

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790296

研究課題名（和文） 新規生理活性脂質12-HHTの生理機能の解明

研究課題名（英文） Identification of physiological roles of a new lipid mediator, 12-HHT

研究代表者

奥野 利明（OKUNO TOSHIAKI）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60361466

研究成果の概要（和文）：12-ヒドロキシ-エノイック酸(12-HHT)はBLT2受容体の生体内リガンドとして見出された新規の生理活性脂質である。BLT2欠損マウスは大腸炎モデルにおいて、炎症症状が重篤化した。BLT2を過剰発現したMDCK細胞は上皮間抵抗値(TER)の上昇とFITC-デキストランの漏れ込みの低下を示した。従って、BLT2は上皮細胞間のバリア機能を亢進することにより、腸内細菌の浸潤を抑制すると推定される。

研究成果の概要（英文）：12-HHT is a new lipid mediator which was identified as a natural ligand for BLT2. BLT2-deficient mice exhibited severe intestinal inflammation in mice colitis model. MDCK cells transfected with BLT2 exhibited enhanced barrier function as measured by transepithelial electrical resistance (TER) and FITC-dextran leakage. Thus, BLT2 appears to protect against colitis, possibly by enhancing barrier function in epithelial cells of the colon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：生理活性脂質、受容体

1. 研究開始当初の背景
ロイコトリエン B4(LTB4)は強力な白血球走化性因子として古くから知られている生理活性脂質である。研究代表者らは、LTB4の高親和性受容体BLT1と低親和性受容体BLT2を遺伝子同定し、シグナル伝達機構の解明や遺伝

子欠損マウスを用いた生理機能解析を行っている。白血球活性化や走化性因子としてのLTB4の機能はBLT1を介していること、またエフェクターT細胞の走化性誘導、Th2型免疫反応の形成や抗体産生にBLT1が促進的に作用することが明らかにされている(Okuno, J.

Biol. Chem., 2005)。

一方、BLT2 の生理機能は良くわかっていない。BLT2 の活性化には高濃度の LTB4 を必要としたため、我々は LTB4 以外の内源性リガンドの存在を想定し、生体試料を用いた天然リガンドの探索を行った。ラット小腸の脂質抽出物が BLT2 過剰発現 CHO 細胞を強く活性化をすることを見出し、BLT2 活性化画分を生化学的に精製し、質量分析計を用いて構造決定を行った結果、BLT2 の内源性リガンドが炭素数 17 の不飽和脂肪酸である 12(S)-ヒドロキシ-ヘプタデカトリエン酸(12-HHT)であることを発見した(Okuno, *J. Exp. Med.*, 2008)。

長年、12-HHT はトロンボキサン A2 (TxA2) の産生時に生成される、生理活性を有さない単なる副産物と考えられてきた。12-HHT は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX) 依存的に合成されるプロスタグランジン H2 (PGH2) を前駆体として生合成される。12-HHT は、PGH2 から (TxA2) 合成酵素 (TxA2S) 依存的に、TxA2 とほぼ等量産生されると考えられているが、TxA2S 非依存的な合成経路の存在も示唆されており、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

12-HHT とその受容体である BLT2 の生理機能の解明を目的として、本研究では主に BLT2 遺伝子欠損マウスを用いた炎症性腸炎モデルの表現型解析を行った。

3. 研究の方法

デキストラン硫酸塩 (DSS) を 1% 溶解させた飲用水を用いて、野生型マウスと BLT2 遺伝子欠損マウスを飼育した。病態の程度は、体重減少の経時的測定、腸組織切片の観察、腸ホモジネートの MPO 活性、サイトカイン産生 (IFN- γ , TNF- α , IL-6)、STAT3 のリン酸化で評価した。また、バリア機能の評価は、上皮細胞間抵抗値 (TER) と FITC-デキストランの漏れ込みを指標に BLT2 を過剰発現させた MDCK 細胞を用いて行った。

4. 研究成果

マウス BLT2 が腸管や皮膚で発現しているため、DSS 誘発性の腸炎モデルを作製したところ、BLT2 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて顕著な体重減少を示し、腸組織における MPO 活性の上昇や炎症性サイトカインの顕著な発現上昇が観察された。腸重篤な炎症症状を示した。

in situ hybridization の結果、BLT2 が腸管の上皮細胞に発現していたため、BLT2 の

バリア機能への関与を検討した。BLT2 を過剰発現させた MDCK 細胞は、コントロール細胞に比べて高い上皮細胞間抵抗値 (TER) と低い FITC-デキストランの漏れ込みを呈した。従って BLT2 は腸管上皮細胞のバリア機能の維持や強化に関わり、BLT2 欠損マウスではバリア機能の低下による腸内細菌の大腸間質部への浸潤とマクロファージなどの炎症性細胞の活性化によって、炎症が増悪化していると考えられた (Iizuka, Okuno, *FASEB J.*, 2010)

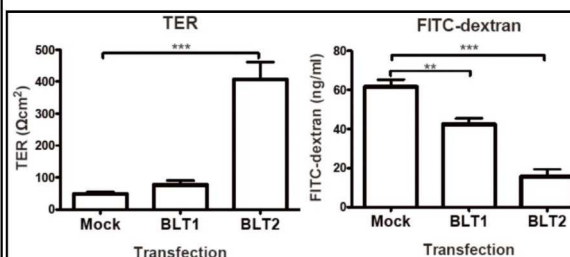


図 BLT2 過剰発現 MDCK 細胞はバリア機能が亢進する

以上の結果は、BLT2 が腸管の上皮細胞のバリア機能を強化することで、腸内細菌の浸潤を抑制し、抗炎症的に作用すると考えられる。以上のことから、未だに有力な治療法のない炎症性腸疾患において、BLT2 アゴニストが有力な治療薬となり得ることが示唆される。

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 4 件)

1. Sasaki F, Okuno T, Saeki K, Liu Min, Onohara N, Kato H, Shimizu T, Yokomizo T. A high-affinity monoclonal antibody against the FLAG tag useful for G-protein coupled receptor study. *Analytical Biochemistry*. (2012) 425, 157-165 (査読あり)
2. Okuno T* and Yokomizo T: What is the natural ligand of GPR55? *Journal of Biochemistry*. 149(5), p. 495-497 (2011) (査読あり)
3. Iizuka Y, Okuno T, Saeki K, Uozaki H, Okada S, Misaka T, Sato T, Toh H, Fukayama M, Takeda N, Kita Y, Shimizu T, Nakamura M, and Yokomizo T. Protective role of leukotriene B4 receptor BLT2 in murine model of inflammatory colitis. *Faseb J.* 24, 4678-4690, 2010(査読あり)
4. 奥野利明、横溝岳彦：オーファン GPCR

の脂質リガンド同定戦略と課題、実験医学増刊号, 28, 3373-3377, 2010(査読なし)

[学会発表] (計 39 件)

1. Okuno T. and Yokomizo T.: Roles of BLT2 receptor in murine inflammatory colitis. Keystone Symposia, Banff, Alberta, Canada, Feb 19, 2012
2. Aratake Y, Okuno T., Yokomizo T. Helix 8 of leukotriene B4 receptor type 1 (BLT1) inhibits LTB4-induced internalization of BLT1. Keystone Symposia, Banff, Alberta, Canada, Feb 18, 2012
3. Koga T., Sasaki F., Saeki K., Okuno T., Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subset. (Oral award). The 9th Global COE International Symposium & 8th Young Investigators Forum, 2012/1/21, 2012, Fukuoka
4. 古賀友紹, 佐伯和子, 佐々木文之, 奥野利明, 横溝岳彦 BLT1 は樹状細胞の新規マーカー分子となりうるか?. 第 8 回東京呼吸器リサーチフォーラム, 2011 年 11 月 19 日, 2011, 東京
5. Morisaki Y., Sasaki F., Aratake Y., Okuno T., Saeki K., Yokomizo T. Improved immunoprecipitation method for epitope-tagged GPCRs. The 10th JBS Biofrontier Symposium, 2011/11/14-16, 2011, Fukuoka
6. Okuno T., Yokomizo T. 12-HHT is a natural ligand for BLT2. The 10th JBS Biofrontier Symposium, 2011/11/14-16, 2011, Fukuoka
7. Sasaki F., Koga T., Saeki K., Okuno T., Yokomizo T. Expression of an LTB4 receptor BLT1 in M2 macrophages. The 10th JBS Biofrontier Symposium, 2011/11/14-16, 2011, Fukuoka
8. Yokomizo T., Liu M., Saeki K., Okuno T. Two distinct leukotriene B4 receptors: BLT1 and BLT2. The 10th JBS Biofrontier Symposium, 2011/11/14-16, 2011, Fukuoka
9. Koga T., Sasaki F., Saeki K., Okuno T., Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subsets. The 10th JBS Biofrontier Symposium, 2011/11/14-16, 2011, Fukuoka
10. Matsunobu T., Okuno T., Yokomizo T. Two distinct pathway for biosynthesis of 12-HHT, a ligand for BLT2. The 10th JBS Biofrontier Symposium, 2011/11/14-16, 2011, Fukuoka
11. Liu M., 佐伯和子, 奥野利明, 横溝岳彦 Crucial role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in epidermal wound healing. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 2011, 京都
12. 佐々木文之, 奥野利明, 佐伯和子, 横溝岳彦 GPCR の免疫沈降に有用な新規抗 FLAG 抗体の樹立と本抗体を用いた新規 GPCR 結合タンパク質の探索. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 2011, 京都
13. 佐伯和子, 劉珉, 岡元冬樹, 奥野利明, 横溝岳彦 二つのロイコトリエン B4 受容体 (BLT1, BLT2) のシグナルと病態生理機能. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム, 2011 年 9 月 21-24 日, 2011, 京都
14. 奥野利明, 石谷太, 横溝岳彦 ゼブラフィッシュのロイコトリエン B4/12-HHT 受容体の同定. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 2011, 京都
15. 松延武彦, 奥野利明, 横溝岳彦 Two distinct pathways for biosynthesis of 12-HHT, a ligand for BLT2. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 2011, 京都
16. 森崎雄一, 佐々木文之, 荒武良総, 奥野利明, 佐伯和子, 横溝岳彦 Improved immunoprecipitation method for epitope-tagged GPCRs. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 2011, 京都
17. 荒武良総, 奥野利明, 横溝岳彦 Helix 8 of the leukotriene B4 receptor type 1 inhibits ligand-induced internalization. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 2011, 京都
18. Morisaki Y, Sasaki F, Aratake Y, Okuno T., Saeki K, Yokomizo T, Improved immunoprecipitation methods for epitope-tagged GPCRs, 第 6 回 GCOR 理医連携リトリート, 2011 年 8 月 5 日, 阿蘇
19. Min Liu, Kazuko Saeki, Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo, Crucial role of the 12-HHT receptor BLT2 in epidermal wound healing, 第 6 回 GCOR 理医連携リトリート, 2011 年 8 月 5 日, 阿蘇

