

た。その結果、野生型マウスと比べて PAFR-KO マウスは、ベースラインの気道抵抗は正常にもかかわらず、ムスカリン受容体刺激に対する気道過敏性が有意に抑制されていた。このことから、PAF は喘息病態時の気道過敏性惹起に重要な役割を果たしていることが明らかになった。ただし、PAFR-KO マウスでも抗原感作/曝露処理によって、生理食塩水処理の場合よりも有意に気道過敏性が上昇したことは、気道過敏性には PAF 依存的なメカニズムと PAF 非依存的なメカニズムの両方が存在することを示唆している。

喘息時には気道炎症と気道過敏性が同時にしかもそのレベルが相関して観察され、またステロイド治療によって両者がともに減弱することが知られていた。そのため、気道炎症によって気道過敏性がコントロールされているという考えがあった。しかしながら PAFR-KO マウスでは、気道炎症は十分起きていたのに気道過敏性が減弱していたことから、喘息時に観察さ

れるこれら二つの症状がそれぞれ独立して惹起する可能性が示された。実際、気道炎症を介さないで気道過敏性の惹起に至る CD4 陽性 T 細胞依存的経路が報告されているので、この経路に PAF が関わっているのかもしれない。もちろん PAF が気道炎症の下流で気道過敏性のコントロールに寄与する可能性もある。この場合、PAF は PAF 受容体を高いレベルで発現する好酸球を活性化するのに主に働くと予想される。肺に浸潤してきた好酸球の数がたとえ正常でも、PAF による活性化が起きないために、結果として気道過敏性が十分惹起されないのであろう。

1-E. 結論

今回の研究から、PAF は喘息時の気道炎症の惹起には必須ではないが、気道炎症の下流で気道過敏性をコントロールする役割や、さらに気道炎症に依存しないメカニズムでも気道過敏性をコントロールする役割を持つことが示唆された。

2. 骨粗鬆症の増悪因子としての PAF

2-A. 研究目的

PAF と骨吸収を伴う疾患との関連については、関節炎や歯周病などで PAF の産生上昇は報告されているものの、具体的に産生された PAF の疾患への関与や具体的な役割については今まで解明されていない。閉経後骨粗鬆症は、代表的な骨吸収性疾患の一つである。現在のところ、卵巣機能の低下とともに血液中のエストロゲンレベルが急激に減少することが引き金になって発症する疾患と考えられている。エストロゲンがなくなると、骨代謝

回転が増加して骨の形成・吸収(リモデリング)のバランスが崩れる結果、骨吸収の方が活発となり骨折の危険性が増大するのである。しかしながら、エストロゲンの低下から過剰な骨吸収に至る機序は複雑で、その全容はやはり解明されていない。本研究では PAFR-KO マウスを用いて、卵巣摘除による閉経後骨粗鬆症モデルの実験とそれに関連した *in vitro* の実験を行い、PAF の骨粗鬆症における関与とその作用機序を明らかにした。

2-B. 研究方法

骨粗鬆症モデルの作製

8-11 週齢の C57BL/6 に 10 回戻し交配した雌マウスを、全身麻酔下で背側より卵巣を摘除した。術後 4 週目に骨粗鬆症様症状を解析した。陰性対照群には模擬手術を行ったマウスを用いた。

骨器官培養

生後 1 日齢のマウスの頭頂骨を 1 mg/ml の BSA を含む BGJb 培地で 24 時間培養した後、IL-1 β (0.3 ng/ml) または WEB2086 (100 μ M) を加え、さらに 2 日間培養を続けた。70%エタノールで固定した頭頂骨を、軟X線を照射して撮影した。頭頂骨表面の骨吸収程度の評価は、二人の実験者がブラインドで写真を見て、それぞれ 1 点から 3 点の間で半定量的にスコア化し合計点をもとにした。

組織学的解析

70%エタノールで固定した頸骨を包埋後、厚さ 3 μ m の切片を作製しトルイジンブルー染色を施した。顕微鏡下で組織形態学的解析をブラインドで行い、海綿骨量、骨梁数、骨梁間隔、類骨面、骨吸収面を測定した。

骨芽細胞培養

生後 1 日齢のマウスの頭頂骨をコラゲナーゼとディスパーゼで消化して得られた細胞を、10% FCS 入りの α MEM で 7 日間培養して骨芽細胞を調製した。TNF- α と IL-1 β は 6 日目 (実験前日) に培地に加えた。

破骨細胞培養

ナイロンメッシュで濾した脾臓由来の細胞、または頸骨・大腿骨の骨髄細胞を RANKL (100 ng/ml) と M-CSF (10 ng/ml) を含む 10% FCS 入りの α MEM で 7 日間培養して調製した。TNF- α と IL-1 β は 6 日目 (実験前日) に培地に加えた。また、RAW264.7 細胞を破骨細胞に分化させる時は、RANKL (100 ng/ml) を含む 10% FCS 入りの DMEM で 5 日間培養した。破骨細胞であることの確認は、酒石酸耐性アルカリフォスファターゼ活性が陽性であることで行った。

