

PCR は、25 μ l 中に 0.5 μ l の逆転写産物を混ぜ、Taq polymerase (TAKARA)を用いて、94 °C 40 秒、60 °C 30 秒、72 °C 1分にて 30 サイクル行った。G3PDH の増幅もコントロールとして 25 サイクル行った。

気道系に発現する mBD-3, mBD-4, mBD-6 の PCR については、同様にイントロンをはさむ特異的なプライマーを

mBD-6 : 5'端, TCATGAAGATCCATTACCTG
3'端-TGTGCATATTCACGAAGAAG

mBD-4 :

5'端, CTTCAATCATGAGGATCCATTACCTTC
3'端, GGAGCAAATTTCTGGCAATTTATTCATC
のごとく作製した。

PCR は、Advantage-HF2 PCR kit (Clontech) を用いて、94 °C 15 秒、68 °C 3 分にて 35 サイクル施行した。

6) In situ Hybridization 我々は、長さ 300 bp の mBD -6 および mBD-3 の 第 2 エクソンに相当する DNA 断片を bacterial artificial chromosome D11 (Incyte Genomics) から PCR により増幅後、TA クローニングの手法により pCR4-TOPO ベクター (Life Technologies, Inc.) に挿入した。Antisense および sense RNA プローブは、これらのプラスミドから DIG RNA labeling kit (Roche) の T3 あるいは T7 RNA ポリメラーゼを用いて作製した。

マウス食道、気管を、4%パラホルムアルデヒドに4度で一晩浸して固定し厚さ 20 μ m の切片を作製した。切片は、1 μ g/ml プロテインース K に 37 °C 5 分、2 mg/ml グリシンに 30 秒浸した後、3.7% ホルムアルデヒド/ PBS 下にて 20 分間、後固定し、0.25% 無水酢酸/ 0.1M トリエタノールアミンにて 10 分間アセチル化した。ハイブリダイゼーションは、5XSSC, 1% SDS, 50% ホルムアミド, 1 mg/ml イースト tRNA 下、1 mg/ml のプローブにより 55 °C

で一晩行った。次に、2XSSC, 1% SDS, 50% ホルムアミド下で 2 度、0.2XSSC, 0.1% SDS, 50% ホルムアミド で 1 度それぞれ 60 度 30 分洗浄した。切片は、1:2000 の希釈率で溶解した AP-conjugated 抗 DIG 抗体と 4 度一晩反応させたのち、50 mg/ml NBT, 50 mg/ml BCIP と反応させ観察した。

(倫理面への配慮)

5 のヒト RNA 採取用手術検体の使用にあたっては、研究の内容について文書および口頭にて主治医より本人に説明し、書面にて同意を得たのち行われた。本研究は、通常の術式にしたがって採取された組織の一部を研究目的に使用するものであり、診療上の支障となることは一切ないよう配慮した。また、個人情報についても、病名および術式以外は研究者に伝わらぬよう配慮した。

なお、この研究は、手術を行った三井記念病院の倫理委員会の承認を事前に得たうえで行われた。

5、6 のマウスの組織採取については、頸椎脱臼による安楽死のうえで行われた。

また、我々の研究においてもヒトゲノム情報を利用しているが、公開されたデータベースを利用しており個人情報に関わるものではない。

C. 研究結果

1) 新規 human β -defensin 遺伝子の同定

ヒトゲノムの塩基配列を解析することにより、我々は β -defensin をコードしうる配列が新たに複数存在することを見出し、RT-PCR により、2 つの遺伝子について実際の発現を確認した。これらの新規の β -defensin は、既知の β -defensin と共通した特異的なシステインモチーフを保持しており、human β -defensin-5 (hBD-5) および human β -defensin-6 (hBD-6) と命名した。

2) 新規 mouse β -defensin 遺伝子の同定

ヒトゲノムと同様にマウスゲノムの塩基配列を解析することにより、マウスにおいても β -defensin をコードしうる配列が新たに複数存在することを見出した。RT-PCRにより、5つの遺伝子について実際の発現を確認した。これらの新規の β -defensin は、既知の β -defensin と共通した特異的なシステインモチーフを保持しており、mouse β -defensin-11 (mBD-11), mouse β -defensin-12 (mBD-12), mouse β -defensin-14 (mBD-14), mouse EP2c (mEP2c),

mouse EP2e (mEP2e) と命名した。

なお、mEP2c, mEP2e は、EP2 ファミリーと総称されるヒト HE2 β 1 のホモログであるためこのように命名した。なお、mBD-11 は、NCBI database の defb11 gene (AJ437648) と同一であり、mBD-12 および mEP2e は、NCBI database 上の RIKEN's full-length cDNA sequence (AK020311 および AK020333) と同一の遺伝子と思われる。

さらに、mBD-11 と類似した配列をもつ mouse β -defensin-34 (mBD-34)も、少ないながらも実際に発現していることが RT-PCR により明らかとなった。また、PCR 増幅によりマウスのこれらの遺伝子には多くのプラスヴァリアントの存在することが明らかとなった。mBD-12 遺伝子には2つ、m EP2 遺伝子 には6つのプラスヴァリアントが存在し、そのうち、特に mEP2 遺伝子では4種類のヴァリアントが β -defensin に特徴的なシステインモチーフを保持している。

3) マウスとヒトの β -defensin の比較

β -defensin 遺伝子は、ヒトあるいはマウスのクロモソーム 8 上に大きな遺伝子クラスターを形成している。ヒトとマウスのク

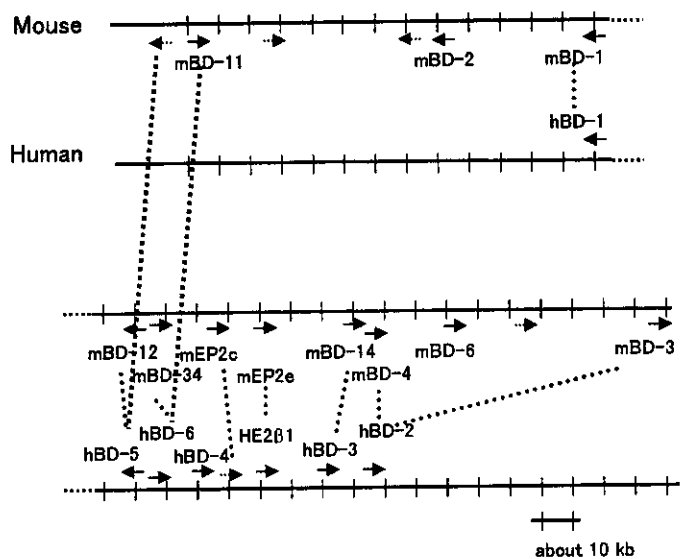


図1 Gene cluster of mouse and human β -defensin genes

ラスターを比較すると、 β -defensin 遺伝子の位置と方向はゲノム上でよく保たれていることが明らかとなった(図1)。しかし、hBD-4に相当するマウス遺伝子は存在せず、逆にmBD-2, 6に相当するヒト遺伝子は存在しない。

また、mEP2c, mEP2eに相当するヒト遺伝子はゲノム上に存在するものの、精巢上体での発現は確認できなかった。ヒトのHE2 遺伝子とマウスEP2 遺伝子には複数のプラスヴァリアントがある。そして、相当するゲノム配列は保たれているが、共通した mRNA 前駆体が、種によって異なったスプライシングを受けるようである。

4) mBD-6 および mBD-12 の抗菌活性

mBD-6 および mBD-12 の抗菌活性を確認するために、それぞれのペプチドを化学合成により作製し、その抗菌活性を HNP-1 と比較した。なお、HNP-1 は、ヒト好中球顆粒中の認める α -defensin である。mBD-6 および mBD-12 の抗菌活性は 20 μ g/ml で有意に HNP-1 より強かった (Student's *t* test, $p < 0.01$) (図2A)。既に報告

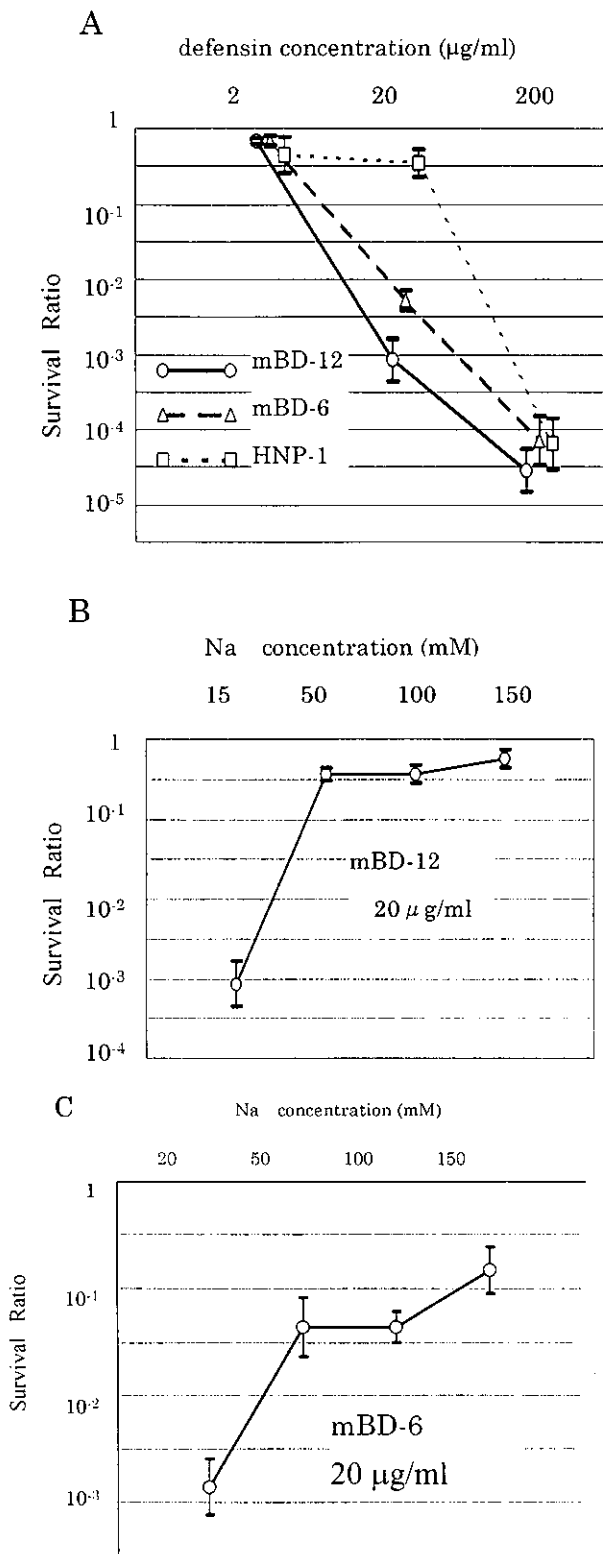


図2 defensin 投与下で生存した菌のコロニー数のコントロールとの比を Survival Ratio とした。Log₁₀ Survival ratio の平均と標準誤差を図に示す。A.mBD-6 (△)、mBD-12(○)とも 20 µg/ml で有意な抗菌活性を示す。B.C. mBD-12, mBD-6 とも 50mM 以上の塩濃度で有意な抗菌作用の低下を認めた。

されているヒトβ-defensinの有効な濃度は5 - 60 µg/ml であるから、これらの抗菌活性は他の既に報告されたβ-defensin に相当するものである。また、mBD-6 および mBD-12 の抗菌活性は、他の多くのβ-defensin と同様に、高濃度の NaCl により有意に低下した (Student's *t* test, *p* < 0.01) (図 2 B, C)。

5) β-defensin の組織分布 RT-PCR により hBD-5 および hBD-6 は、脳、気管、肺、心、肝、腎、骨格筋などの主要な臓器での発現は認められず、精巣上体に特異的に発現していることが明らかとなった(図 3 A)。この発現パターンは、既に報告されていた hBD-4 と同一であった。以前の報告は、hBD-4 の主要な発現を精巣に認めると報告しているが、我々の結果は、hBD-4 の発現が、精巣ではなく精巣上体であることをより正確に示している。HE2β1 の発現も今まで十分に評価されていなかった。我々の RT-PCR では、ヒト精巣上体でのみ HE2α1 に相当する 546-bp の PCR 産物と HE2β1 に相当する 470-bp の PCR 産物が認められ、HE2 の発現も精巣上体に局限していることが示された。

次に、mouse β-defensin の発現を評価するために、オス ICR マウスの腸、胃、肝、腎、心、脳、食道、舌、肺、気管、骨格筋、精巣上体、精巣の全 RNA を抽出した。mouse β-defensin の RT-PCR により、mBD-11、mBD-12、mEP2c、mEP2e の発現は、精巣上体に局限しており、mBD-3 と mBD-14 の発現は、食道、舌など幅広い組織に認められることが明らかとなった (図 3B)。

mBD-34 や mEP の他のヴァリエーションについても、やはり精巣上体に局限したシグナルが得られた (図 3B)。しかし、これらのシグナルはたいへん弱い。mBD-34 や

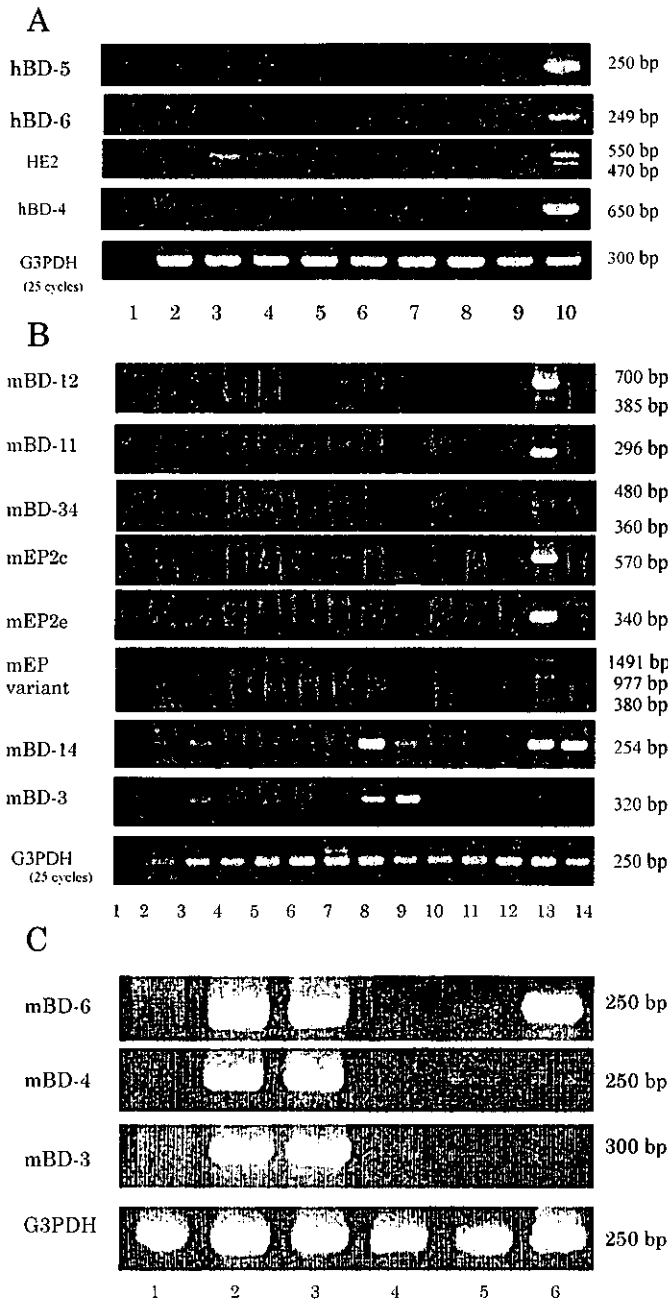


図3 表記のヒトおよびマウス β -defensin と G3PDH の RT-PCR を施行。

A. 1. cDNA なし 2. 脳 3. 気管 4. 肺 5. 心臓 6. 肝 7. 腎 8. 骨格筋 9. 精巣 10. 精巣上体

B. 1. cDNA なし 2. 腸 3. 胃 4. 腎 5. 肝 6. 心臓 7. 脳 8. 食道 9. 舌 10. 肺 11. 気管 12. 骨格筋 13. 精巣上体 14. 精巣

C. 1. 腸 2. 食道 3. 舌 4. 肺 5. 気管 6. 骨格筋

ヒトでは、hBD-4, hBD-5, hBD-6, HE2 とともに精巣上体に特異的に発現している。マウスでは、mBD-3, mBD-4, mBD-6, mBD-14 が、食道、舌など多彩な組織に発現している。

mEP ヴァリアントの発現量は、精巣上体においても微量と思われる。

また、RT-PCR を利用して、mBD-3, mBD-4, mBD-6 の発現を評価した。これらのアイソフォームは、食道、舌、気管に発現を認めた (図 3C)。また、mBD-6 は骨格筋にも発現を認めた。

