

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460374

研究課題名(和文)新規脂質メディエーター・12-HHTの生理機能と病態における役割の解明

研究課題名(英文)Physiological and pathological roles of a new lipid mediator, 12-HHT

研究代表者

奥野 利明 (OKUNO, TOSHIAKI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60361466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュにBLT1タイプの受容体が1つ、BLT2タイプの受容体が2つあることを見出し、LTB4/BLT1軸がゼブラフィッシュの発生に必須であることを発見した。12-HHT/BLT2軸がケラチノサイトの遊走を促進することで、皮膚創傷治癒を促進することを明らかにした。またBLT2作動薬がケラチノサイトの遊走を促進することで糖尿病などの皮膚潰瘍の治療薬になりうることを明らかにした。12-HHT/BLT2軸がGi-p38 MAPK経路依存的にCLDN4を発現誘導し、上皮細胞のバリア機能の強化に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified one BLT1-type receptor and two BLT2-type receptors in zebrafish and revealed that the LTB4-BLT1 axis is involved in epiboly in zebrafish development. We also revealed that the 12-HHT/BLT2 axis accelerated wound closure through the enhanced migration of epidermal keratinocytes. We identified that the 12-HHT/BLT2 axis enhanced epidermal barrier function by increasing CLDN4 expression via Gi protein-p38 MAPK pathway.

研究分野：脂質生化学

キーワード：12-HHT BLT2 脂肪酸 エイコサノイド ゼブラフィッシュ 皮膚 バリア 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、白血球の強力な活性化因子であるロイコトリエン B4(LTB4)の低親和性受容体として BLT2 を遺伝子同定した(Yokomizo *J. Exp. Med.* 2000)。しかし、BLT2の活性化に高濃度の LTB4 を必要としたことから、LTB4 以外の内在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。その結果、BLT2 の内在性脂質リガンドが炭素数 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)。BLT2 の過剰発現細胞を用いて細胞内シグナルの活性化を検討したところ、12-HHT は、LTB4 より一桁以上少ない濃度で BLT2 を活性化した。

12-HHT は 1970 年代に発見された脂質であり、血液凝固時に多量に産生されることが明らかにされていた。しかし、研究代表者による受容体の同定まで、12-HHT はトロンボキサン(Tx)A2 産生時に生成される、生理機能を有さない単なる副産物と考えられてきた。従って、12-HHT の生理機能の解明はほとんど行われて来なかった。

2. 研究の目的

新規脂質メディエーターである 12-HHT と受容体 BLT2 の生理機能の解明を目的として、1)ゼブラフィッシュ BLT1 と BLT2 の同定と生理機能の解析、2)皮膚創傷治癒における 12-HHT と BLT2 の役割の解明、3)上皮バリア機能における 12-HHT と BLT2 の機能解明を行った。

3. 研究の方法

1) ゼブラフィッシュの BLT1 と BLT2 の同定と生理機能の解明

受精後 24-72 時間のゼブラフィッシュの卵の cDNA を作製し、PCR によってヒト BLT1 と BLT2

のゼブラフィッシュのオーソログを遺伝子クローニングした。さらに PCR 法で哺乳細胞の発現ベクターに組み込み、N 末に HA タグ配列を持つ融合タンパク質として発現するようにした。発現ベクターを CHO 細胞にトランスフェクションし、G418 存在下で 2-3 週間培養し、受容体の安定発現細胞を樹立した。ゼブラフィッシュの BLT1 もしくは BLT2 を安定発現させた細胞を、抗 HA 抗体と Alexa Fluor 488 でラベルした抗ラット IgG 抗体で染色後、セルソーターを用いて受容体の過剰発現細胞を回収した。細胞の膜画分を回収し、^[35S]GTP γ S 結合実験を行った。また細胞にカルシウムインジケーターである Fluo-8 AM を取り込ませ、FlexStation を用いて、LTB4 や 12-HHT 依存的な細胞内カルシウム上昇を観察した。またリガンド刺激依存的な Gi 活性を明らかにするため、cAMP 濃度を cAMP Fluorescent Assay Kit を用いて測定した。また HEK 細胞に一過性にトランスフェクションし、TGF α 切断アッセイによって、LTB4 及び 12-HHT 依存的な細胞内シグナル活性化を検討した。ゼブラフィッシュ BLT1 と BLT2 の生体内における機能は、モルフォリノを用いたノックダウンによって検討した。BLT1 や BLT2 の mRNA の局在は、in situ ハイブリダイゼーションによって検討した。

