2欠損による変化は認められなかったことより、BLT2欠損マウスのマスト細胞の増殖・分化は正常であることが示された。

(4)野生型、BLT2欠損マウス間でPLY投与後のcysLTs産生量には差が認められない一方、感受性には大きな差を認めることから、マウス肺よりCD31陽性血管内皮細胞を単離しcysLTsの主要な受容体であるCysLT1のmRNA発現量を比較した。CD31陰性細胞では野生型、BLT2欠損マウス間でCysLT1発現量に差は認められなかった一方、血管内皮細胞ではBLT2欠損マウスにおいて野生型に比べCysLT1発現量の上昇が認められた。

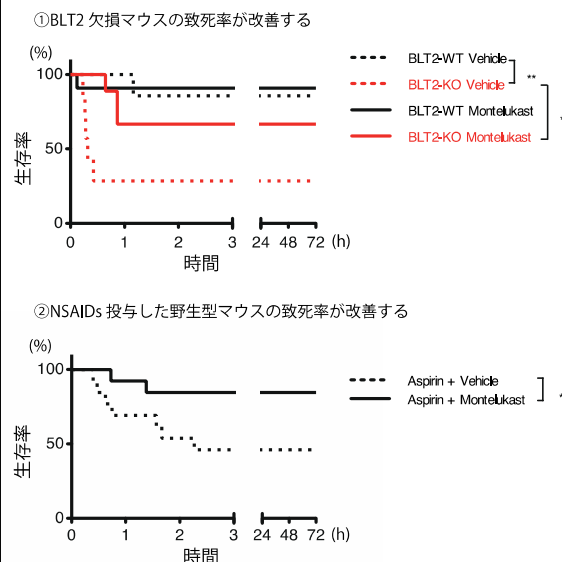
BLT2およびCysLT1をとともに内在性に発現するヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECを用い、BLT2拮抗薬LY255283処理により12-HHT/BLT2シグナルを遮断したところ、CysLT1の有意な発現上昇が認められた。さらに、HUVECの細胞シート上下の電気抵抗値(TER; transepithelial electrical resistance)は、対象実験と比較してLY255283処理後の細胞においてLTD4刺激後に低下することが認められ、12-HHT/BLT2シグナル遮断によるCysLT1発現上昇に伴いcysLTsに対する感受性が増強することが確認された。

(5)CysLT1選択的拮抗薬としてすでに臨床において気管支喘息およびアレルギー性鼻炎の治療薬として使用されているモンテルカストをマウスに投与することにより、PLY投与による致死性と、cysLTs/CysLT1シグナルとの関連性について検討した。

モンテルカストを事前に経口投与したのちPLY投与すると、BLT2欠損マウスの致死率は対象実験に比べ有意に改善が認められた(図3)。さらに、PLY誘導性の血管透過性亢進は、野生型、BLT2欠損マウスともにモンテルカスト前投与により完全に抑制された。また、BLT2欠損マウスでのみ認められたPLY投与後の気道抵抗値および弾性抵抗値の上昇も、モンテルカストの前投与により消失した。

(6)BLT2の内在性リガンド12-HHTはシクロオキシゲナーゼ依存的に産生されることより、野生型マウスにNSAIDsを投与し12-HHT産生阻害を行った。アスピリン、ロキソプロフェンをそれぞれ前投与すると、PLY投与による致死率は対象実験と比較していずれも有意に上昇した。さらに、アスピリン投与マウスにモンテルカストを重ねて投与したところ、PLY投与後の致死率に有意な改善が認められた(図3)。

図3. モンテルカスト前投与による改善効果



過去に肺炎球菌感染症のマウスモデルにおいて、アスピリン投与により重篤化することが報告されているのに加え、近年、ヒトの肺炎球菌性肺炎の感染早期におけるNSAIDs投与が、感染症の重症化をもたらすことが報告されたが、いずれも詳細な機序は不明である。本研究は、上述の結果より、肺における12-HHT/BLT2シグナルの存在がCysLT1の肺血管内皮における発現を抑制し、PLYによって大量に産生されたcysLTsへの感受性を低減

させることにより保護的な役割を示すことを新たに明らかにするものであり、これらの結果は、ヒトおよびマウスで報告された、NSAIDs 投与が肺炎球菌感染症の重症化に与える影響についてのメカニズムの一端を説明しうるものであると考える。

加えて本研究結果より、肺炎球菌性肺炎の早期における急性肺傷害の新たな治療戦略として CysLT1 選択的拮抗薬の可能性を提起するものである。

12-HHT/BLT2 シグナルと CysLT1 の発現調節に関する詳細な分子メカニズムは、過去の報告も含め、現在のところ明らかではなく、さらなる解明が必要である。

## 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1件)

Misako Shigematsu, Tomoaki Koga, Ayako Ishimori, Kazuko Saeki, Yumiko Ishii, Yoshitaka Taketomi, Mai Ohba, Airi Jo-Watanabe, Toshiaki Okuno, Norihiro Harada, Takeshi Harayama, Hideo Shindou, Jian-Dong Li, Makoto Murakami, Sumio Hoka, Takehiko Yokomizo. Leukotriene B4 receptor type 2 protects against pneumolysin-dependent acute lung injury. Scientific Reports, 査読有り, 2016, DOI: 10.1038/srep34560.

[学会発表](計7件)

Misako Shigematsu, Tomoaki Koga, Kazuko Saeki, Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo. BLT2 receptor protects against lethal acute lung injury induced by a pneumococcal toxin pneumolysin. Experimental Biology, 2016年4月, San Diego, USA.

Takehiko Yokomizo, Yumiko Ishii, Misako Shigematsu, Kazuko Saeki, Toshiaki Okuno. 12-hydroxyheptadecatrienoic acid (12-HHT) as a novel lipid mediator. 日本脂質生化学会、2016年6月、にぎわい交流館 AU、秋田県秋田市

Misako Shigematsu, Tomoaki Koga, Kazuko Saeki, Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo. The roles of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid/BLT2 axis in skin. International Conference on the Bioscience of Lipids, 2016年9月, Chamonix-Mont-Blanc, France.

Misako Shigematsu, Tomoaki Koga, Kazuko Saeki, Mai Ohba, Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo. Protective roles of 12-hydroxyheptadecatrienoic

acid/BLT2 in acute lung injury. Keystone Symposium, Lipidomics and Bioactive Lipids in Metabolism and Disease, 2017年2月, Granlibakken Tahoe, USA.

Kazuko Saeki, Misako Shigematsu, Tomoaki Koga, Mai Ohba, Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo. 12-HHT/BLT2 axis protects against pneumolysin-dependent acute lung injury. Keystone Symposium, Integrating Metabolism and Immunity, 2017年5月, Dublin, Ireland

[図書]

[産業財産権]

[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

重松 美沙子 (SHIGEMATSU, Misako)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：60760303

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者