リゾ PAF アセチルトランスフェラーゼ活性測定

細胞をソニケーターで破碎後、800 \times g で遠心した上清に含まれる酵素活性を 96 穴プレート上で測定した。リゾ PAF (20 μ M) と [3 H]アセチル-CoA (100 μ M) とともに遠心上清を 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした後、メタノールで反応を停止した。これを 2 mg の Bondapack C-8 レジンと混ぜ、洗浄後にレジンと吸着している放射能をカウントした。リゾ PAF 非存在下で同様に反応させたときの放射能をバックグラウンドとして両者の差を求め、PAF 産生量の指標とした。

細胞内カルシウム反応

細胞を洗浄後、4 μ M の Fura-2/AM を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間取り込ませ、再び洗浄した。この細胞の懸濁液に 340 nm 及び 380 nm の波長の光を当て、その際に発した蛍光の強度比を求めた。

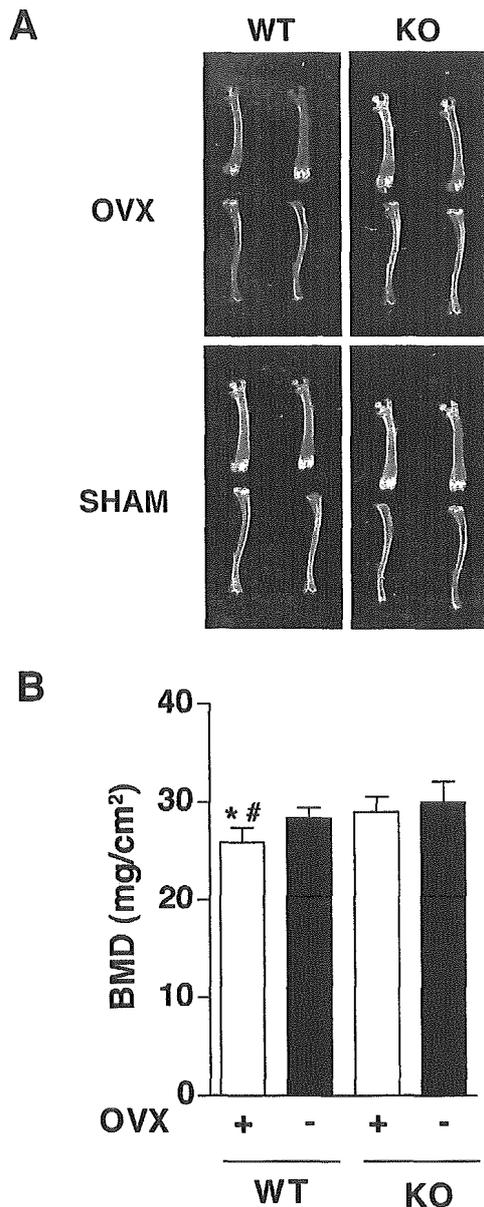


図3 X線撮影による骨の解析。(A) 卵巣摘除4週間後の頸骨及び大腿骨のX線写真。OVX：卵巣摘除；SHAM：模擬手術 (B) 骨密度の測定。卵巣摘除4週間後に大腿骨の骨密度 (BMD) を二重エネルギーX線吸収法で測定した。WT-OVX: $n=6$; WT-SHAM: $n=7$; KO-OVX: $n=5$; KO-SHAM: $n=6$ 。値は平均±標準偏差を示す。* $P < 0.005$ vs. KO-OVX; # $P < 0.05$ vs. WT-SHAM。

破骨細胞の生き残り(サバイバル)アッセイ
 上記のように骨髄細胞と破骨細胞をマウスから調製し、両者を混ぜてコラーゲンゲル上で7日間共培養した。培地は $1,25(\text{OH})_2$ ビタミン D_3 (100 nM)、プロスタグランジン E_2 (1 μM)、10% FCSを含む α MEMを用いた。その後、コラーゲナーゼで細胞をディッシュから剥がし、24穴プレートに播き直した。2時間後にコラーゲナーゼとディスパーゼを作用させて骨芽細胞だけを除去した。残った破骨細胞に $\text{IL-1}\beta$ を24時間作用させてサバイバルの延長を顕微鏡観察した。またこの際にWEB2086の影響も観察した。

カルシウム吸収アッセイ
 リン酸カルシウムでコートしたディッシュにおいて、骨髄細胞と破骨細胞の共培養を $\text{IL-1}\beta$ の存在下で48時間行った。細胞を漂白後、破骨細胞によるリン酸カルシウムの吸収によって生じた窪みの面積を顕微鏡観察下で算出した。またこの際にWEB2086の影響も観察した。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は本学の動物実験委員会へ届けた上で、動物実験実施マニュアルに沿って行った。

2-C. 研究結果

卵巣摘除マウスの骨のレントゲン写真観察(図3A)、さらに骨密度測定(図3B)および組織学的解析(図4)の結果から、野生型マウスに比較してPAFR-KOマウスは卵巣摘除されても骨吸収が抑制されていることが示された。この*in vivo*で得られた結果は、PAFが骨粗鬆症の増悪因子であることを示している。