2) 皮膚創傷治癒における 12-HHT と BLT2 の役割の解明

マウスの皮膚創傷治癒は、8 週令のマウスの背中に 3 mm のパンチをした後、傷の大きさの面積を毎日測定することで評価した。皮膚の組織学的な解析を行うため、組織を 10%ホルムアルデヒドで固定後に切片を作製した。切片を H&E 染色後、傷の長さや再上皮化の長さを測定した。In vitro の創傷治癒実験を行うため、マウスの初代培養ケラチノサイトやヒトのケラチノサイトの細胞株である HaCaT 細胞をコラーゲン I でコートした 96 ウエル

デッシュに播き込み、Wound Maker で傷を作製した。傷の直りの程度は IncuCyte を用いて評価した。DNA マイクロアレイ解析は、イルミナ社のビーズアレイを用いて行った。また定量的 PCR 解析はロシュ社のライトサイクラーシステムを、サイトカインの定量はベクトン・ディッキンソン社の CBA キットを用いて行った。

3) 上皮バリア機能における 12-HHT と BLT2 の機能解明

MDCKII 細胞にヒト BLT2 を過剰発現させた細胞を用いてカルシウムスイッチアッセイを行った。細胞はミリポア社のカルチャーインサートに播き込み、コンフルエントに達したところで、経上皮電気抵抗値 (TER) を測定した。カルシウムフリーの培地に置換し、18 時間後に終濃度が 1.5 mM になるように塩化カルシウム溶液を加え、TER 値を 1 時間おきに測定した。DNA マイクロアレイ解析や定量的 PCR 解析は 2) と同様に行った。BLT2 の腸管上皮過剰発現マウスは、villin プロモーターを利用して作製した。

4 . 研究成果

1) ゼブラフィッシュ BLT1 と BLT2 の同定と生理機能の解明

ヒト BLT1 とヒト BLT2 に相同性の高いゼブラフィッシュ GPCR のデータベース検索を行った。その結果、XP002662767、XP009301152、XP003197923 を同定した。哺乳細胞に発現させるためのベクターを作成し、CHO 細胞のゼブラフィッシュ BLT の過剰発現細胞を樹立した。カルシウムアッセイ、cAMP アッセイ、GTP γ S 結合実験を行った結果、ゼブラフィッシュには、BLT1 タイプの受容体が 1 個、BLT2 タイプの受容体が 2 個あることを見出した。また HEK293 細胞に一過性に発現させ、TGF α 切断アッセイを行った結果もこの結論を支持した。ゼブラフィッシュの受精卵を用いて、

RT-PCR 解析と in situ hybridization 解析を行ったところ、ゼブラフィッシュの BLT1 と BLT2、ゼブラフィッシュの LTA4 水解酵素と 5 リボキシゲナーゼのいずれも発現していた。ゼブラフィッシュの BLT1 に対するアンチセンスモルフォリノを用いたノックダウン実験を行ったところ、原腸陥入におけるエピボリの遅延が見られた。また LTA4h のノックダウンでも同様の現象が観察されたことから、LTB4-BLT1 軸がゼブラフィッシュの発生において必須の役割を有することが明らかとなった。

2) 皮膚創傷治癒における 12-HHT と BLT2 の役割の解明

マウスにおいて、皮膚のケラチノサイトに BLT2 が発現していたため、皮膚創傷治癒における BLT2 の役割を検討した。マウスの背中の皮膚をパンチし傷を作ったところ、傷浸出液に 12-HHT が検出された。BLT2 遺伝子欠損マウスでは、ケラチノサイトの遊走による再上皮化と傷口の閉鎖が野性型マウスに比べて遅延していた。またアスピリンを投与することによって、12-HHT の産生を抑制したマウスでも傷の直りが遅延し、その遅延は BLT2 欠損マウスで消失した。マウスの初代培養ケラチノサイトやヒトのケラチノサイトの細胞株を用いた in vitro の創傷治癒アッセイでも、12-HHT/BLT2 軸が創傷治癒を促進した。また RT-PCR 解析や、阻害抗体を用いた検討などから、TNF α や MMP 産生を介して創傷治癒を促進することがわかった。さらに、研究代表者らが以前同定した人工的な BLT2 アゴニストも、BLT2 過剰発現細胞、c57BL/6J マウス、糖尿病マウスにおける創傷治癒を促進した。これらの結果は、12-HHT/BLT2 軸がケラチノサイトの遊走を促進することで、皮膚創傷治癒を促進することを示している。また BLT2 作動薬がケラチノサイトの遊走を促進することで糖尿病などの皮膚潰瘍の治療薬

になりうる事が明らかになった。

3) 上皮バリア機能における 12-HHT と BLT2 の機能解明

以前、研究代表者らは MDCKII-BLT2 細胞が Mock 細胞に比べて、高い TER を示すことを明らかにした。そこで本研究において、なぜ MDCKII-BLT2 細胞が高い TER を示すかについて検討を行った。

MDCKII-BLT2 細胞における BLT2 の局在を検討したところ、ラテラル膜に局在していた。さらに、BLT2 を小腸の腸管上皮に過剰発現するマウスを作製したところ、マウスの腸管においてもラテラル膜に局在していた。マウス皮膚からの水分蒸散量を調べたところ、BLT2 遺伝子欠損マウスは野性型マウスに比べて水分蒸散が亢進していた。また皮膚感作による感受性も BLT2 遺伝子欠損マウスで亢進していた。また MDCK-BLT2 細胞は、MDCK-Mock 細胞に比べて、カルシウムスイッチアッセイにおける TER の回復が亢進していた。12-HHT/BLT2 軸はバリア機能に重要なクロードイン 4 の発現を上昇させた。またクロードイン 4 をノックダウンすると、MDCK-BLT2 細胞における TER 回復の亢進が消失することがわかった。さらに、12-HHT 依存的な TER の早期回復や CLDN4 の発現誘導は、G α i タンパク質や p38 MAPK のノックダウンによって消失した。以上の結果から、12-HHT/BLT2 軸が G α i-p38 MAPK 経路依存的に CLDN4 を発現誘導し、TER を亢進させることが明らかになった。

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 1 2 件)

Matsunobu T, Okuno T(責任筆者),
Yokoyama C, Yokomizo T.
Thromboxane A synthase-independent
production of

12-hydroxyheptadecatrienoic acid, a
BLT2 ligand.

Journal of Lipid Research, 54, 2979-2987
(2013) (査読あり)

Matsunaga Y, Fukuyama S, Okuno T,
Sasaki F, Matsunobu T, Asai Y, Matsumoto
K, Saeki K, Oike M, Sadamura Y, Machida
K, Nakanishi Y, Kubo M, Yokomizo T, Inoue
H.

FASEB Journal, 27, 3306-3314 (2013) (査
読あり)

Liu M, Saeki K, Matsunobu T, Okuno T,
Koga T, Sugimoto Y, Yokoyama C, Nakamizo
S, Kabashima K, Narumiya S, Shimizu T,
Yokomizo T.

12-hydroxyheptadecatrienoic acid
promotes epidermal wound healing by
accelerating keratinocyte migration via
the BLT2 receptor.

Journal of Experimental Medicine. 211,
1063-1078 (2014) (査読あり)

Okuno T(責任筆者), Ishitani T,
Yokomizo T.

Biochemical Characterization of Three
BLT Receptors in Zebrafish.

PLoS One 10, e0117888 (2015) (査読あり)
doi:10.1371/journal.pone.0117888

〔学会発表〕(計 3 3 件)

奥野利明、松延武彦、横溝岳彦
トロンボキサン合成酵素非依存的な12-HHT
産生機構

第86回日本生化学会大会 2013年9月11日
-13日、横浜、神奈川

Okuno T, Matsunobu T, Yokoyama C,
Yokomizo T.

Biosynthetic pathway of
12-hydroxyicosatetraenoic acid, a BLT2
ligand.

13th International Conference on
Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation
and Related Diseases.

2013年11月3日-6日, 2013年, San Juan,
Puerto Rico

奥野利明

12-HHT受容体BLT2の上皮保護作用

日本薬学会134年会 2014年3月27日-30日、
熊本

Okuno T, Matsunobu T, Yokomizo T.
Biosynthetic pathway of
12-hydroxyheptadecatrienoic acid
revealed by LC-MS/MS system.

62nd ASMS Conference, 2014年6月15日-19
日, 2014年, Baltimore, USA

Okuno T, Ishitani T, Yokomizo T.
Identification and characterization of
zebrafish BLT1 and BLT2.

6th International Conference on
Phospholipase A2 and Lipid Mediators,
2015年2月10日-12日, 2015年, Tokyo

〔図書〕(計1件)

Okuno T, Yokomizo T.
Basic techniques for lipid extraction
from tissues and cells.
in "Bioactive Lipid Mediators: Current
Reviews and Protocols" (Murakami, M,
Yokomizo, T, Ed), Springer (Tokyo), 426
(331-336) (2015) ISBN 978-4-431-55668-8

〔その他〕

ホームページ

順天堂大学医学部生化学第一講座

[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

奥野 利明 (OKUNO, Toshiaki)