20. 佐々木文之、佐伯和子、奥野利明、横溝岳彦、M2 マクロファージにおける BLT1 の発現と機能解析、第 6 回 GCOR 理医連携リトリート、2011 年 8 月 5 日、阿蘇
21. Koga T, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T, BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subsets, 第 6 回 GCOR 理医連携リトリート、2011 年 8 月 5 日、阿蘇
22. 松延武彦、奥野利明、横溝岳彦、エイコサノイド一斉定量系の樹立と 12-HHT 産生経路、第 6 回 GCOR 理医連携リトリート、2011 年 8 月 5 日、阿蘇
23. 松延武彦、奥野利明、横溝岳彦 ロイコトリエン B4 第二受容体 BLT2 の新しいリガンド 12-HHT の生合成機構の解明. 第 53 回日本脂質生化学会、2011 年 5 月 12-13 日、2011、東京
24. Okuno T., Iizuka Y., Saeki K., Yokomizo T. Roles of 12-HHT/LTB4 receptor, BLT2 in murine inflammatory colitis. *Experimental Biology*, 2011/4/9-13, 2011, Washington DC
25. Sasaki F., Saeki K., Okuno T., Yokomizo T. Generation of monoclonal antibodies specific for mouse leukotriene B4 receptor 1 and N-terminal FLAG sequence. *Experimental Biology*, 2011/4/9-13, 2011, Washington DC
26. Fumiyuki Sasaki, Kazuko Saeki, Toshiaki Okuno and Takehiko Yokomizo: Generation of monoclonal antibody for mouse leukotriene B₄ receptor 1, 7th Global-COE International Symposium and 6th Young Investigators Forum, Singapore, Feb 9-14, 2011
27. Yokomizo T, Okuno T, Iizuka Y, Shimizu T: Roles of leukotriene B4 receptors in inflammation and immunity. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会シンポジウム、神戸、2010 年 12 月 7-10 日
28. 荒武良総、奥野利明、横溝岳彦、ロイコトリエン B4 第一受容体 BLT1 のインターナリゼーションにおけるヘリックス 8 の役割、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
29. 岡元冬樹、佐伯和子、奥野利明、山崎晶、横溝岳彦、マクロファージ食食におけるロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) の機能解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
30. 奥野利明、飯塚佳子、佐伯和子、清水孝雄、中村元直、横溝岳彦、マウス炎症性腸炎における 12-HHT/LTB4 受容体 BLT2 の役割、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
31. 松延武彦、奥野利明、横溝岳彦、Mechanism of biosynthesis of 12-HHT, a natural ligand for BLT2, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
32. 奥野利明、飯塚佳子、佐伯和子、清水孝雄、中村元直、横溝岳彦、炎症性腸疾患モデルから明らかになった 12-HHT/LTB4 受容体 BLT2 の抗炎症作用、第 7 回東京リサーチフォーラム、2010 年 11 月 6 日、東京
33. Yokomizo, T, Okuno, T, Shimizu, T: Leukotriene B4 receptors in inflammation and immunity. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 27, 2010 (WS)
34. Yokomizo, T, Okuno, T, Shimizu, T: Leukotriene B4 receptors in inflammation and immunity. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010 (Poster)
35. 佐々木文之、佐伯和子、奥野利明、横溝岳彦、抗マウスロイコトリエン B4 受容体モノクローナル抗体の作製とその有用性の評価、第 5 回 GCOE 理医連携リトリート、福岡、2010 年 8 月 18-20 日
36. 荒武良総、奥野利明、横溝岳彦、ロイコトリエン B4 第一受容体 BLT1 ヘリックス 8 のインターナリゼーション抑制作用の解析、第 5 回 GCOE 理医連携リトリート、2010 年 8 月 18-20 日、福岡
37. 岡元冬樹、佐伯和子、奥野利明、山崎晶、横溝岳彦、マクロファージ食食におけるロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) の機能解析、第 5 回 GCOE 理医連携リトリート、2010 年 8 月 18-20 日、福岡
38. 松延武彦、奥野利明、横溝岳彦、新規生理活性脂質 12-HHT の生合成機構の解明、第 5 回 GCOE 理医連携リトリート、2010 年 8 月 18-20 日、福岡
39. Okuno T and Yokomizo T: Identification of a natural lipid ligand for Leukotriene B4 receptor 2, BLT2,

Colorado, Keystone Symposia, April 9,
2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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