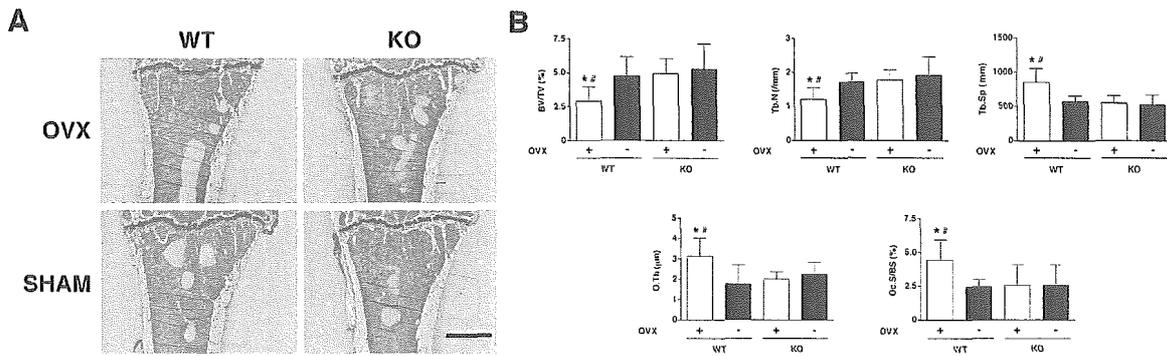


図4 PAFR-KO マウスにおける骨量減少の抑制と骨代謝回転の不変性。(A) 頸骨の骨幹端領域のトルイジンブルー染色像。スケールバーは 1.0 mm を表す。(B) 骨の組織形態計測。A の写真をもとにして海綿骨量 (BV/TV)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁間隔 (Tb.Sp)、類骨面 (O.Th)、骨吸収面 (Oc.S/BS) を測定した。WT-OVX: $n = 6$; WT-SHAM: $n = 7$; KO-OVX: $n = 5$; KO-SHAM: $n = 6$ 。値は平均±標準偏差を示す。* $P < 0.05$ vs. KO-OVX; # $P < 0.05$ vs. WT-SHAM。

骨リモデリングに関連する主な細胞は骨芽細胞と破骨細胞である。どちらの細胞が PAF を産生するのかを明らかにするために、PAF 合成に重要な酵素であるリゾPAF アセチルトランスフェラーゼの活性を *in vitro* で調べた(図5)。その結果、骨芽細胞にはこの酵素の活性はほとんどない

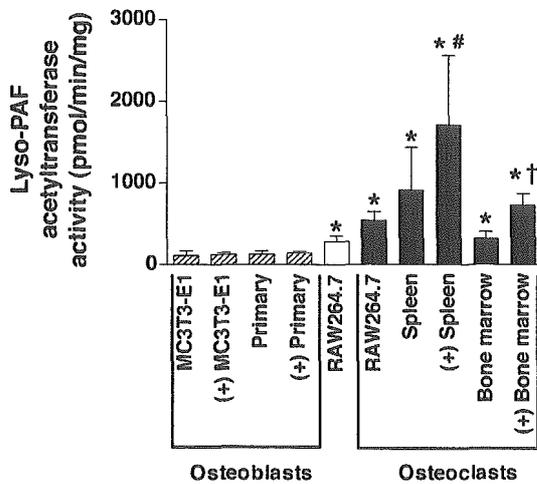


図5 骨の細胞におけるリゾPAF アセチルトランスフェラーゼ活性。MC3T3 細胞及び RAW264.7 細胞はそれぞれマウスの骨芽細胞株とマクロファージ株である。破骨細胞は RAW264.7 細胞や脾臓、骨髄から誘導することができる。(+)は TNF- α および IL-1 β で刺激したことを示す。* $P < 0.05$ vs. primary osteoblasts; # $P < 0.05$ vs. 非刺激 spleen-derived osteoclasts; † $P < 0.05$ vs. 非刺激 bone marrow-derived osteoclasts。値は平均±標準偏差を示す ($n = 3-4$)。

が、対照的に破骨細胞では高い活性が認められた。さらに破骨細胞を、エストロゲン欠乏時に骨髄内で産生亢進するサイトカイン(TNF- α および IL-1 β)で刺激すると、この酵素活性が増加することも明らかとなった。

次に骨芽細胞と破骨細胞のどちらが PAF 受容体を発現しているのかを調べるために、ノーザンハイブリダイゼーションを

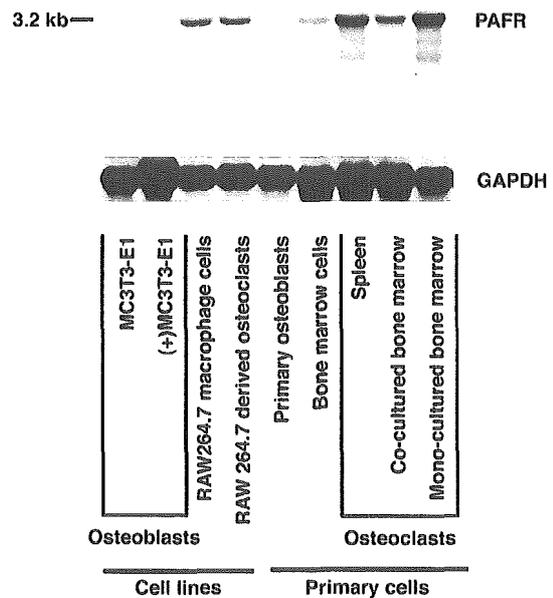


図6 PAF 受容体 mRNA の発現解析。総 RNA 10 μ g に対するノーザンハイブリダイゼーションの結果、約 3.2 kb の長さの mRNA が検出された。

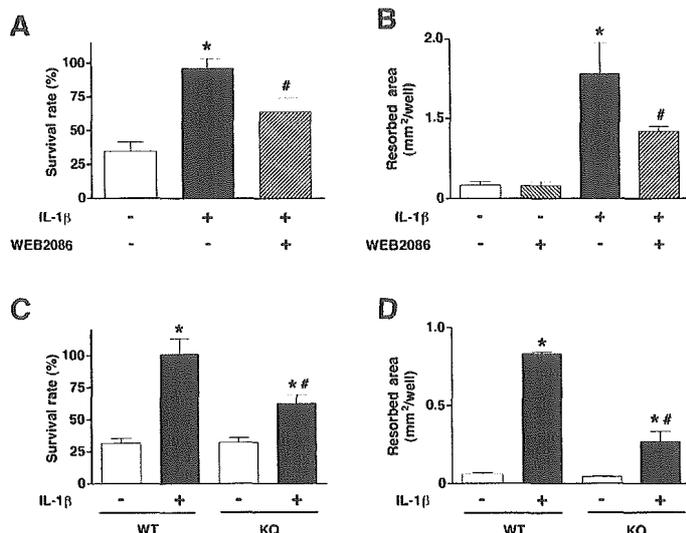


図 7 IL-1 β で促進される破骨細胞のサバイバルとカルシウム吸収に対する PAF 受容体の効果。(A) 破骨細胞のサバイバルへの PAF 受容体アンタゴニスト WEB2086 の効果。* $P < 0.0001$ vs. 未処理群; # $P < 0.0001$ vs. IL-1 β 処理群。 $n = 5$ 。(B) 破骨細胞のカルシウム吸収への PAFR アンタゴニストの効果。* $P < 0.0001$ vs. 未処理群; # $P < 0.005$ vs. IL-1 β 処理群。 $n = 3$ 。(C) PAFR-KO 破骨細胞のサバイバル。* $P < 0.0001$ vs. 各未処理群; # $P < 0.0001$ vs. IL-1 β 処理した PAFR-WT 破骨細胞。 $n = 5$ 。(D) PAFR-KO 破骨細胞のカルシウム吸収。* $P < 0.0001$ vs. 各未処理群; # $P < 0.0001$ vs. IL-1 β 処理した PAFR-WT 破骨細胞。 $n = 3$ 。値は平均±標準偏差を示す。

行った。その結果、PAF 受容体は主に骨芽細胞ではなく破骨細胞に発現することが明らかとなった(図 6)。実際、PAF による細胞内カルシウム濃度の上昇は破骨細胞でのみが認められ、骨芽細胞は PAF に反応しなかった(データ略)。

IL-1 β は破骨細胞に対し、生き残り作用(サバイバル)とカルシウム吸収促進作用を及ぼすが、PAF 受容体が機能しない状態ではこれら IL-1 β の作用は両方とも減弱していた(図 7)。骨の器官培養の結果からも同様に、IL-1 β の骨吸収効果の一部は PAF 受容体を介していることが明らかとなった(図 8)。

2-D. 考察

エストロゲンのレベルの低下は

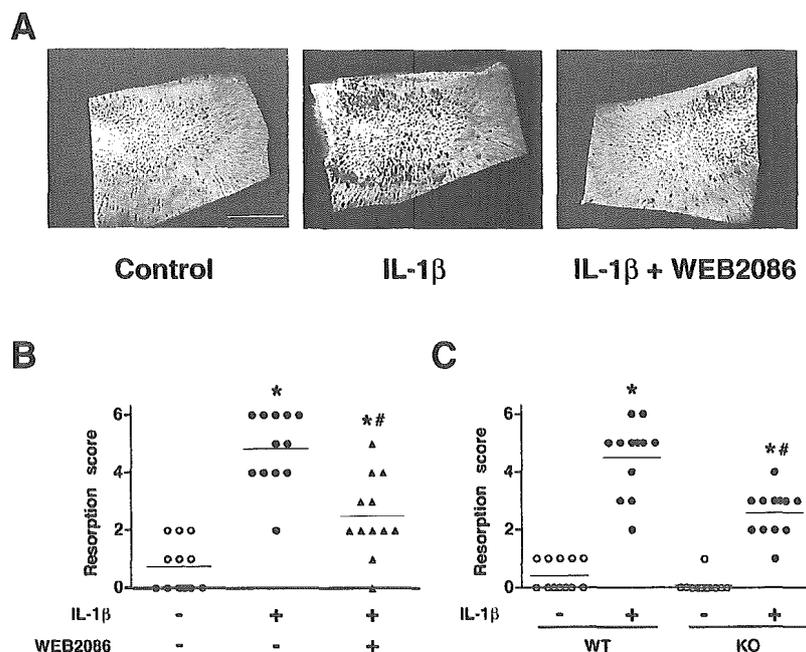


図 8 IL-1 β で促進される破骨細胞による骨吸収に対する PAF 受容体の効果。(A) IL-1 β 存在下で培養した頭頂骨 X 線撮影像。(B) と (C) 骨吸収に対する PAF 受容体アンタゴニストの効果 (B) と PAF 受容体欠損の効果 (C)。A の写真をもとにして個々の頭頂骨の骨吸収の程度を半定量的にスコア化した結果を示す。水平線は各群の平均値を示す。スケールバー: 1.0 mm。

