

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 3 月 31 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：22790320

研究課題名（和文）細胞増殖におけるロイコトリエン受容体シグナルの役割

研究課題名（英文）Roles of leukotriene receptor signaling in cell proliferation.

研究代表者

佐伯 和子（SAEKI KAZUKO）

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00553273

研究成果の概要（和文）：ロイコトリエン B₄(LTB₄)および 12-HHT の受容体である BLT2 の遺伝子欠損マウスを用いて、炎症性腸疾患／皮膚の創傷治癒／大腸がんの発生における BLT2 シグナルの役割を解析した。BLT2 が腸管炎症に保護的に作用すること、皮膚の創傷治癒を促進させること、大腸腫瘍の発生を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：BLT2 is a receptor for LTB₄ and 12-HHT and expressed on the epithelium of skin and intestine. To clarify the role of BLT2 in these tissues, the models of inflammatory colitis, tumorigenesis in the colon, and skin wound healing were performed. It was revealed that BLT2 suppresses inflammatory colitis and tumorigenesis in the colon and promotes skin wound healing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：生理活性脂質・GPCR・病態モデル

1. 研究開始当初の背景

LTB₄ は好中球の走化性因子として機能し、細菌感染の排除に重要な役割を果たしている。当研究室では、LTB₄ の高親和性受容体 (BLT1) と低親和性受容体 (BLT2) を同定し、解析を行っている。また当研究室では、LTB₄ よりも低濃度で BLT2 を活性化する生体内リガンドとして、12-HHT を同定した。12-HHT はシクロオキシゲナーゼ (COX) およびトロンボキサン A₂ 合成酵素 (TxA₂S) 依存的に産生されることが知られていたが、生体内での機能は不明であった。

BLT1 は、好中球やマクロファージや活性化

T 細胞などの免疫細胞に発現しており、様々な炎症反応へ寄与することが報告されている。一方、BLT2 は腸管や皮膚の上皮細胞での発現が確認されているものの、生体内での役割については全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、BLT2 欠損マウスを用いて DSS 誘導性大腸炎モデル／皮膚創傷治癒モデル／大腸がんモデルを行い、大腸および皮膚における 12-HHT/BLT2 シグナルの役割について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DSS 誘導性大腸炎モデル

これまでの予備的検討では、1%DSS を飲料水に混ぜて投与したところ、BLT2 欠損マウスで体重の減少が顕著で、大腸における炎症性サイトカインの発現亢進が観察された。BLT2 欠損による腸炎亢進のメカニズムとして、「大腸上皮のバリア機能の破綻により腸内細菌が組織内に侵入している可能性」「腸内細菌への応答性が亢進して過剰に炎症反応が起きている可能性」が想定されたため、下記の実験を行った。

MDCK 細胞に BLT2 を過剰発現させ、トランスウェル上で単層培養した後、抵抗値と FITC-Dextran の透過性を指標に、細胞間接着における BLT2 の役割を調べた。

マウスより脾臓細胞および骨髄細胞を採取し、各種表面抗原に対する抗体を用いて免疫細胞を分画または *in vitro* で分化/刺激を行い、免疫細胞における BLT2 の発現を調べた。マクロファージ様培養細胞株 (RAW264.7) に BLT2 を過剰発現させ、LPS 依存性の炎症性サイトカイン転写誘導を 12-HHT 刺激が抑制できるか、ルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。

(2) 皮膚創傷治癒モデル

野性型および BLT2 欠損マウスの背中皮膚に直径 3 mm の穴をあけ、傷の治癒する速度を経時的に測定した。また、COX 阻害剤の投与により 12-HHT 産生を阻害した場合の創傷治癒に与える影響を調べた。

野性型および BLT2 欠損マウスの皮膚組織より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

新生児マウス皮膚より表皮ケラチノサイトを単離培養してスクラッチアッセイを行い、BLT2 発現や 12-HHT 刺激がケラチノサイトの動きに与える影響を調べた。また、ヒトケラチノサイト培養細胞株 (HaCaT) に BLT2 を過剰発現させ、同様の実験を行った。

(3) 大腸がんモデル

野性型および BLT2 欠損マウスに発がん誘導物質 AOM を腹腔内投与し、1 週間後から飲料水に混ぜて DSS を 7 日間投与した。DSS 投与から 15 週間後に屠殺し、小腸や大腸に発生した腫瘍の数と大きさを測定した。

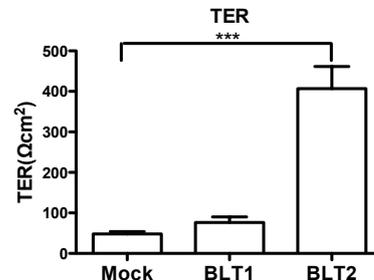
生後 3 ヶ月より腸管に腺腫が自然発生することが知られている APC^{min/+} と BLT2 欠損マウスの二重変異マウス作製し、24 週齢で屠殺して小腸や大腸に発生した腫瘍の数と大きさを測定した。

4. 研究成果

(1) DSS 誘導性大腸炎モデル

マウスよりマクロファージ/樹状細胞/B 細

胞/T 細胞などの免疫細胞を単離し、更に *in vitro* で分化/活性化を行ったが、免疫細胞における BLT2 の発現は全く観察されなかった。また、BLT2 過剰発現 RAW264.7 細胞において、12-HHT 刺激による LPS 依存性の炎症性サイトカイン産生抑制は観察されなかった。一方、MDCK 細胞では、BLT2 を発現することにより細胞間接着が亢進した。



以上のことから、腸管上皮に発現している BLT2 が、細胞間の結合を亢進させることで大腸菌の組織内への侵入を抑制し、大腸炎を防いでいる可能性が示唆された (論文⑥)。

(2) 皮膚創傷治癒モデル

BLT2 欠損マウスでは皮膚の創傷治癒が遅延した。また、COX 阻害剤投与により 12-HHT 産生を阻害すると、BLT2 を欠損した場合と同様に創傷治癒が遅延した。次に、初代培養ケラチノサイトおよび BLT2 過剰発現 HaCaT 細胞を用いて、スクラッチアッセイを行ったところ、12-HHT 依存的に細胞の移動が亢進した。更に、BLT2 欠損マウスの皮膚組織 RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、創傷治癒に寄与することが知られている、炎症性サイトカイン/ケモカイン/MMP の発現が BLT2 欠損マウスにおいて低下しており、12-HHT/BLT2 シグナルがこれらの分子の発現を制御している可能性が示唆された。

(3) 大腸がんモデル

発がん誘導物質 AOM と DSS を組み合わせた炎症誘導性大腸がんモデル、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である APC がん抑制遺伝子の変異マウスを用いた大腸がんモデルを試行した結果、BLT2 欠損により小腸および大腸のポリープ形成が亢進することが明らかとなった。

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 8 件)

- ① Sasaki F, Okuno T, Saeki K, Liu M, Onohara N, Kato H, Shimizu T, Yokomizo T. A high-affinity monoclonal antibody against the FLAG tag useful for G-protein coupled receptor study. *Anal Biochem* 425(2),

- 157-165 (2012)、査読有、DOI: 10.1016/j.ab.2012.03.014
- ② Hasegawa E, Oshima Y, Takeda A, Saeki K, Yoshida H, Sonoda KH, Ishibashi T. IL-27 inhibits pathophysiological intraocular neovascularization due to laser burn. *J Leukoc Biol* 91(2), 267-273 (2012)、査読有、DOI: 10.1189/jlb.1110603
- ③ Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K, Morita R, Kato R, Okamoto F, Saeki K, Nomura M, Nojima Y, Yoshimura A. miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing Spred1. *Genes to Cells* 16(7), 803-814 (2011)、査読有、DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01529.x.
- ④ Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, Shibata S, Shime H, Yoshimura A, Obuse C, Seya T, Matsumoto M. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J Biol Chem* 286(12), 10702-10711 (2011)、査読有、DOI: 10.1074/jbc.M110.185793
- ⑤ Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, Yamasaki S, Yokomizo T. Leukotriene B4 augments and restores Fc gamma Rs-dependent phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 285(52), 41113-41121 (2010)、査読有、DOI: 10.1074/jbc.M110.175497
- ⑥ 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, Yokomizo T. Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis. *FASEB J* 24(12), 4678-4690 (2010)、査読有、DOI: 10.1096/fj.10-165050
- ⑦ Iwamoto R, Mine N, Kawaguchi T, Minami S, Saeki K, Mekada E. HB-EGF function in cardiac valve development requires interaction with heparan sulfate proteoglycans. *Development* 137(13), 2205-2214 (2010)、査読有、DOI: 10.1242/dev.048926
- ⑧ Toda A, Terawaki K, Yamazaki S, Saeki K, Shimizu T, Yokomizo T. Attenuated Th1 induction by dendritic cells from mice deficient in the leukotriene B4 receptor 1. *Biochimie* 92(6), 682-691 (2010)、査読有、DOI: 10.1016/j.biochi.2009.12.002
- [学会発表] (計 30 件)
- ① Koga T, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subset. The 9th Global COE International Symposium & 8th Young Investigators Forum, 2012/1/21, Fukuoka
- ② Liu M, Saeki K, Yokomizo T. Crucial role of the leukotriene B4 receptor 2, BLT2 in epidermal wound healing. The 10th Global COE International Symposium & 7th Young Investigators Forum, 2011/12/23, Singapore
- ③ Koga T, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subset. The 10th Global COE International Symposium & 7th Young Investigators Forum, 2011/12/23, Singapore
- 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, 東京
- ⑤ Saeki K, Okamoto F, Yokomizo T. Leukotriene B4 augments and restores FcγRs-dependent phagocytosis in macrophages. The 10th JBS Biofrontier Symposium : New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011/11/15, Fukuoka
- ⑥ Yokomizo T, Liu M, Saeki K, Okuno T. Two distinct leukotriene B4 receptors: BLT1 and BLT2. The 10th JBS Biofrontier Symposium : New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011/11/16, 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 : New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011/11/15, Fukuoka
- ⑧ 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 : New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011/11/15, Fukuoka
- ⑨ Morisaki Y, Sasaki F, Aratake Y, Okuno T, Saeki K, Yokomizo T. Improved immunoprecipitation method for epitope-tagged GPCRs. The 10th JBS Biofrontier Symposium : New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011/11/15, Fukuoka
- ⑩ 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23日, 京都
- 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24日, 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 22 日, 京都
- ⑬ 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 22 日, 京都
- ⑭ Liu M, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. 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
- ⑮ 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
- ⑯ 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
- ⑰ 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
- ⑱ Saeki K, Okamoto F, Yamasaki S, Yokomizo T. Leukotriene B₄ augments and restores FcγRs-dependent phagocytosis in macrophages. Experimental Biology 2011 (ASBMB Annual Meeting), 2011/4/11, Washington, DC, USA
- ⑲ Liu M, Saeki K, Abe Y, Yokomizo T. Crucial role of the leukotriene B₄ receptor BLT2 in epidermal wound healing. Experimental Biology 2011 (ASBMB Annual Meeting), 2011/4/10, Washington, DC, USA
- ⑳ 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 (ASBMB Annual Meeting), 2011/4/10, Washington, DC, USA
- ㉑ Okuno T, Izuka Y, Saeki K, Yokomizo T. Roles of 12-HHT/LTB₄ receptor, BLT2 in murine inflammatory colitis. Experimental Biology 2011(ASBMB Annual Meeting), 2011/4/10, Washington, DC, USA
- ㉒ Liu M, Saeki K, Yokomizo T. Crucial role of the leukotriene B₄ receptor 2, BLT2 in epidermal wound healing. 6th G-COE Young Investigators Forum, 2011/2/12, Bintan Island, Indonesia
- ㉓ Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. Generation of monoclonal antibody for mouse leukotriene B₄ receptor 1. 6th G-COE Young Investigators Forum, 2011/2/12, Bintan Island, Indonesia
- ㉔ Liu M, Saeki K, Yokomizo T. Crucial role of the leukotriene B₄ receptor BLT2 in epidermal wound healing. The 83th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Dec 8, 2010, Kobe
- ㉕ 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 8 日, 神戸
- ㉖ 佐々木文之, 佐伯和子, 横溝岳彦 Generation of monoclonal antibody for mouse leukotriene B₄ receptor 1 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 8 日, 神戸
- ㉗ 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 8 日, 神戸
- ㉘ 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
- 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 5 回 GCOE 理医連携リトリート, 2010 年 8 月 18 日, 福岡
- ㉚ 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 日

[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

佐伯 和子 (SAEKI KAZUKO)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00553273

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし