

## 128. 免疫細胞における生理活性脂質とその受容体の機能解析

古賀 友紹

\*順天堂大学 医学部 生化学第一講座

Key words : ロイコトリエン B<sub>4</sub>, BLT1, 炎症・免疫反応, GPCR, 脂質メディエーター

### 緒言

ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) は、アラキドン酸から産生される炎症性の脂質メディエーターで、好中球やマクロファージ等の炎症細胞を活性化する。本研究室では、LTB<sub>4</sub> の高親和性受容体である BLT1 を世界に先駆けて遺伝子同定し、その遺伝子欠損マウスの表現型解析を行ってきた<sup>1-4)</sup>。その結果、BLT1 欠損マウスでは、Th1、Th2、Th17 応答の全てが減弱するという興味深い知見を得ている。さらに BLT1 は、CD8 陽性 T 細胞や制御性 T 細胞にも発現し、遊走を促進するという報告もなされており、LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路が炎症応答だけでなく、免疫応答においても重要であることが明らかにされつつある。本研究では、免疫細胞における生理活性脂質とその受容体の機能を明らかにするべく、LTB<sub>4</sub> および BLT1 に着目し、解析を行った<sup>5)</sup>。

### 方法および結果

まず始めに、LTB<sub>4</sub>-BLT1 シグナルの制御機構を明らかにするために、BLT1 と相互作用する分子の同定を試みた。その候補として本研究では、BLT1 と相同性の高い GPCR である FPR1 と相互作用の報告があり、且つ、関連する炎症・免疫疾患が同様である、最終糖化産物受容体 (RAGE) に着目した。RAGE は一回膜貫通型受容体であり、immunoglobulin superfamily に属するマルチリガンド受容体である。ヒト子宮頸癌細胞である HeLa 細胞に、BLT1 と RAGE を共発現させ免疫沈降を行ったところ、BLT1 と RAGE の間に相互作用が観察された (図 1A、B)。ケモカイン GPCR である CXCR4 を用いて RAGE と共発現させ、同様に免疫沈降を行ったところ、相互作用は観察されなかったことから、BLT1 と RAGE 間に存在する相互作用は特異的なものであると推察された (図 1C)。

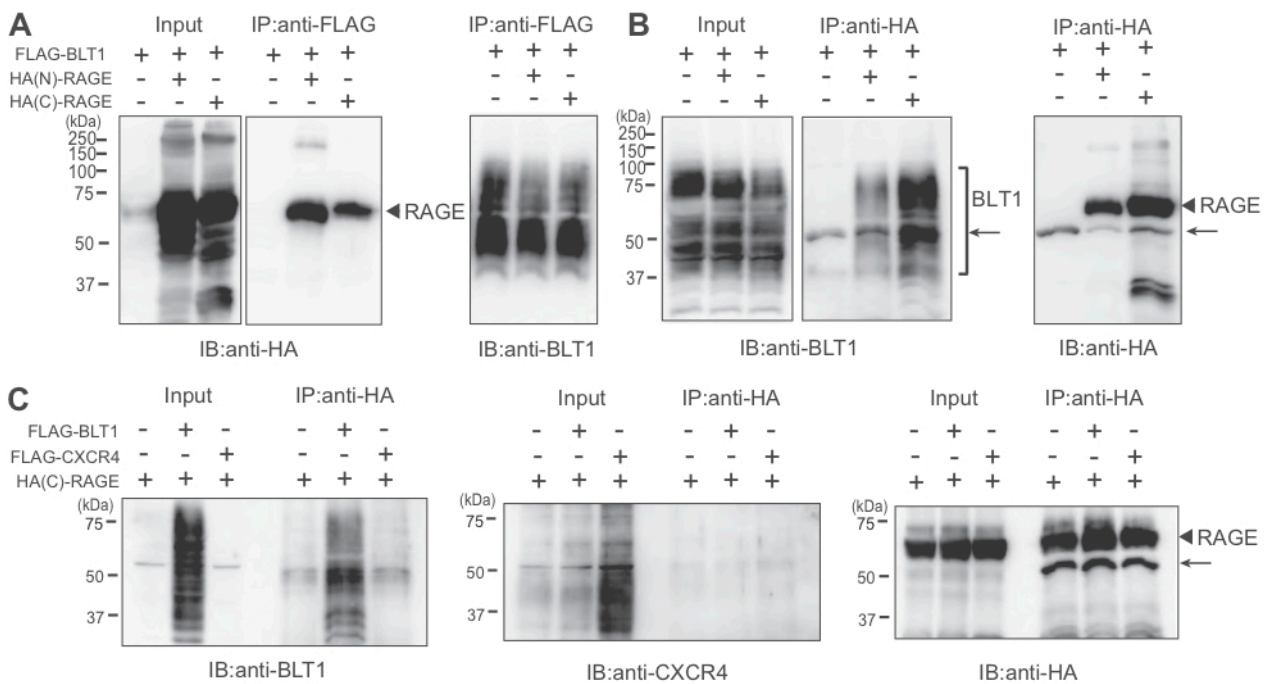


図1. BLT1 と RAGE は相互作用する

(A-C) HeLa 細胞に HA タグ付き RAGE、Flag タグ付き BLT1 もしくは CXCR4 を過剰発現し、免疫沈降を行った。矢印：抗体重鎖。

次に、RAGE が  $LTB_4$ -BLT1 シグナルにどのような影響を与えるか、ERK のリン酸化を指標として解析したところ、RAGE が  $LTB_4$ -BLT1 依存的な ERK のリン酸化を増強することがわかった (図 2A、B)。これら RAGE による ERK 経路の増強は、Gi および Gq/11 の両 G タンパク質を介して引き起こされることがわかった (図 2C、D)。

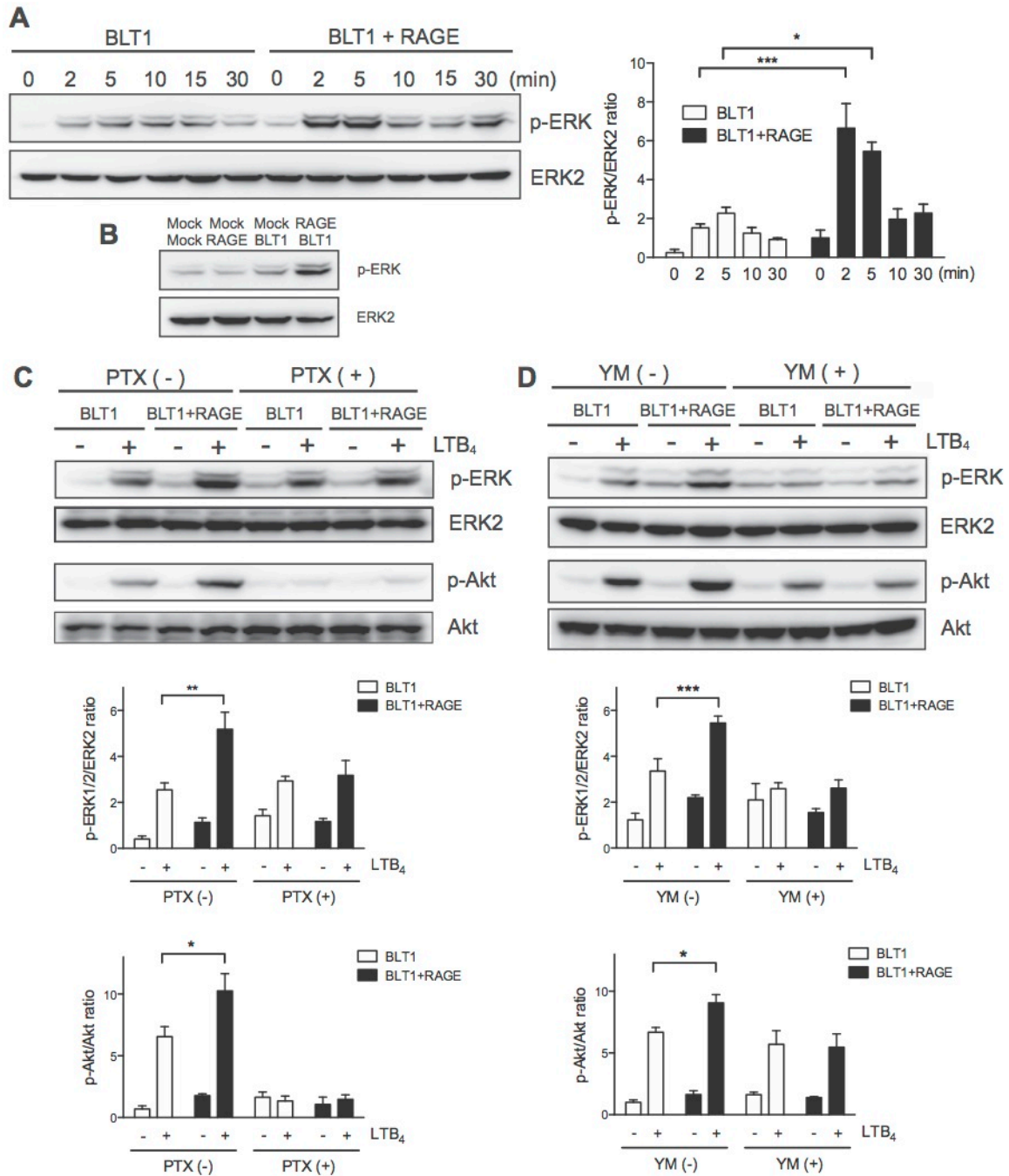


図2. RAGEはLTB<sub>4</sub>-BLT1依存的なERKシグナルを増強する

(A, B) HeLa細胞にBLT1もしくはBLT1とRAGEを過剰発現させ、遺伝子導入後48時間の時点で、100 nM LTB<sub>4</sub>を用いて刺激した。(C, D) BLT1もしくはBLT1とRAGEをHeLa細胞に共発現させ、100 nM LTB<sub>4</sub>を用いて刺激した。PTX: Gi inhibitor, YM254890 (YM): Gq/11 inhibitor。\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001, 2-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test.

次に、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの他の経路へのRAGEの影響を検討するため、NF-kappaBレポーターアッセイを行った。HeLa細胞にBLT1ないし、BLT1とRAGEを過剰発現させ、検討を行ったところ、RAGEは、LTB<sub>4</sub>-BLT1依存的なNF-kappaB活性化を抑制することがわかった(図3C)。さらにRAGEは、NF-kappaBの下流で発現誘導される炎症性サイトカイン(TNF-alpha, IL-8, CXCL2)の発現も抑制した(図3A, B)。次に内因性にRAGEとBLT1を発現するヒト好中球様細胞HL-60とマウス骨髄由来好中球を用いて、RAGEのLTB<sub>4</sub>-BLT1依存性炎症性サイトカイン

ンの発現誘導に対する影響について検証した。RAGE リガンドの decoy receptor として働く soluble RAGE (sRAGE) を用いて RAGE シグナルを阻害したところ、LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的なサイトカイン誘導は増強された (図 3G、H)。また、*Ager* 遺伝子欠損マウス (RAGE KO マウス) 由来好中球でも同様に、野生型に比べて CXCL2 の発現誘導の増強効果が見られた (図 3F)。これら LTB<sub>4</sub>-BLT1 誘導性の NF-kappaB 活性化に対する RAGE の抑制効果機構を明らかにするために、MEK-ERK 阻害剤である PD030951 を用いた。その結果、RAGE による NF-kappaB 抑制効果および炎症性サイトカイン抑制効果は、ともに消失した (図 3D、E)。これらの結果より、RAGE は、MEK-ERK 経路の増強を介して、LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存性の NF-kappaB 活性化や炎症性サイトカインの発現誘導を抑制していると推測された。

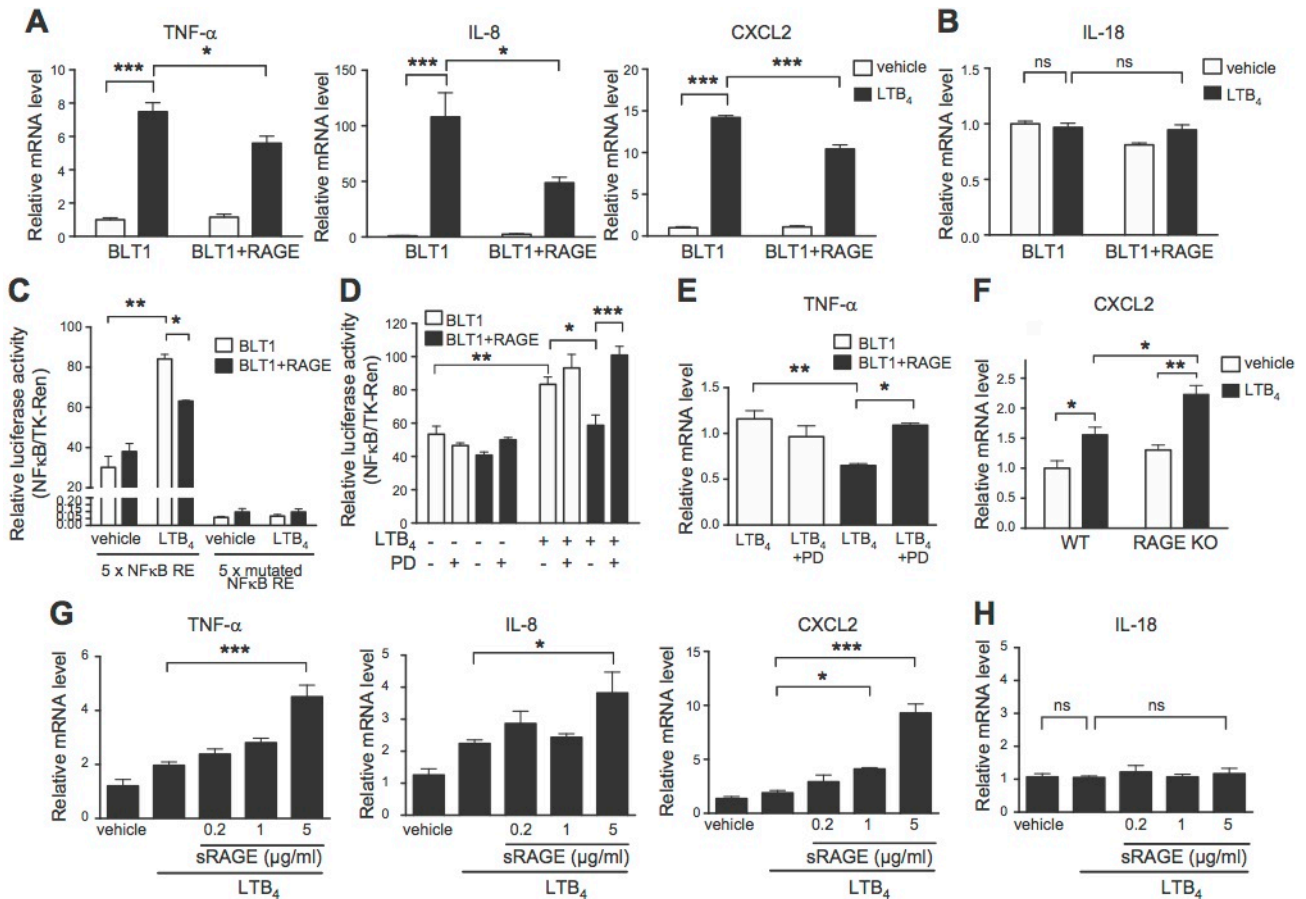


図 3. RAGE は LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的な NF-kappaB 活性化および炎症性サイトカイン発現誘導を抑制する (A、B) HeLa 細胞に BLT1 もしくは BLT1 と RAGE を共発現させ、LTB<sub>4</sub> 100 nM にて刺激し、3 時間後の RNA を定量的 RT-PCR にて解析した。(C、D) HeLa 細胞に BLT1 もしくは BLT1 と RAGE を共発現させ、LTB<sub>4</sub> 100 nM にて刺激し、NF-kappaB レポーターアッセイを行った。PD: PD039501、MEK 阻害剤。(E-H) 安定高発現 HeLa 細胞 (E)、マウス骨髄由来好中球 (F)、ヒト好中球様細胞 HL-60 (G、H) を用いて定量的 RT-PCR にて RAGE の効果を検討した。\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001, 2-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test (A-F), 1-way ANOVA with Dunnett *post hoc* test (G & H) .

次に、LTB<sub>4</sub>-BLT1 経路に RAGE が及ぼす影響をさらに解析するため、好中球の遊走に対する検討を行った。まず、野生型マウスの骨髄から好中球を単離し、LTB<sub>4</sub> に対する *in vitro* 走化性を TaxiScan を用いて解析した。その結果、好中球は 100 nM LTB<sub>4</sub> 添加により顕著に遊走した。このとき、RAGE 阻害タンパク質である sRAGE を加えると、LTB<sub>4</sub> に対する走化性が濃度依存的に抑制された (図 4B、C)。次に RAGE KO マウスの骨髄より好中球を単離し、LTB<sub>4</sub> に対する走化性を検討したところ、野生型に比べて有意に抑制されていた (図 4A)。さらに、これら *in vitro* の結果が、*in vivo* においても反映されるか LTB<sub>4</sub> 腹腔内投与による腹膜炎モデルを用いて検証した。その結果、LTB<sub>4</sub> 依存的な Gr-1/CD11b 両陽性成熟好中球の腹腔内浸潤は、*Ager* 遺伝子欠損によって顕著に抑制された (図 4D、E)。これらの結果より、RAGE が LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的な好中球の遊走を促進することが明らかとなった。

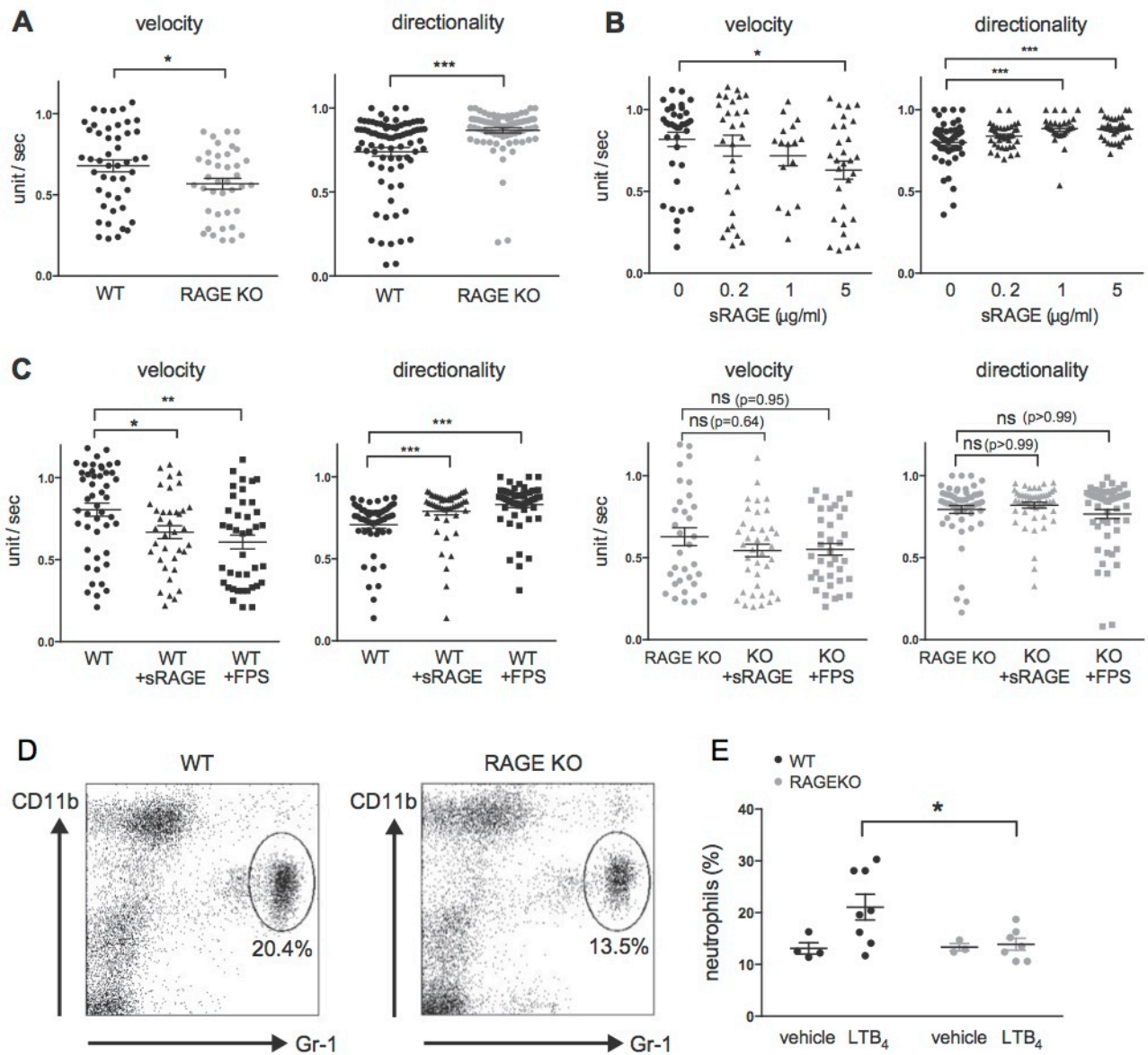


図4. RAGEはLTB<sub>4</sub>-BLT1依存的な好中球遊走を促進する

(A-C) TaxiScanを用いた *in vitro* ケモタキシスアッセイ。100 nM LTB<sub>4</sub>を最高濃度として濃度勾配を作り、好中球の移動を誘導した。sRAGE: RAGE阻害タンパク質。FPS: RAGE阻害剤。(D、E) 腹腔内LTB<sub>4</sub>投与による *in vivo* ケモタキシスアッセイ。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , Mann-Whitney *U* test (A、D、E); Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* test (B、C)。

最後にこれら、RAGEによる増強効果の機序解明を目的として、MEK-ERK経路の検討を行った。マウス骨髄由来好中球を単離し、LTB<sub>4</sub>により刺激してERKのリン酸化を検討したところ、*Ager*遺伝子欠損好中球では、有意に減弱していることがわかった(図5A)。さらにLTB<sub>4</sub>-BLT1依存的な好中球遊走に対するMEK-ERK経路の関与を解析するため、PD、U0126の両MEK阻害剤を用いた。その結果、MEK-ERK経路は、LTB<sub>4</sub>-BLT1依存的な好中球の走化性を促進することがわかった(図5B)。以上より、RAGEは、MEK-ERKの増強を介して、LTB<sub>4</sub>-BLT1依存的な走化性を増強することが明らかになった。

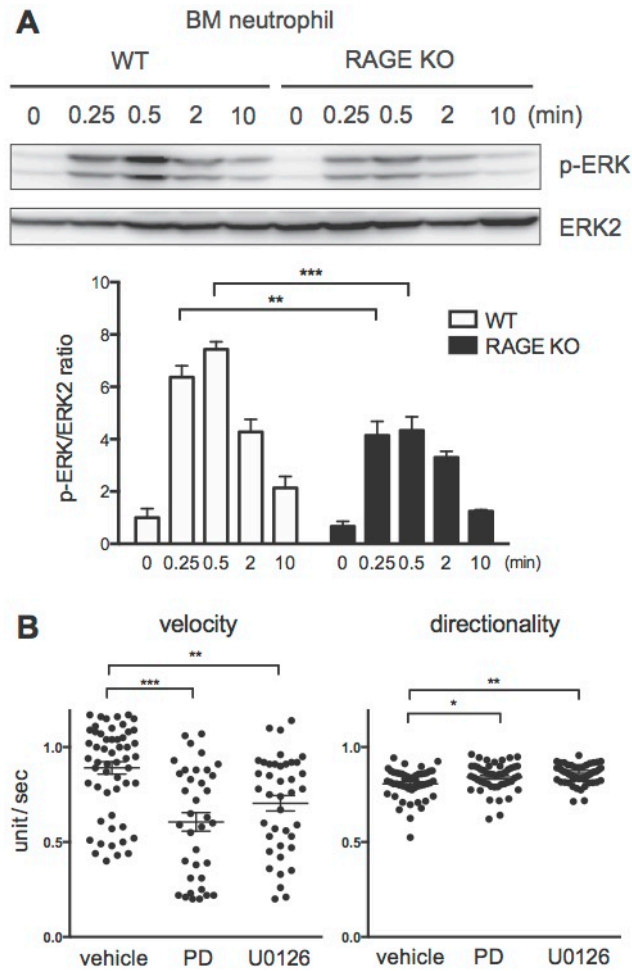


図5. RAGE は MEK-ERK 経路の増強を介して LTB<sub>4</sub>-BLT1 依存的な走化性を促進する  
 (A) 野生型および *Ager* 遺伝子欠損マウス骨髄由来好中球を用いた WB 解析とその定量データ (n = 3)。(B) 好中球を用いた走化性実験。PD、U0126、ともに MEK 阻害剤。\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001, Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* test.

これらの結果から、RAGE は BLT1 と相互作用し、MEK-ERK 経路の増強を介して、抗炎症作用を発揮すると共に LTB<sub>4</sub> 依存性の細胞走化性を亢進させることが明らかとなった (図6)<sup>5)</sup>。

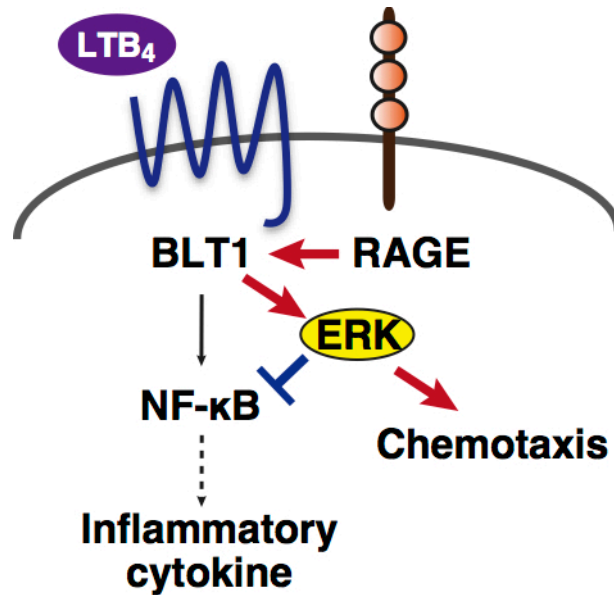


図6. RAGEによるLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナル新規制御機構の模式図

RAGEはBLT1に相互作用することでMEK-ERK経路を増強し、NF-kappaBを抑制する一方で、走化性を増強する。

## 考 察

本研究では、免疫・炎症細胞におけるLTB<sub>4</sub>-BLT1経路の役割を解析する目的で、新規制御因子RAGEの同定に成功した。今回、RAGEリガンドの効果については顕著な解析データを示すことが出来なかったが、RAGEリガンドのうち、S100タンパク質やAGEは慢性炎症時にその発現が誘導されることがわかっており、またその一方で、RAGE自身の発現量も炎症性刺激や高血糖時に誘導されることがわかっているため、BLT1シグナルの新規制御機構として、そのような環境因子がRAGEを介して間接的にBLT1をfine tuningしている可能性が考えられる。また、それらの因子を標的としてBLT1シグナルを制御できる可能性も考えられる。さらに申請者はこれまでに肝炎や腎炎といった病態モデルの解析も行った経験があるため<sup>6,7)</sup>、今回見いだした現象が腹膜炎モデルにおいてのみならず、他の炎症病態においても寄与しうるか今後検討したい。今回、BLT1の制御因子としてRAGEを同定したが、RAGEは、CXCR4とは相互作用しないものの、FPR1とは相互作用することが知られており、各種GPCRのシグナル制御因子として働いている可能性がある。今後は、SIP1やLPA1等の他の脂質メディエーター受容体との相互作用も検討していき、RAGEのシグナルモディファイヤーとしての可能性を探って行きたい。好中球は古くから炎症細胞として知られているが、近年では、免疫調節細胞としても知られてきている。今回見つけた現象が炎症だけでなく、好中球の免疫調節細胞としての機能にもどのように影響を及ぼすか今後も検討を続けて行きたいと考える。

以上、今回、我々が報告した一連の現象は、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの新たな調節因子を見いだしただけでなく、新たなクラスのGPCR modifierを見いだしたという点で、今後の基礎研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

本稿を終えるにあたり、上原記念生命科学財団に心から深く感謝したい。

## 文 献

- 1) Koga T, Yokomizo T. Leukotriene B4 Receptors. In "Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols" (Murakami M, Yokomizo T, Ed), Springer (Tokyo), 85-93 (2015) ISBN 978-4-431-55668-8.
- 2) 古賀友紹・横溝岳彦「疾患モデルの作製と利用－脂質代謝異常と関連疾患」下巻 第5章 脂質メディエーター, 第4節 ロイコトリエン, エルアイシー出版, 2015.
- 3) 市木貴子・古賀友紹・横溝岳彦. 医学のあゆみ 256 巻5号 GPCR研究の最前線 2016「ロイコトリエン受容体」, 2016.

- 4) Ishii Y, Saeki K, Liu M, Sasaki F, Koga T, Kitajima K, Meno C, Okuno T, Yokomizo T. Leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) enhances epithelial barrier function by regulating tight junction proteins. *FASEB J.*, 30(2): 933-947, 2016. doi: 10.1096/fj.15-279653.
- 5) Ichiki T, Koga T, Okuno T, Saeki K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Sakaguchi M, Yokomizo T. Modulation of leukotriene B4 receptor 1 signaling by receptor for advanced glycation end products, RAGE. *FASEB J.*, 30(5): 1811-1822, 2016. doi: 10.1096/fj.201500117.
- 6) Koga T, Suico MA, Shimasaki S, Watanabe E, Kai Y, Koyama K, Omachi K, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Mori K, Hirno S, Nakao M, Kai H. Endoplasmic Reticulum (ER) stress increases Sirtuin 1 (SIRT1) expression via PI3K-Akt-GSK3beta signaling pathway and promotes hepatocellular injury. *J Biol Chem.*, 290(51): 30336-30374, 2015. doi: 10.1074/jbc.M115.664169.
- 7) Fukuda R, Suico MA, Kai Y, Omachi K, Motomura K, Koga T, Komohara Y, Koyama K, Yokota T, Taura M, Shuto T, Kai H. Podocyte p53 limits the severity of experimental Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.*, 27(1): 144-157, 2016. doi: 10.1681/ASN.2014111109.