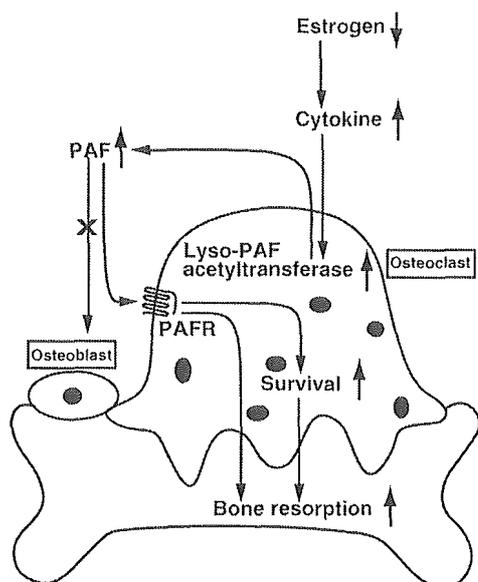


図9 骨吸収における PAF と PAF 受容体の働きについての提唱モデル。詳細は本文参照。

TNF- α やIL-1などのサイトカインの産生を増加させるという報告がある。従って、今回得られたデータをまとめると、閉経後骨粗鬆症において、(田)エストロゲンレベルの低下により作られたサイトカインが破骨細胞のリゾPAFアセチルトランスフェラーゼ活性を上げる、(用)PAF産生が増加する、(欠)PAFは骨芽細胞を介さずに破骨細胞

に作用する、(水)骨吸収が過度に促進される、という過程でPAFは骨粗鬆症を悪化させると考えられた(図9)。

破骨細胞は骨芽細胞から指令を受けて骨を壊すことだけに専念する受け身的な細胞なので、PAFというメディエーターを破骨細胞自身が産生するのは希少な例である。またPAF受容体についても、骨芽細胞には発現せず破骨細胞のみに発現している例は珍しく、カルシトニン(甲状腺から分泌されるホルモン)以外知られていなかった。PAFは破骨細胞において、現在知られている唯一のオートクライン・パラクラインに作用するメディエーターであると言えるであろう。

2-E. 結論

今回報告した、PAFが骨粗鬆症の増悪化因子として作用するという発見は、PAFとPAF受容体に注目した骨粗鬆症に対する新しい治療法の開発の糸口を明らかにしたものと考えている。

3. プロトンセンサーとして機能する新規 G タンパク質共役型受容体の同定

3-A. 研究目的

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) スーパーファミリーに属する 4 種のタンパク質、T cell death-associated gene 8 (TDAG8)、G2A、ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1)、G protein-coupled receptor 4 (GPR4)はお互いのアミノ酸配列の相同性が高く(30-40%)、GPCR を比較した進化系統樹上でサブファミリー(ここでは TDAG8 グループと呼ぶ)を形成している。当初、これらの分子はリガンドが不明のいわゆるオー

ファン GPCR として報告されたが、数年後にある種の脂質を特異的リガンドすることが相次いで提唱された。すなわち OGR1 と G2A は、それぞれスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) とリゾフォスファチジルコリン (LPC) に、GPR4 は SPC と LPC の両方に、TDAG8 はガラクトシルスフィンゴシン (サイコシン) に反応して活性化することが報告されたのである。上記した GPCR の進化系統樹において、TDAG8 ファミリーの近隣には PAF やリゾフォスファチジン酸 (LPA) などの脂質の受容体が存在してお

り、TDAG8 ファミリーが脂質をリガンドとすることは穏当な結果ではある。しかしながら、これらのリガンド同定の追試実験は別の研究グループからは未だ報告されておらず、現在でも議論の余地が残されている。

一方、最近になって脂質リガンドの研究とは別に OGR1 と GPR4 が細胞外の酸性 pH に反応して、それぞれイノシトールリン酸産生、cAMP 産生などの細胞内シグナル伝達を活性化するという、いわゆるプロトンセンサーとしての機能を持つことが報告された。従来のプロトンセンサーは神経細胞に発現して痛覚や味覚に関与すると考えられる幾つかのチャネル型の分子(バニロイドレセプター1 や酸感受性イオンチャネル)が知られていた。TDAG8 グループの mRNA は、免疫系細胞やある種のガン細胞といった神経細胞以外での発現が報告されているので、プロトンセンサーとして機能する GPCR が神経細胞以外に発現するという発見は、プロトンという極ありふれてはいるもののホメオスタシスによって生体内における濃度が厳密にコントロールされている分子の生理学的・病態生理学的意義を考える上で大切な契機を与えてくれたと言えよう。今回我々は、OGR1 や GPR4 と同じグループに属する TDAG8 についてプロトンに対する反応性を探るため、哺乳動物培養細胞(CHO-S 細胞)にこの受容体を発現させて解析を行った。

3-B. 研究方法

TDAG8 安定発現細胞株の樹立

TDAG8 遺伝子のオープンリーディングフレーム内にはイントロンが存在しない。そ

こでヒトゲノム DNA を鋳型とした入れ子 PCR により TDAG8 をコードする DNA をクローニングした。この際、N 末端に 9 アミノ酸より成る HA エピトープタグを付加した。このクローンを、強力な発現作用を有する CAG プロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現用プラスミドベクター(pCXN2.1)に挿入し、哺乳動物細胞(CHO-S 細胞)にトランスフェクトした。その後 G418 で薬剤選択をかけ、G418 耐性細胞群を得た。GPCR は7回膜貫通型構造で、その N 末端は細胞膜の外側に位置する。従って、HA エピトープタグが細胞膜表面に多く検出される細胞株は、受容体を高発現していると考えられる。この理論に基づき、この G418 耐性細胞株群について抗 HA 抗体で蛍光染色して蛍光強度の強い細胞を選択的にフローサイトメーターで分取することにより、ポリクローナルな TDAG8 の安定高発現細胞群を取得した。この措置により、モノクローナルな細胞とは違い、機能に偏りのない細胞集団を得ることができた。

バッファー

生理塩溶液(PSS)は 130 mM NaCl, 0.9 mM NaH₂PO₄, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 1.0 mM CaCl₂, 25 mM glucose, 0.1% BSA で調製した。断りのない限り PSS は、種々の pH(6.0-8.0)に調整した HEPES/EPPS/MES(濃度各 333 mM)を 40 倍に希釈してバッファーとした(HEM-PSS)。細胞を血清飢餓状態にした実験では、重炭酸塩で pH を調整した 0.1% BSA 含有 DMEM 培地で細胞を刺激した。溶液の実際の pH は、各実験条件下で pH メーターを用いて測定した。

cAMP 濃度の測定

細胞を 2 mM EDTA を含む PBS でディッシュからはがし、洗浄後に 0.5 mM IBMX を含む HEM-PSS (pH 7.2) に懸濁した。常温で 15 分間処理して遠心後、フォルスコリンの存在下または非存在下で細胞を常温で 30 分間刺激し、反応停止には終濃度 1% Tween 20 を用いた。4°C で一晩静置した後、上清に含まれる cAMP 濃度を PerkinElmer 社の AlphaScreen cAMP

Functional Assay Kit と Fusion で検出した。

受容体細胞内部移行アッセイ

細胞を 2 mM EDTA を含む PBS でディッシュからはがし、HEM-PSS (pH 7.7) に懸濁した。遠心後、細胞を種々の pH の HEM-PSS で 37°C、30 分間刺激し、パラホルムアルデヒドで固定した。細胞表面上の HA エピトープタグの発現レベルは、抗 HA 抗体とフィコエリスリン共役二次抗体で処理した後、フローサイトメーターで検出した。

ストレスファイバー観察

血清飢餓状態で 18 時間処理したグラスボトムディッシュに播いた細胞を、pH 6.4 または 8.1 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地で 37°C、15 分間刺激した。パラホルムアルデヒドで細胞を固定した後、0.1% Triton X-100 の存在下でローダミン-ファロイジン染色を行った。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。陽性コントロールとして、1 μ M LPA を含む pH 8.1 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地で刺激した細胞を用いた。

Rho 活性測定

血清飢餓状態で 18 時間処理した細胞を pH 6.4 または 8.1 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地で 37°C、3 分または 15 分間刺激した。洗浄後、氷冷した溶解液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤カクテル) で細胞を溶解した。細胞の細片を遠心で取り除いた上清を、グルタチオンセファロースビーズ上に固定化した GST-ロテキン融合タンパク質と 4°C で 60 分間混合した。ビーズを洗浄後、熱で抽出・変性したタンパク質をポリアクリルアミド電気泳動し、ウェスタンブロー

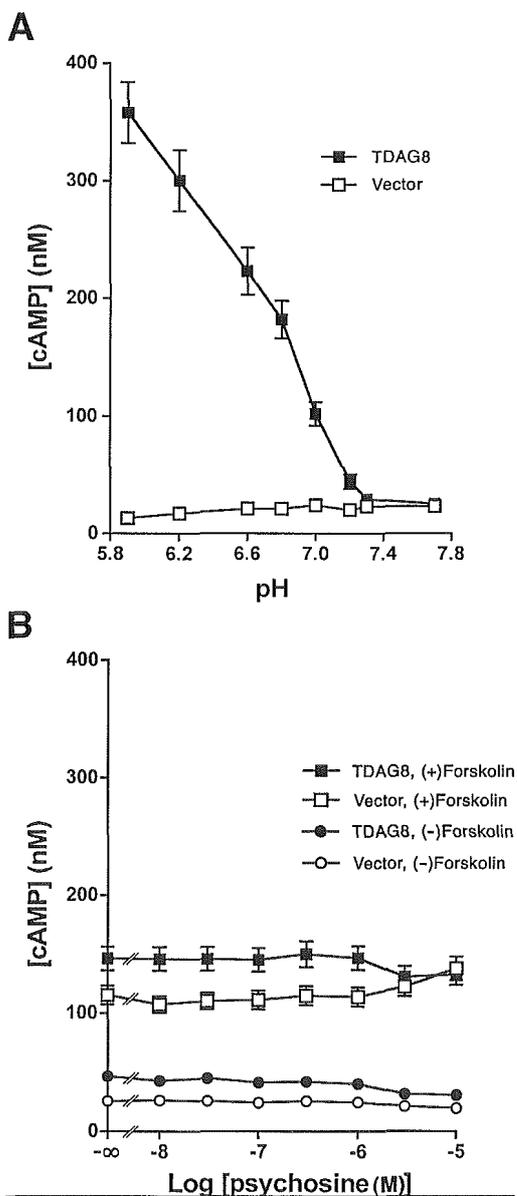


図 10 TDAG8 による pH 依存的な cAMP 産生。
(A) cAMP 産生の pH 依存性。n = 4。
(B) cAMP 産生へのサイコシンの無影響。n = 4。
pH 7.2 における結果を示す。なお pH 5.9
でも同様の結果が得られた。

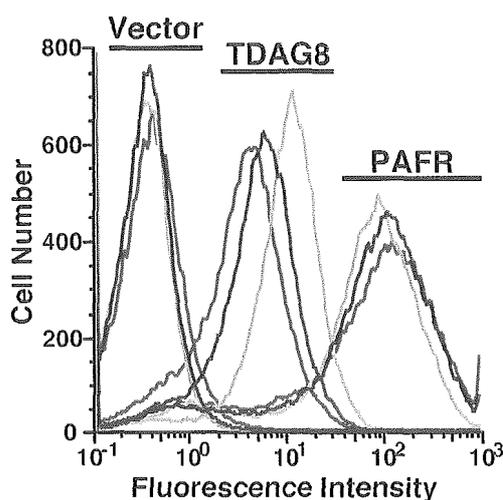


図 11 pH 依存的な TDAG8 の細胞内移行。TDAG8、PAF 受容体またはベクターをトランスフェクトした安定発現細胞を pH 5.7 (赤)、6.0 (青)、7.7 (緑) の HEM-PSS で 37°C、30 分間刺激した。固定後に細胞表面上に発現する HA エピトープタグのレベルをフローサイトメーターで測定した。

ッティングで GTP 型 RhoA に由来する RhoA を検出した。陽性コントロールとして、1 μ M LPA を含む pH 8.1 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地で刺激した細胞を用いた。

(倫理面への配慮)

すべて試験管内における研究であり、またヒトのサンプルは研究者本人のものであるので、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。

3-C. 研究結果

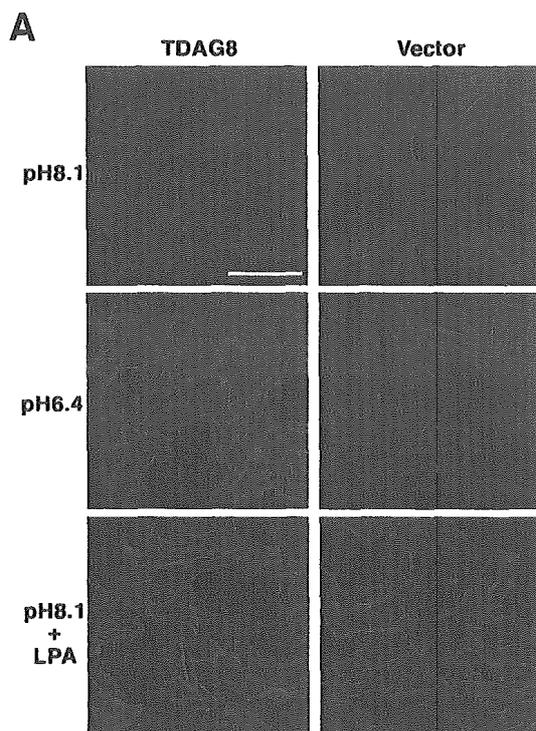
TDAG8 を安定発現する細胞では刺激するバッファーの pH が低くなるにつれて、cAMP 産生量の上昇が pH 7.2 以下で再現よく観察された(図 10A)。ベクターをトランスフェクションしただけの細胞(図 10A)または PAF 受容体を安定発現する細

胞(データ略)では、pH 依存的な cAMP 産生は起きなかった。また、pH 変化に伴うカルシウム反応については TDAG8 発現細胞で検出されなかった(データ略)。

サイコシンに対する TDAG8 の反応を cAMP レベルの変化で調べたが、フォルスコリン存在下でも非存在下でも変化は認められなかった(図 10B)。

多くの GPCR はリガンドで刺激されると細胞内へ移行する性質を持っている。そこで GPCR としての TDAG8 の性質を調べるために、酸性の HEM-PSS による TDAG8 の細胞内移行をフローサイトメーターで調べた(図 11)。pH 5.7 または 6.0 で 30 分間処理すると、pH 7.7 のときに比べ TDAG8 の細胞表面発現レベルがそれぞれ 58%、45%減少していた。一方、ベクターをトランスフェクトした細胞や PAF 受容体を発現する細胞に対しては、pH の低下による蛍光強度の変化はほとんどなかった。サイコシンによる TDAG8 の発現量への影響は認められなかった(データ略)。

pH 8.1 において TDAG8 を発現する細胞は、ベクターをトランスフェクトした細胞と同様、ほとんどアクチンストレスファイバーの形成は認められなかった。しかし、pH を 6.4 に変化させた 15 分後には TDAG8 発現細胞のみでストレスファイバーが形成されていた(図 12A)。LPA もまたストレスファイバー形成を内在性の受容体を介して引き起こしたが、その効果は酸に応答した TDAG8 ほどは強くなかった(図 12A)。



B

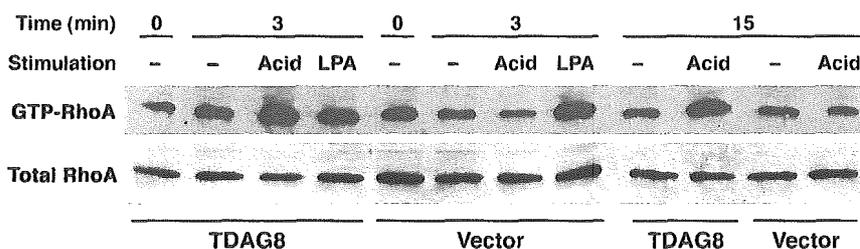


図 12 酸で刺激した TDAG8 によるアクチンストレスファイバー形成と Rho の活性化。(A) 共焦点蛍光顕微鏡観察によるアクチンフィラメントの再構成。血清飢餓状態においた細胞を pH 6.4 または 1 μ M LPA/pH 8.1 で 37°C、15 分間刺激した。その後、を固定しローダミン-ファロイジンで染色した。スケールバー：10 μ m。(B) TDAG8 により活性化した RhoA のプルダウンアッセイ法による検出。血清飢餓状態においた細胞を 37°C で pH 6.4 (*acid*) または 1 μ M LPA/pH 8.1 (*LPA*) によって表示の時間をだけ刺激した。その後、細胞溶解液を GST-ロテキンビーズと混合し、結合した活性化 RhoA をウェスタンブロットティングで検出した。

低分子量 G タンパク質である Rho は、ストレスファイバー形成を調節することが知られている。そこで、TDAG8 を発現する細胞における pH 依存的な Rho の活性化を、GST-ロテキン融合タンパク質を使ったプルダウンアッセイで調べた。pH 6.4 の DMEM 培地で刺激した 3 分後には、既に GTP 結合型 RhoA の増加が TDAG8 発現細胞で認められた (図 12B)。この RhoA の

活性化は刺激後 15 分でも依然としてある程度観察された。一方、ベクターをトランスフェクトした細胞では酸による RhoA の活性化は起きなかった。また、LPA 処理によってはどちらの細胞でも同等の RhoA の活性化が観察されたが、そのレベルはストレスファイバーの形成の時と同様に、酸に応答した TDAG8 ほど高くなかった (図 12B)。

3-D. 考察

本研究では TDAG8 がプロトンに反応して cAMP 産生を促すこと、また RhoA の活性化に起因すると思われるアクチンストレスファイバーの形成を引き起こすことを明らかにした。おそらく TDAG8 は $G\alpha_s$ と $G\alpha_{12/13}$ の両方に共役しているものと考えられる。

胸腺細胞や末梢 B 細胞など、ある種のリンパ細胞は細胞内 cAMP レベルの上昇に伴ってアポトーシスに陥ることが知られている。また、TDAG8 の mRNA は胸腺細胞において活性化誘導型細胞死の際に強く発現が上昇することが報告されている。したがって、TDAG8 は胸腺細胞の負の選択に対して pH 依存的に関与している

かもしれない。胸腺内には上皮細胞が網目状に存在し、胸腺の微小環境を構成している。区画化された胸腺細胞は自らで作る酸性代謝物に曝され易くなっている可能性があることから、生理的条件下で TDAG8 はアポトーシスを促進する役割を担っているのかもしれない。

TDAG8 の mRNA は胸腺だけでなく、他の多くのリンパ系細胞やある種のガン細胞にも高い発現が報告されている。したがって、TDAG8 にはアポトーシス状態の末梢組織において未知の生物学的役割を持つ可能性がある。実際、炎症部位や固形腫瘍内の細胞外 pH は 6.0 を下回るという報告がある。一方、Rho タンパク質の発ガンや転移への役割が最近明らかになりつつあることから、TDAG8 は細胞のトランスフォーメーションにも関与する可能性もある。TDAG8 を今後さらに解析することにより、ガンや炎症、免疫疾患に対する新しい治療の方向性が見えてくることを

期待したい。

TDAG8 がサイコシンに反応して cAMP レベルの低下やカルシウム反応を引き起こすことが以前に報告されていたことから、今回追試を行った。しかしながら、我々の実験系では両方のシグナル伝達反応とも観察できなかった。今回の実験に用いた細胞株や cAMP アッセイの条件、エピトープタグの有無などの点が以前に報告された論文と違っているため、これらのうちのどれかが見かけ上の矛盾の原因となっているのかもしれない。

3-E. 結論

新規に同定したプロトンセンサー TDAG8 は、pH 依存的に種々の細胞内シグナル伝達反応を活性化した。リンパ系細胞やガン細胞に発現が高いこの GPCR は、炎症や免疫疾患、発ガン、転移といった生命現象に pH を介して何らかの関与を果たす可能性がある。

研究協力者

長瀬 隆英 東京大学医学部呼吸器内科 教授

引地 尚子 東京大学医学部口腔外科 講師

木原泰行、進藤英雄 東京大学大学院医学系研究科 大学院生

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

英文原著

1. Lu, P., Chandrakanthan, V., Cahana, A., Ishii, S., and O'Neill, C. (2004)

Trophic signals acting via phosphatidylinositol-3 kinase are required for normal pre-implantation mouse embryo development. *J. Cell Sci.* 117, 1567-1576.

2. Ishii, S., Nagase, T., Shindou, H., Takizawa, H., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2004)

Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine asthma model. *J. Immunol.* 172, 7095-7102.

3. Hikiji, H., Ishii, S., Shindou, H., Takato, T., and Shimizu, T. (2004)

- Absence of platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy. *J. Clin. Invest.* 114, 85-93.
4. Angeli, V, Llodrá, J., Rong, J. X., Satoh, K, Ishii, S., