

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

# 目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

## 炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への 応用

所属 東京大学大学院・医学系研究科  
研究者 清水孝雄

### 分担研究者

- (1)東京大学大学院・医学系研究科 和泉孝志、谷口雅彦、横溝岳彦  
(2)明治製菓(株) 薬品総合研究所 加藤和彦

### 要旨

血小板活性化因子受容体の過剰発現マウス、欠損マウス、細胞質型ホスホリパーゼのA2欠損マウスの解析を進め、炎症アレルギーモデルにおけるこれらの受容体や酵素の役割を明らかにした。強力な炎症起炎物質であるロイコトリエンB4受容体の転写機構の解析を行うと共に、新たな第二受容体を単離し詳細な解析を行った。

### 1. 研究目的

アレルギー免疫疾患の発症機序を考える上で、非常に重要な因子として、いわゆる「脂質性メディエーター」と呼ばれる一群の物質がある。脂質性メディエーターとはプロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子、LPAなどの一連の化合物であり、いずれもGタンパク共役型受容体に結合し、種々の生理作用を営むと共に、病態を引き起こすと考えられている。脂質性メディエーターはサイトカインやホルモンなどの作用を調節しながら、生体機能を制御していると考えられている。

食生活の欧米化や環境の悪化などに伴い、我が国では気管支喘息や関節リウマチなどのアレルギー性疾患が急増し、時には致命的となっている。さらに、花粉症やアトピー性皮膚炎の蔓延も深刻な問題である。アレルギー疾患を克服することは単にQuality of Lifeを向上させるためだけではなく、生命や生殖作用にも重要と考えられるようになってきた。実際、成人で発症する気管支喘息は重篤になる傾向が強く、死亡例も多数報告されている。

上述した「脂質性メディエーター」の多くは、これらのアレルギー性疾患に深く関与していると古くから考えられており、脂質メディエーターの特異的な拮抗物質や産生阻害剤が作られれば、それは病態の発生機序の理解に役立つだけでなく、これらの疾患の適切な治療や予防に威力を発揮すると考えられ、社会的な貢献も大きい。これらを背景に、種々の「脂質性メディエーター」の受容体を用いて、炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用を目指して研究を行う。

### 2. 研究方法

課題研究者らは長年にわたり、「脂質性メディエーター」の産生・分解に関わる生体内酵素や、受容体の研究を行ってきた。その過程で、プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子の産生に必須な細胞質型ホスホリパーゼA2の解析および、血小板活性化因子、ロイコトリエンB4の細胞膜受容体の単離に成功した。これらの酵素や受容体を過剰発現する哺乳動物細胞を用いた薬理学的実験を行い、さらに、これらの酵素や受容体を欠損したマウスを作成し、その表現型を個体レベルで解析することで、炎症・アレルギー性疾患の発症機構を明らかにする。さらに、分担研究者の所属する明治製菓(株)研究所が保有するケミカルライブラリーをスクリーニングすることで、酵素の阻害剤や受容体の拮抗薬の開発を目指す。

### 3. 研究成果

#### 1)細胞質型ホスホリパーゼA2欠損マウスの表現型解析

1997年に樹立した細胞質型ホスホリパーゼA2欠損マウスを用いて、炎症モデル実験を行い、野生型マウスと比較することで、炎症・アレルギー反応における細胞質型ホスホリパーゼA2の関与を検討した。欠損マウスはメサコリンによる気道の過敏性を消失していたのに加え、成人急性呼吸逼迫症候群(ARDS)のモデルにおいて、きわめて軽い病態しか示さなかった。また、大腸癌のモデルであるApc欠損マウスとの交配を行い、腸ポリープの発生と増殖について検討を行った結果、細胞質型ホスホリパーゼA2欠損マウスでは、ポリープの発生頻度には野生型マウスと差がないものの、ポリープの大きさが野生型マウスよりも有意に小さかった。気管支喘息やARDSに加え、大腸ガンにおいても細胞質型ホスホリパーゼA2の阻害剤が予防薬・治療薬として機能する可能性を示した。

#### 2)ロイコトリエンB4の第二の受容体(BLT2)の単離と解析

ロイコトリエンB4の低親和性受容体BLT2に関して詳細な解析を行った。高親和性受容体BLT1、低親和性受容体BLT2を安定的に発現するCHO細胞を樹立し、これらの細胞膜画分を用いて多数検体を同時に処理可能なシステムを構築した。この系を用いて、これまでに開発されたロイコトリエンB4受容体拮抗薬をスクリーニングしたところ、BLT1に特異的に作用するもの、BLT2に特異的なもの、さらに、BLT1、BLT2両者を拮抗するものに分類されることが明らかとなった。さらに生体内で産生される種々の生理活性脂質を用いて両受容体に対する作用を検討したところ、BLT2が、ロイコトリエンB4以外に12-ヒドロキシテトラエン酸、15-ヒドロキシテトラエン酸によっても活性化される事を見いだした。

#### 3)BLT1欠損マウスの作成

マウスゲノムライブラリからロイコトリエンB4第一受容体(BLT1)遺伝子を含むゲノムクローンを単離し、構造を決定した。これを元にロイコトリエンB4受容体欠損マウス作成のためのターゲティングベクターを構築した。このベクターをマウスES細胞に遺伝子導入し、組換えES細胞を得た。この細胞をマウスブラストシストにマイクロインジェクションし、キメラマウスを得た。野生型マウスとの交配により、germline transmissionが可能であることを確認し、現在キメラマウス同士の交配により、BLT1欠損マウスの作出を行っている。

#### 4)BLT2欠損マウスの作成

マウスゲノムライブラリからロイコトリエンB4第二受容体(BLT2)遺伝子を含むゲノムクローンを単離し、構造を決定した。現在ターゲティングベクターを構築中である。

#### 5)ヒトBLT1の転写機構の解明

ヒト、ロイコトリエンB4受容体(BLT1)遺伝子上流にアポトーシスを誘導すると考えられるCIDE-B遺伝子を見いだした。CIDE-B遺伝子のプロモーター領域はBLT1遺伝子のプロモーター領域とはほぼ同じ領域であることが示唆された。

### 4. 考察

急性炎症・アレルギー疾患は罹患率の極めて高い疾患であるにもかかわらず、その発生機序が未だに明らかでない。臨床医学の場においても、主として対症療法のみが行われている。これらの疾患の発生機序が明らかになれば、本質的な疾患の予防・治療が可能になる。課題研究者らは、脂質メディエーターの産生酵素・受容体遺伝子の単離・欠損マウスの作成を通じて、これらの疾患の病態生理を明らかにすることを目標に実験を行った。これまでに明らかにされたことは、1)血小板活性化因子

(PAF)はPAF受容体を介して、I型アレルギー、気管支喘息、細菌感染の病態を悪化させる。すなわち、有効なPAF受容体拮抗薬が開発されれば、疾患予防・治療に有効である。2)細胞質型ホスホリパーゼA2は気管支喘息やARDSの発症にきわめて深く関わっている。3)急性炎症や、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患との関与が推定されているロイコトリエンB4の受容体(BLT1)を単離し、その構造と機能を決定した。さらにその存在が明らかでなかったロイコトリエンB4の第二の受容体(BLT2)の単離に成功した。BLT2はBLT1と薬理的に異なった特性を有しており、新たな抗炎症薬のターゲットとして注目される。今後、受容体欠損マウスの作成・解析と、受容体発現細胞を用いた拮抗薬のスクリーニングにより、LTB4受容体の病態における役割の解明と、創薬への貢献が期待される。

## 5. まとめ

血小板活性化因子受容体の過剰発現マウス、欠損マウス、細胞質型ホスホリパーゼのA2欠損マウスを作成し、種々の炎症アレルギーモデルにおけるこれらの受容体・酵素の役割を明らかにした。また、強力な炎症起炎物質であるロイコトリエンB4の二種の受容体を単離し、今後の研究の基礎を築いた。

## 6. 研究発表

- 1) Aihara, M., Ishii, S., Kume, K., and Shimizu, T. Interaction between neuron and glia mediated by platelet-activating factor. Genes to Cells 5 397-406 (2000)
- 2) Hirabayashi, T., and Shimizu, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta1488, 124-138 (2000)
- 3) Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematus, H. and Takiwa, Y. Inhibitory Regulation of Rac Activation, Membrane Ruffling, and Cell Migration by the G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor EDG5 but Not EDG1 or EDG3. Mol. Cell. Biol. 20, 9247-9261 (2000)
- 4) Takaku, K., Sonoshita, M., Sasaki, N., Uozumi, N., Doi, Y., Shimizu, T., and Taketo, M.M. Suppression of intestinal polyposis in Apc-716 knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A2 gene. J. Biol. Chem. 275, 34013-34016 (2000)
- 5) Kawasaki, Y., Kume, K., Nakade, S., Haga, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Brain-specific expression of novel G-protein-coupled receptors, with homologies to Xenopus PSP24 and human GPR45. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276, 960-964 (2000).
- 6) Kawasaki, Y., Kume, K., Izumi, T., and Shimizu, T. Mammalian PSP24s are not responsible to lysophosphatidic acid in mammalian expression systems. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276, 952-959 (2000).
- 7) Nakatani, N., Uozumi, N., Kume, K., Murakami, M., Kudo, I., and Shimizu, T. Role of cytosolic phospholipase A2 in lipid mediator productions and histamine release in mouse bone marrow-derived mast cells. Biochem. J. 352, 311-317(2000).
- 8) Kato, K., Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Cell-specific transcriptional regulation of human leukotriene B4 receptor gene. J. Exp. Med. 192,413-420 (2000).
- 9) Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T., and Shimizu, T. A second leukotriene B4 receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. J. Exp. Med. 192, 421-432 (2000)

- 10) Shindou, H., Ishii, S., Uozumi, N., and Shimizu, T. Roles of Cytosolic Phospholipase A2 and Platelet-Activating Factor Receptor in the Ca-Induced Biosynthesis of PAF. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271, 812-817 (2000)
- 11) Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kume, K., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role of cytosolic phospholipase A2. Nature Immunol. 1, 42-46, (2000)
- 12) Ishii, S, and Shimizu, T.: Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. Prog. Lipid Res. 39, 41-82, (2000)
- 13) Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Leukotriene B4:metabolism and signal transduction. Arch. Biochem. Biophys.385, p231-241 (2001)
- 14) Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low-affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. J. Biol. Chem. 276 印刷中
- 15) Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Co-expression of two LTB4 receptors in human mononuclear cells. Life Sci. 印刷中

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社