興味深いことに、ヒトおよびマウスのゲノム上の遺伝子の位置が、発現パターンの特徴をよく反映していることが明らかとなった。すなわち、mBD-14 と mEP2e を境に、精巣上体に特異的に発現するアイソフォームのクラスターと食道、舌を中心に多彩な組織に発現するアイソフォームのクラスターが存在する。境界に位置する mBD-14 のみ舌、食道に加えて精巣、精巣上体にも大量に発現していることも興味深い。

6) 細胞レベルでの mBD-3, mBD-6 の発現分布

我々の組織分布の評価では、mBD-3, mBD-4, mBD-6 は多彩な組織で発現していることが明らかになった。さらに、詳細な発現パターンを評価するために、食粘膜下組織にも発現を認めた (図 4A)。また、気管では、mBD-3, mBD-6 とともに、意外にも上皮よりむしろ粘膜固有層、粘膜下組織に発現を認めた (図 4B)。なお、sense プローブでは、シグナルは認められなかった。

mBD-6 は、骨格筋にも強い発現を認めることが特徴である。骨格筋においても、筋線維間の結合織や神経線維に発現を認めた (図 5A)。筋線維については、一部の筋線維に特に強い発現を認めた (図 5B)。

D. 考察

我々は、複数の新規 β -defensin を同定し、その発現分布について検討した。defensin ファミリーがゲノム上で遺伝子ク

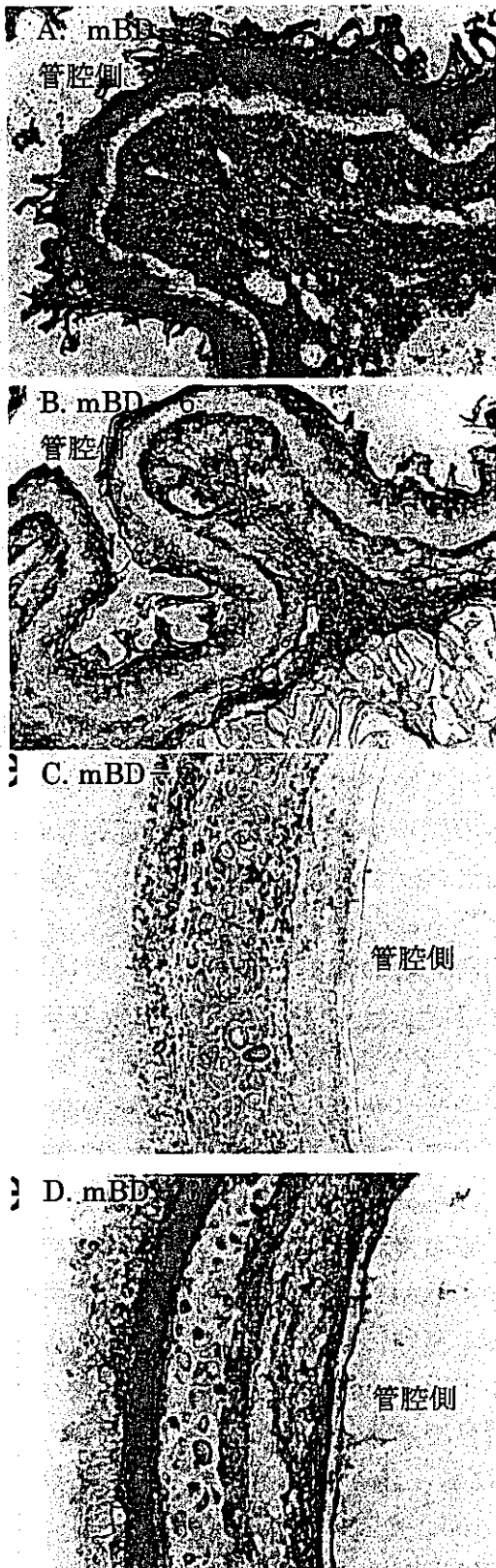


図4 食道 (A, B) および気管 (C, D) における in situ hybridization。食道上皮の表層に加えて、食道および気管の粘膜固有層、粘膜下組織にも発現を認めることがわかる。

ラスターを形成することを利用して、ゲノム塩基配列から新たな β -defensin 遺伝子を見出した。

defensin は、細菌、真菌、ウイルスなど広範囲に抗菌スペクトルをもつ。HNP-1 や hBD-2 の結晶解析の結果から、複数の defensin の 2 量体が脂質膜上で複合体を形成し、細胞膜を横断するポアをつくると考えられている。このポアにより、イオン透過性が亢進し、細菌は最終的に死に至る。

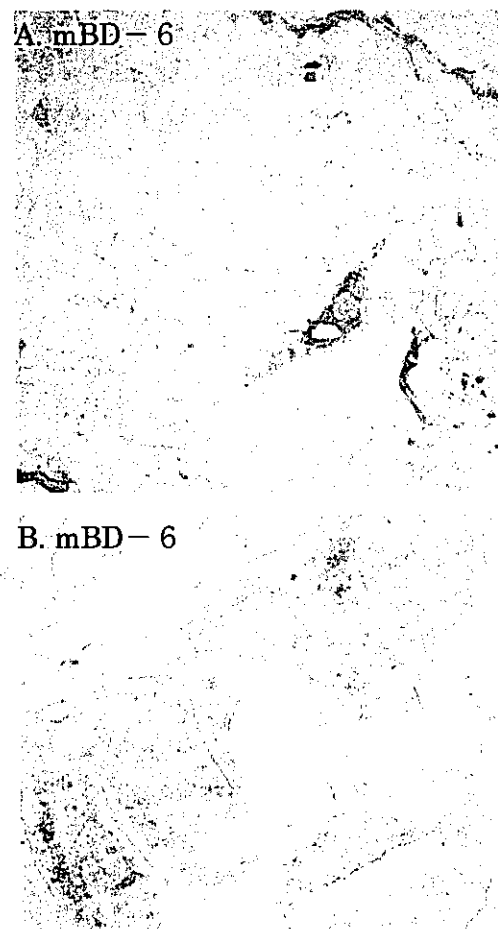


図5 骨格筋 における mBD-6 の in situ hybridization。A. 筋線維間の結合織に強い発現を認める。B. 筋線維全体にも発現を認めるが、一部の筋に特に強いシグナルを認める。

また、defensin の抗菌活性の特徴として、その多くがイオン濃度の上昇に伴って活性の低下することが知られている。

我々は、mBD-6 および mBD-12 ペプチドを化学合成することにより、これらが塩濃度依存性の抗菌作用を示すことを証明した。mBD-6 と mBD-12 の発現分布は大きく異なるが、いずれも抗菌物質として各々の臓器で機能していることがわかる。

ヒトおよびマウスの組織には、複数の β -defensin のアイソフォームが同定されており、これらは、互いに機能を代償しあっていると思われる。実際、mBD-1 単独の遺伝子欠損マウスでは尿道の常在菌数などにわずかな差異を認めるのみであった。したがって、 β -defensin の生理的な機能や病態との関わりを知るためには、アイソフォーム全体の同定が最初のステップとして必須である。

ゲノム塩基配列を利用した複数の β -defensin の同定により、 β -defensin ファミリーには2つのグループの存在することが明らかとなった。すなわち、ヒトでは、

hBD-4, -5, -6, HE2 β 1のように精巣上体に特異的な一群と hBD-1, -2, -3 のように多彩な組織に発現する一群が存在する。マウスでは、mBD-11, -12, -34, mEP2c, mEP2e が精巣上体に特異的な一群に属し、mBD-1, -2, -3, -4, -6 は多彩な組織に発現する一群に属するといえる。さらに興味深いことに、ヒトのゲノム上で、精巣上体に特異的な β -defensin 遺伝子は、約 40 kb のなかに集中して位置している。一方、ヒトでは hBD-2, hBD-3 が、マウスでは mBD-3, mBD-4, mBD-6, mBD-14 が、ゲノム上で隣接して位置しており、その発現パターンにおいても食道や舌という共通した組織での発現が確認されている。

我々の実験結果は、気道系での

β -defensin の機能を追及するうえで重要な方向性を提供している。前述のように、気道系においても、複数の β -defensin が互いに機能を代償しあっていると予想される。一方で、Schutte らのヒトおよびマウスゲノム全体の解析では、20 個以上の遺伝子が β -defensin をコードする可能性があると指摘している。これらの遺伝子全体の機能、動態を同時に追及することは、たいへん困難である。我々の β -defensin 遺伝子のゲノム上の配列と発現パターンの解析から、ヒトでの hBD-2, hBD-3、マウスでの mBD-3, -4, -6, -14 が、一つの機能単位として作用していることが示唆されている。hBD-2、mBD-3, mBD-6 については、炎症刺激に誘発される肺での発現が報告されており、これらのアイソフォームが、炎症性肺疾患と β -defensin の関連を考えるための最初のターゲットになると思われる。

共同研究者の富田らは、ヒトの気道系の細胞株 LC2/ad において、hBD-2 発現が、リポポリサッカライドの刺激により上昇し、デキサメサゾンがその発現を抑制することを指摘している (図 6)。一方、COX 阻害薬による抑制は認められなかった。また、細菌性肺炎患者や非定型抗酸菌患者の血漿や BAL 液で hBD-2 濃度が健常者に比較して有意に高値であったと報告されている。 β -defensin と病態との関連を示唆する所見である。

意外にも、我々の検討は、mBD-3 や mBD-6 が、食道や気管の粘膜固有層、粘膜下組織にも同時に発現することを示した。このような発現パターンは、mBD-6 が骨格筋のような間葉系細胞からなる組織にも発現していることとも合致する所見である。

以前より hBD-2 が、抗菌作用を示すだけ

でなく、CCR6 受容体を通して未熟な樹状細胞やT細胞の遊走作用を示すことが指摘されてきた。また、近年、mouse β -defensin が、Toll-like receptor 4 を通して樹状細胞を活性化することも指摘されている。このような、サイトカインとしての機能を追求するうえで、mBD-3 や mBD-6 が上皮細胞から気道や食道の管腔内に分泌されるだけでなく、間葉系細胞から体液内に分泌されることを示唆する知見はたいへん重要である。

E. 結論

- 1) ヒトゲノム塩基配列から、新規の β -defensin 遺伝子 human β -defensin-5 および human β -defensin-6 を同定し発現を確認した。
- 2) mouse β -defensin-14、mouse EP2c、mouse EP2e を同定し発現を確認した。また、mouse β -defensin-12 については、抗菌活性を証明した。
- 3) β -defensin の組織分布の検討により、hBD-4、hBD-5、hBD-6、HE2 β 1 は、精巣上体に特異的に発現していることが明らかとなった。マウスでは、mBD-11、mBD-12、mBD-34 および、mEP2c、mEP2e などの EP2 ファミリーが精巣上体特異的に発現していることが明らかとなった。
- 4) mBD-3、mBD-4、mBD-6、mBD-14 は、食道や舌など多彩な組織に発現していることが明らかとなった。
- 5) mBD-3、mBD-6 の発現を細胞レベルで観察することにより、これらが上皮細胞だけでなく、間葉系の細胞にも発現していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi Y. et. al., Identification of Multiple Novel Epididymis-Specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunology* 2002, 169: 2516-2523
- 2) 山口泰弘. 抗菌ペプチドによる気道の感染防御. *呼吸* 2002 21 巻 9 号: 799-804
- 3) Yamaguchi Y et.al., A novel mouse beta-defensin, mBD-6, predominantly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2001 276:31510-31514
- 4) Tomita T et. al., Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). *Respirology*. 2002 7:305-10.

2. 学会発表

- 1) 山口泰弘 ら. 新規 β -defensin の同定とその発現パターンの検討. 第 4 4 回日本老年医学会 学術集会 (2002)
- 2) 山口泰弘 ら. The analysis of characteristic mRNA distribution of the novel mouse β -defensin, mBD-6. 第 2 4 回日本分子生物学会 年会 (2001)

分担研究報告書

脂質メディエーターに関する分子生物学的解析

分担研究者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科 助手

研究要旨

- 1)炎症性メディエーターであるシステイニルロイコトリエンの2つの特異的な受容体(CysLT1とCysLT2)の構造と機能、及び肺におけるmRNAの発現をマウスについて明らかにした。今後のシステイニルロイコトリエンの炎症性肺疾患への関与を探る上で、重要な情報を手に入れることができた。
- 2)マウスの腹腔マクロファージを炎症性メディエーターである血小板活性化因子(PAF)によってPAF受容体を介して刺激すると、細胞内部と細胞外部の両方においてPAFが分解されることを示した。このPAF受容体依存的なPAFの分解機構は、炎症惹起物質であるPAFが過度に蓄積しないように働き、炎症性肺疾患の増悪化を防ぐことに役立っているかもしれない。
- 3)クレブシエラ菌によるマウスの肺炎時に、PAFは受容体を介して感染防御作用を及ぼすことを示した。PAFは好中球の貪食作用を促進することによってこの細菌感染防御作用を示すようである。

1. システイニルロイコトリエン受容体のクローニング

1-A. 研究目的

システイニルロイコトリエンと総称されるLTC₄、LTD₄、LTE₄は、5-リポキシゲナーゼによるアラキドン酸の酸化・脱水反応と、それに続くLTC₄合成酵素によるグルタチオン(システインを含む)添加反応で生合成される。システイニルロイコトリエンが持つ平滑筋収縮や炎症惹起等の作用は、少なくとも二種類の特異的なGタンパク質共役型受容体(CysLT1及びCysLT2)を介することが薬理学的研究によって明

らかにされている。今回、私はシステイニルロイコトリエンの炎症性肺疾患への関与を明らかにすることを目的として、マウスCysLT1とCysLT2受容体をクローニングし、その機能と肺における発現を調べた。

1-B. 研究方法

ヒトCysLT1受容体及びCysLT2受容体DNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、マウスゲノムライブラリー

		I	II	
CysLT1	1'	MNGTENLTT--SLINNTCHDITIDEFRNQVYSTMYSVISVVGFGNSFVLYVLIKTYHEKSAFOVYMINLAIALDILCVCTPLRVVYVYVHKGKWI.FSDFLCGL		
CysLT2	1'	M---EVTGTPSS--YSNRNCTIENFKKEFYRIIYLIIPFWGALGNFGSIYVFLQTKCKSTSYNVFMLNLATSDFLEZISTLPERACYYFRGSNW.FDGLACRV		
		III	IV	
CysLT1	101'	TTYALYVNLVCSIPFMTAMSPFRCVAIVFPVQINLVTOKKARFVCIGIWIIFVILTSSPFLMYKSYQDEKNNTKCEPPQNNQAKKYVLLHYVSLPFGF		
CysLT2	98'	MSYSLVYVMYTSIYPLTVLSVVRPLATVHPFRMFHVTSVRSRWILCGLIWF--IMASSALLLVNGQERKDNITISCTP--LSPOKEKSLIMNHIAVAVGR		
		V	VI	VII
CysLT1	201'	IIPFVTTIIVCYTMIILTLKNTMKKNMP--SRRKAIGNIIVTAAELVSGFMEYHIORTIHLHLLHSETRPCDSVLRMOKSVVITLSLAASHNCCHDPLKYFES		
CysLT2	195'	LLPPLTLTICYLLIIRILLKARIPESGPRAAHRKALTTIVIAMITFLLCFLPYHALRT--LHLVTWQKDSGDVLI--HKATVITLMAAANSCHNPLLYFA		
CysLT1	301'	GGNFRRI--STFRKHLSSMTYVPKKASLPEKGEEICNE		
CysLT2	293'	GENFKARLRAIFSKVHL		

図1 マウス CysLT1 受容体とマウス CysLT2 受容体のアミノ酸配列の比較

推定した各受容体の膜貫通部位には下線を引いた。アスタリスク (*) は両受容体間で同一のアミノ酸残基を示し、ドット (·) は類似したアミノ酸残基を示す。

からマウス CysLT1 受容体と CysLT2 受容体の両遺伝子 DNA をクローニングした。これらを哺乳動物細胞での発現に適した発現プラスミドに組み込み、哺乳動物細胞(CHO 細胞と HEK293 細胞)にトランスフェクションして、それぞれの受容体を安定に発現する株を樹立した。カルシウムインディケーター、フラ-2 を取り込ませたこれらの細胞をシステイニルロイコトリエンと反応させ、細胞内カルシウム濃度の時間変化を追った。一方、PC12 細胞に両受容体の発現プラスミドとルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを同時にトランスフェクションし、一過性にそれぞれの受容体を発現させた。この細胞をシステイニルロイコトリエンで刺激し、レポーター遺伝子の発現上昇を観察した。ノーザン解析用にマウス肺をホモゲナイズして総 RNA を抽出し、オリゴ(dT)ビーズを使って総 RNA からポリ(A)付加 RNA (mRNA)を精製した。この mRNA をホルマリン変性下で電気泳動した後に、ナイロン膜に転写して固定した。³²P でラベルしたマウス CysLT1、CysLT2 受容体の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。

(倫理面への配慮)

すべて試験管内におけるマウスの研究なので、倫理的問題発生しないと判断し、特別な措置は講じていない。

1-C. 研究結果

1) CysLT1 受容体

得られたマウス CysLT1 受容体クローンには、ヒト CysLT1 受容体と 87% の相同性を示す、339 アミノ酸をコードするイントロンを持たないオープンリーディングフレームが含まれていた(図1)。

CysLT1 受容体の HEK293 安定発現株は LTD4 に反応して、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こした。LTC4 の反応性は LTD4 に比べ著しく劣っていた。また、マウス CysLT1 受容体を PC12 細胞に発現

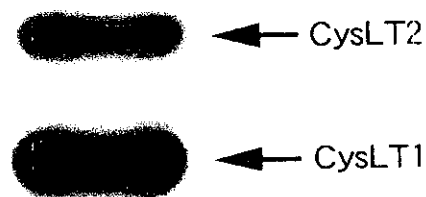


図2 マウス肺における CysLT1 と CysLT2 受容体 mRNA の発現

3 μg ポリ(A)付加 RNA を電気泳動した。

させてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、やはりLTD4に対してのみ濃度依存的反応が観察された。ヒトCysLT1受容体特異的アンタゴニストMK-571とプラナルカストは、LTD4によるカルシウム濃度の上昇とルシフェラーゼ活性の上昇に対し影響を与えなかった。

マウスCysLT1受容体DNAをプローブとして、マウス肺由来のmRNAをノーザンハイブリダイゼーションで解析したところ、約3.0 kbの長さの転写物が検出された(図2)。

2) CysLT2受容体

得られたマウスCysLT2受容体クローンには、ヒトCysLT2受容体と73%の相同性を示す、309アミノ酸をコードするイントロンを持たないオープンリーディングフレーム

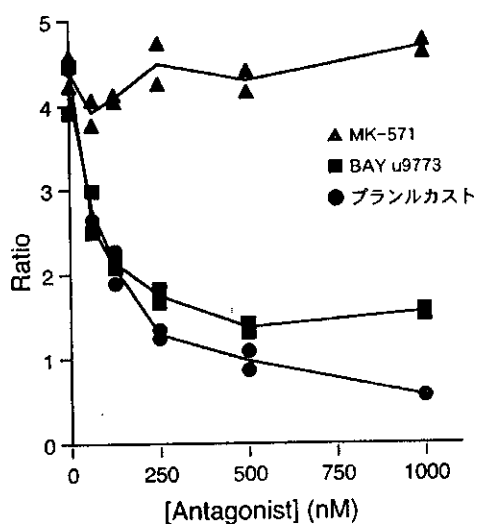


図3 マウスCysLT2受容体を一過性に発現するPC12細胞における、レポーター遺伝子発現へのCysLT受容体アンタゴニストの影響

10 nM LTD4によるレポーター遺伝子発現上昇反応に対して、3種類のCysLT受容体アンタゴニストが及ぼす影響を示す。MK-571は影響を与えなかったが、BAY u9773とプラナルカストは反応を濃度依存的に阻害した。各点は生データを示す(n=2)。

が含まれていた(図1)。マウスCysLT1とは39%の相同性があった(図1)。

CysLT2受容体のCHO安定発現株はLTC4とLTD4の両方に反応して、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こした。LTC4の方がLTD4よりも反応性は優れていた。また、マウスCysLT2受容体をPC12細胞に発現させてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、LTC4とLTD4に対してほぼ同程度の濃度依存的反応が観察された。ヒトCysLT1受容体特異的アンタゴニストMK-571は、システイニルロイコトリエンによるこれらの反応(カルシウム濃度の上昇とルシフェラーゼ活性の上昇)に対し影響を与えなかったが、興味深いことに、同じくヒトCysLT1受容体特異的アンタゴニストとされるプラナルカストは、マウスCysLT2受容体のアンタゴニストとしても作用することが明らかになった(図3)。デュアルCysLT1/CysLT2受容体アンタゴニストであるBAY u9773は濃度依存的に抑制した。一方、BAY u9773はヒトCysLT2受容体同様、マウスCysLT2受容体に対しパーシャルアゴニストとしても働くことが観察された。

マウスCysLT2受容体DNAをプローブとして、マウス肺由来のmRNAをノーザンハイブリダイゼーションで解析したところ、約5.5 kbの長さの転写物が検出された(図2)。

1-D. 考察

マウスのCysLT2受容体はヒトのCysLT2受容体に比べ、アミノ末端とカルボキシル末端のアミノ酸がそれぞれ16、21残基短

かった。このような顕著な種差はCysLT1受容体にはない。しかしながら、今回得られた結果を見る限り、このアミノ酸の長さの違いはリガンドの結合や細胞内シグナル伝達の惹起に対し大きな影響を与えないようである。

システイニルロイコトリエンによって、哺乳動物細胞に発現したマウスCysLT1、CysLT2受容体はともに細胞内カルシウム濃度を上昇させた。この結果は双方の受容体が $G_{q/11}$ 様のGタンパク質に共役していることを示唆している。そして肺に両受容体のmRNAが発現するという結果は、細胞内カルシウムの上昇に伴う気道平滑筋の収縮を介して、炎症性肺疾患の増悪化にマウスCysLT1、CysLT2受容体が関与する可能性を示している。なお、マウスCysLT1とCysLT2受容体の細胞内シグナル伝達について、カルシウム反応以外での異同については今後の解析を必要とする。

ヒトの喘息の原因遺伝子がマッピングされた領域の近くにヒトCysLT2受容体遺伝

子が存在しているという報告がある。今回クローニングしたマウスCysLT2受容体遺伝子を使えば、ノックアウトマウスを樹立することが可能なので、今後はCysLT2受容体ノックアウトマウスに喘息症状を惹起して、その症状を野生型マウスのもものと比較することも計画している。

マウスCysLT2受容体はヒトCysLT2受容体と違い、CysLT1特異的アンタゴニストとされたプラニルカストによって拮抗された。動物モデル、特にマウスモデルにおいて得られたCysLT受容体アンタゴニストの薬効に関する結果は、慎重に解釈する必要があるかもしれない。

1-E. 結論

2つのマウスシステイニルロイコトリエン受容体(CysLT1とCysLT2)の構造と機能、肺におけるmRNAの発現が明らかになったことで、これら受容体と炎症性肺疾患との関わりを解明する上での重要な情報を得ることができた。

2. PAF 受容体依存的な PAF の分解機構

2-A. 研究目的

血小板活性化因子(PAF)は血小板の凝集作用のほか、白血球の活性化や気道収縮、血管透過性亢進等の活性を持つグリセロリン脂質の一種で、急性肺損傷や気管支喘息の発症・増悪化に関わると考えられている。PAFは特異的なGタンパク質共役型受容体を介して細胞に薬

理作用を及ぼす。PAFは細胞内外にあるPAFアセチルヒドロラーゼという分解酵素によってリゾPAFに代謝されて不活性化される。この代謝経路は、PAFが生体内で過剰に蓄積することに起因する上記の炎症性肺疾患の発症及び増悪化を防止するのに重要であると思われる。PAF受容体を含め、多くのGタンパク質共役型受容

体はリガンドと結合すると、その複合体は細胞内へ移行することが明らかになっている。この受容体の内部移行がリガンドの分解に重要であることが、現在までに幾つかの受容体で報告されている。今回私は、PAF受容体と結合したPAFが細胞の内部へ移行することによって代謝される機構を、PAF受容体欠損マウスのマクロファージを用いて解析した。さらに細胞外でのPAF代謝機構についても検討した。

2-B. 研究方法

チオグリコレートで誘導した腹腔マクロファージを回収し、プラスチックディッシュに付着させた。培地に 2 nM のアセチル基がトリチウムラベルされた PAF ([アセチル-³H]PAF) を加え、37°C でインキュベートした。規定時間後に培養液を回収し、脂質を除いた後に得られた水溶性画分に含まれる放射能を測定した。

プラスチックディッシュに付着させたマクロファージを 2 nM のアルキル基がトリチウムラベルされた PAF ([アルキル-³H]PAF) を含む培地とともに 4°C で 1 時間インキュベートして、細胞内部への移行を阻害された細胞表面上の PAF 受容体に [アルキル-³H]PAF を結合させた。氷冷したバッファで細胞を洗った後、37°C でインキュベーションを開始した。規定時間後に高濃度(1%)BSA を含む酸性バッファで細胞を洗うことにより細胞表面上に残存する[アルキル-³H]PAF を完全に洗い流した。洗い液に含まれる放射能を細胞表面上に残存する PAF に由来するものとした。

一方、酸性バッファで洗った細胞に含まれる放射能は細胞内に取り込まれた PAF に由来するものとした。

細胞内部へ移行した PAF の代謝物を調べるために、上記の実験と同様に[アルキル-³H]PAF を 4°C で結合したマクロファージから脂質を抽出して、薄層クロマトグラフィーで展開した。PAF とリゾ PAF、フォスファチジルコリンに相当する部分を回収し、含まれる放射能を測定した。

PAF で 1 時間刺激したマクロファージの培養液と[アセチル-³H]PAF を混ぜ、インキュベートした。この反応液から脂質を除いた後に得られた水溶性画分に含まれる放射能を測定し、培養液中に含まれる PAF アセチルヒドロラーゼ活性の指標とした。

(倫理面への配慮)

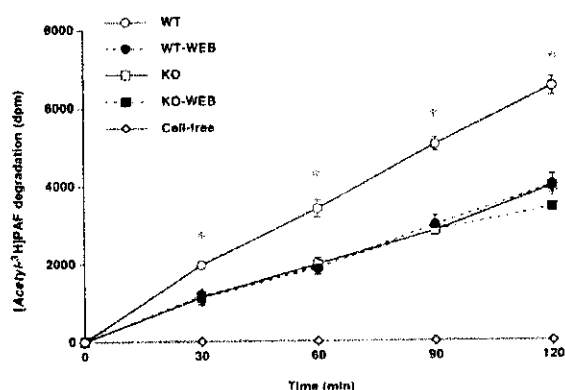


図4 野生型マウス (WT) と PAF 受容体欠損マウス (KO) のマクロファージによる PAF 分解

マクロファージを 2 nM [アセチル-³H]PAF とインキュベーションして、培地中に含まれる PAF 分解による放射能を測定した。WEB2086 (WEB) の濃度は 10 μM であった。各点は平均 ± 標準偏差 (n = 3) を示す。*, p < 0.005 vs. 他群 (分散分析と Fisher のテストによる)。

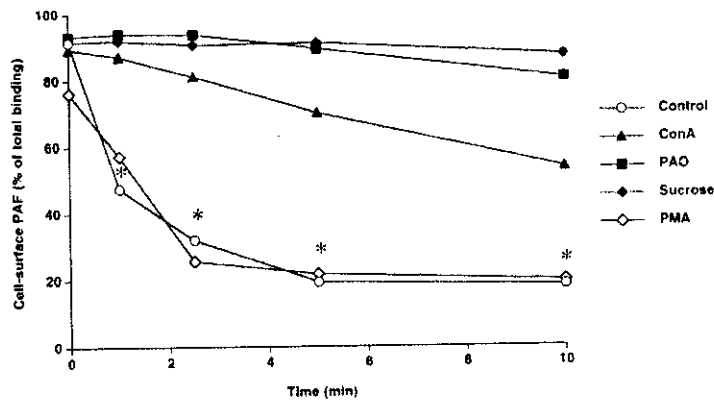


図5 PAFのマクロファージ内部への移行と受容体の内部移行阻害剤による影響

マクロファージを2 nM [アルキル-³H]PAFとインキュベーションして、細胞表面に留まっていたPAF量の時間変化を細胞全体に含まれるPAF量（細胞表面と細胞内部のPAF量の和）比で表す。各点は平均±標準偏差（n=3）を示す。標準偏差の値は小さかったので、点の中に隠れてしまっている。ConA、PAO、シュクロース処理をしたときの値は1、2.5、5、10分でコントロールと比べて有意に異なっている（*p<0.0001；分散分析とFisherのテストによる）。

マウスの扱い方については東京大学動物実験倫理委員会の規定に従った。

2-C. 研究結果

[アセチル-³H]PAFをPAF受容体欠損マウス(KO)のマクロファージと共にインキュベートしてPAFの分解を調べた。このときの分解速度は野生型マウス(WT)のマクロファージに比べ半分になっていた(図4)。この分解速度の減少はWTマウスの細胞をPAF受容体アンタゴニストのWEB2086(WEB)で処理した場合の減少と同等であった(図4)。WTマクロファージでは、細胞表面に結合したPAFは半減期約1分で急速に細胞内へ移行した(図5)。このPAFの細胞内部への移行はコンカナバリンA(ConA)または高浸透圧(0.45Mシュクロース)で処理すると阻害されたが、PMAでは影響を受けなかった。内部へ移行したPAFは半減期約20分で分解されてリゾPAFになった(図6A)。ConAで処理するとPAFのリゾPAFへの

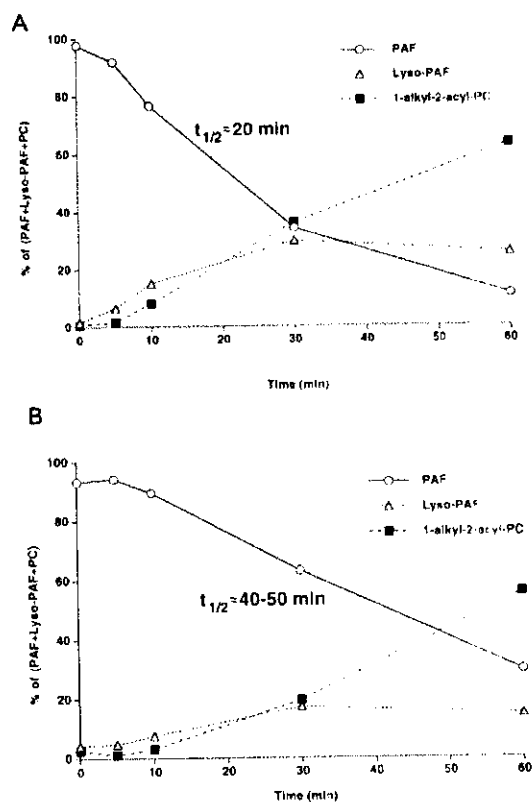


図6 マクロファージ内におけるPAFの代謝

マクロファージを2 nM [アルキル-³H]PAFとインキュベートしてPAF受容体に結合させた。このPAFの代謝の時間経過をConA非存在下(A)または存在下(B)で調べた。結果は、PAFとPAFの代謝物(リゾPAFとフォスファチジルコリン(PC))の相対的な放射能を総放射能に対する比で表す。各点は平均±標準偏差(n=3)を示す。標準偏差の値は小さかったので、点の中に隠れてしまっている。

分解が抑制された。(図 6B)。リゾ PAF はその後 1-アルキル 2-アシルホスファチジ

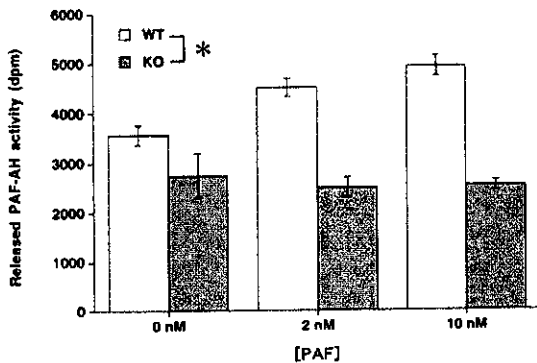


図 7 PAF 受容体を介した PAF 刺激による PAF アセチルヒドロラーゼの放出

野生型マウス (WT) と PAF 受容体欠損マウス (KO) のマクロファージを PAF で刺激したときに培地中に含まれる PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF 分解酵素) 活性を示す。各値は平均 ± 標準偏差 (n=3) を示す。両マウス間では統計学的有意差がある (*, p=0.0004; 2 元分散分析による)。

ルコリンへと代謝された(図 6A)。さらに、WT マウスのマクロファージからの PAF アセチルヒドロラーゼの放出は PAF によって促進されたが、KO マウスのマクロファージではこのような現象は認められなかった(図 7)。

2-D. 考察

KO マウスのマクロファージでは PAF の分解は大きく減っていた。この結果は、PAF の分解には受容体依存的な経路が重要であることを示唆する。

PAO、ConA、高浸透圧(0.45M シュークロース)処理はどれもエンドサイトーシスを阻害し、受容体の内部移行を抑制する薬剤である。今回これら薬剤の処理によってマクロファージ内部への PAF の移行が大きく抑制されたことから、PAF の細胞内移行は受容体を介していることが示唆さ

れた。また高浸透圧(0.45M シュークロース)処理はクラスリン依存的なエンドサイトーシスを阻害するので、マクロファージの PAF 受容体はクラスリンを介して内部移行しているものと考えられる。

ConA 処理すると PAF のリゾ PAF への分解が抑制されたことから、PAF の取り込みが PAF の分解を促進することが示唆された。

トリチウムラベルされた PAF を使った実験により、受容体とともに細胞内に移行した PAF は、リゾ PAF と酢酸に分解されることが明らかになった。酢酸は細胞外に遊離するが、リゾ PAF は細胞内でさらに代謝され、多くは 1-O-アルキル-2-アシル-PC に変換されるようである。

さらに本研究では、PAF 受容体を PAF で刺激すると PAF アセチルヒドロラーゼの細胞外への放出が促進されることが明らかになった。この細胞外での PAF の分解もまた、PAF 受容体を介した PAF の分解に大きく貢献しているものと考えられる。

2-E. 結論

PAF は産生された部位の近傍で作用するオートコイドの一種と考えられている。肺に常在する肺泡マクロファージは生理学的条件下で極限的な PAF 濃度を調整し、過度な生体反応が起きるのを防ぐ役割を担っているのかもしれない。また好中球にも PAF 受容体は高いレベルで発現しているため、肺炎等の炎症時にも、今回明らかにした PAF の分解機構がやはり過度に炎症が進んで組織傷害が起こるのを

抑えている可能性がある。

3. PAF と肺炎

3-A. 研究目的

PAF は白血球での貪食反応の促進作用や貪食した微生物の殺菌作用を持つ。一方で PAF は、細菌感染に伴う組織障害やショックなどの病態の惹起にも関わるとされている。このことは PAF が細菌感染時に相反する二つの生理作用を持つことを意味する。そこで本研究では肺炎を引き起こす細菌の一種であるクレブシエラ菌 (*Klebsiella pneumoniae*) をマウスに感染させ、肺炎時の PAF 受容体の *in vivo* における機能について検討した。

3-B. 研究方法

麻酔科のマウスの気道に 3×10^6 個のクレブシエラ菌を投与して肺炎を引き起こした。このプロトコールでは 5 日後までに全てのマウスは死亡した。

感染 24 時間後にマウスを屠殺し、肺胞洗浄液を回収して、中に含まれる好中球の数と貪食しているものの割合を塗沫染色後の顕微鏡観察によって求めた。別の感染マウスについては、肺胞洗浄をする

表 1 クレブシエラ菌に感染したマウスの肺胞洗浄液中に含まれる好中球が 1 つ以上の細菌を貪食している割合

マウス	細菌を貪食した好中球の割合 (%)
WT/溶媒	62.2 ± 3.3
WT/UK-74,505	31.1 ± 6.3*
PAFR-KO/溶媒	10.1 ± 5.1*

結果は平均±標準誤差 ($n = 3-6$) で示す。* $p < 0.01$ vs WT/溶媒 (t 検定による)。

代わりに生理食塩水で血管を灌流洗浄した後、肺を取り出した。この肺をホモジナイズした液体を寒天プレート上に播き、現れたコロニーを数えた。

(倫理面への配慮)

マウスの扱い方については東京大学動物実験倫理委員会の規定に従った。

3-C. 研究結果

クレブシエラ菌で肺炎を引き起こしたマウスに予め PAF 受容体アンタゴニスト UK-74,505 を投与した場合、肺胞洗浄液中の好中球数には影響を与えなかった (溶媒投与マウス: $3.40 \pm 1.77 \times 10^6$ 、UK-74,505 投与マウス: $4.28 \pm 1.37 \times 10^6$, $n = 6$)。しかしながら、細菌を貪食している好中球の割合は、有意に低かった (表 1)。同様の結果は PAF 受容体欠損マウス (KO) でも得られた。また、肺に含まれていた細菌の数は、UK-74,505 投与マウスおよび KO マウスにおいて、野生型マウス (WT) に比べ有意に増加していた (図 8)。さらに KO マウスは、野生型マウス (WT) に比べ有意に早く死亡した (図 9)。

3-D. 考察

PAF 受容体アンタゴニストは肺炎時に肺に浸潤する好中球数に影響を与えなかつ

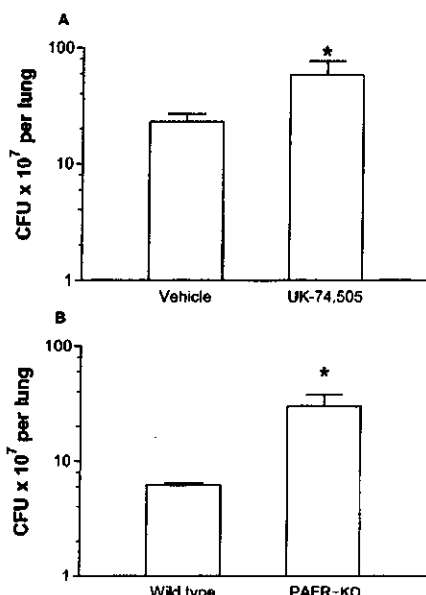


図8 クレブシエラ菌感染したマウス肺のコロニー形成数

PAF 受容体アンタゴニスト UK-74,505 で前処理したマウス (A) と PAF 受容体欠損 (PAFR-KO) マウス (B) について感染後 24 時間の結果を示す。各値は平均 ± 標準誤差 (n=5) を示す。*p < 0.01。

た。PAF は肺炎時に肺へ好中球を遊走させる作用はないようである。同様の結果は、酸による急性肺損傷を起こしたマウスに

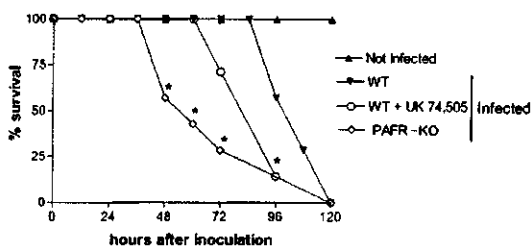


図9 クレブシエラ菌感染後のマウスの致死率

各群とも n=8。*p < 0.05 vs. 感染 WT マウス (▼)。

おいても主任研究者の長瀬らによって以前観察されている。細菌感染を起こしたマウス肺への好中球の浸潤には CXC ケモカインの重要性が以前から報告されて

いるが、今回の結果はそれらとは矛盾しないものである。

上述したように PAF は肺に浸潤した好中球の数には影響を及ぼさなかったが、貪食という好中球の重要な機能に影響を与えていることが、PAF アンタゴニストと PAF 受容体欠損マウスの実験によって強く示唆された。この貪食作用の抑制は、肺におけるクレブシエラ菌の増殖を促す結果につながり、ひいては致死率の上昇をもたらしたと考えられる。これは PAF による好中球の貪食作用の制御が非常に重要であることと、PAF が肺における細菌感染に対抗する初期免疫反応に関わることを示唆する結果である。

3-E. 結論

本研究ではクレブシエラ菌によるマウスの肺炎時に、PAF が受容体を介して感染防御作用を及ぼすことを示すことができた。肺炎の集団発生を引き起こし、また院内感染の主要な病原体であるクレブシエラ菌を本研究では用いたが、他のグラム陰性菌の肺炎に対しても PAF の炎症抑制効果は存在する可能性がある。したがって、細菌性肺炎への PAF 受容体アンタゴニストの臨床応用については、慎重に検討する必要があるかもしれない。

研究協力者

野口響子 東京大学大学院医学系研究科生化学教室 研究生

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Nagase, T., Ishii, S., Shindou, H., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2002) Airway hyperresponsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor is mediated via an atropine sensitive pathway. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** 165, 200-205.
2. Klein, A., Pinho, V., Alessandrini, A.L., Shimizu, T., Ishii, S. and Teixeira, M.M. (2002) Platelet-activating factor drives eotaxin production in an allergic pleurisy in mice. **Brit. J. Pharmacol.** 135, 1213-1218.
3. Ohshima, N., Ishii, S., Izumi, T. and Shimizu, T. (2002) Receptor-dependent metabolism of platelet-activating factor in murine macrophages. **J. Biol. Chem.** 277, 9722-9727.
4. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kita, Y., Yamamoto, H., Ohga, E., Ouchi, Y. and Shimizu, T. (2002) A pivotal role of cytosolic phospholipase A₂ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Nature Med.** 8, 480-484.
5. Barbuti, A., Ishii, S., Shimizu, T., Robinson, R.B., and Feinmark, S.J. (2002) Block of the background K⁺ channel, TASK-1, contributes to the arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. **Am. J. Physiol.** 282, H2024-H2030.
6. Ogasawara, H., Ishii, S., Yokomizo, T., Shimizu, T. and Izumi, T. (2002) Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors; mCysLT₁ and mCysLT₂. Differential pharmacological properties and tissue distribution. **J. Biol. Chem.** 277, 18763-18768.
7. Honda, Z., Ishii, S., and Shimizu, T. (2002) Platelet-activating factor receptor. **J. Biochem.** 131, 773-779.
8. Ishii, S., Nagase, T., and Shimizu, T. (2002) Platelet-activating factor receptor. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 68-69, 599-609.
9. Strømgaard, K., Saito, D.R., Shindou, H., Ishii, S., Shimizu, T., and Nakanishi, K. (2002) Ginkgolide derivatives for photolabeling studies: preparation and pharmacological evaluation. **J. Med. Chem.** 45, 4038-4046
10. Soares, A.C., Pinho, V.S., Souza, D.G., Shimizu, T., Ishii, S., Nicoli, J.R., and Teixeira, M.M. (2002) Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. **Brit. J. Pharmacol.** 137, 621-628.

11. Vogensen, S.B., Strømgaard, K., Shindou, H., Jaracz, S., Suehiro, M., Ishii, S., Shimizu, T., and Nakanishi, K. (2003) Preparation of 7-substituted ginkgolide derivatives: potent platelet activating factor (PAF) receptor antagonists. **J. Med. Chem.** 46, 601-608.

12. Nagase, T., Uozumi, N., Aoki-Nagase, T., Terawaki, K., Ishii, S., Tomita, T., Yamamoto, H., Hashizume, K., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2003) A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. **Am. J. Physiol.** in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

2)学会発表

1. 石井聡、魚住尚紀、清水孝雄、長瀬隆英、大内尉義 プレオマイシン誘導肺繊維症における cPLA2 と PAF 受容体の役割(口演) 第 12 回プロスタグランジン・ロイコトリエン・生理活性脂質の国際会議 2002 年 8 月(トルコ・イスタンブール)
2. 石井 聡、清水 孝雄 血小板活性化因子(PAF)の生体における役割(口演) 第 75 回日本生化学会大会 2002 年 10 月(京都)
3. 石井 聡、加藤 邦夫、津田 誠、井上和秀、清水 孝雄 血小板活性化因子の疼痛と神経伝達物質放出への関与(ポスター)「脳を知る」CREST シンポジウム 2002 年 11 月(京都)

研究発表リスト

英文原著

1. Nagase T, Uozumi N, Aoki-Nagase T, Terawaki K, Ishii S, Tomita T, Yamamoto H, Hashizume K, Ouchi Y, Shimizu T. A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** (in press, published on line, 10.1152/ajplung.00396, Dec. 27, 2002).
2. Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. The effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8 and MCP-1. **J Appl Physiol** 2003; 94: 179-184.
3. Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Tomita T, Ohga E, Nagai R, Kurihara H, Ouchi Y. Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2002; 283: L963-L970.
4. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in the humans and mice. **J Immunol** 2002; 169: 2516-2523.
5. Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y. Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). **Respirology** 2002; 7: 305-310.
6. Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, Shimizu T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A₂ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Nature Medicine** 2002; 8: 480-484. (新聞各紙誌上にて紹介される)
7. Nagase T, Ishii S, Shindou H, Ouchi Y, Shimizu T. Airway hyperresponsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor is mediated by an atropine sensitive pathway. **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 165: 200-205.
8. Imai Y, Shindo T, Maemura K, Sata M, Saito Y, Kurihara Y, Akishita M, Osuga J, Ishibashi S, Tobe K, Morita H, Oh-hashii Y, Suzuki T, Maekawa H, Kangawa K, Minamino N, Yazaki Y, Nagai R, Kurihara H. Resistance to neointimal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2002; 22: 1310-1315.
9. Kato N, Ikeda K, Nabika T, Morita H, Sugiyama T, Gotoda T, Kurihara H, Kobayashi S, Yazaki Y, Yamori Y. Evaluation of the atrial natriuretic peptide gene in stroke. **Atherosclerosis** 2002; 163: 279-286.

10. Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Kakoki M, Nagata D, Hayakawa H, Satonaka H, Sata M, Tojo A, Suzuki E, Kangawa K, Matsuo H, Kitamura T, Nagai R. Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury: studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene. **Circ Res** 2002; 90:657-663.
11. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K. Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. **J Mol Med** 2002; 80:105-116.
12. Soares AC, Pinho VS, Souza DG, Shimizu T, Ishii S, Nicoli JR, Teixeira MM. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. **Brit J Pharmacol** 2002;137: 621-628.
13. Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. **Prostaglandins Other Lipid Mediat** 2002; 68: 599-609.
14. Stromgaard K, Saito DR, Shindou H, Ishii S, Shimizu T, Nakanishi K. Ginkgolide derivatives for photolabeling studies: preparation and pharmacological evaluation. **J Med Chem** 2002; 45: 4038-4046.
15. Barbuti A, Ishii S, Shimizu T, Robinson RB, Feinmark SJ. Block of the background K⁺ channel, TASK-1, contributes to the arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2002; 282: H2024-H2030.
16. Ogasawara H, Ishii S, Yokomizo T, Kakinuma T, Komine M, Tamaki K, Shimizu T, Izumi T. Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors, mCysLT1 and mCysLT2: Differential pharmacological properties and tissue distribution. **J Biol Chem** 2002; 277: 18763-18768.
17. Klein A, Pinho V, Alessandrini AL, Shimizu T, Ishii S, Teixeira MM. Platelet-activating factor drives eotaxin production in an allergic pleurisy in mice. **Brit J Pharmacol** 2002;135:1213-8.
18. Ohshima N, Ishii S, Izumi T, Shimizu T. Receptor-dependent metabolism of platelet-activating factor in murine macrophages. **J Biol Chem** 2002; 277: 9722-9727.
19. Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. **J Biochem** 2002; 131: 773-779.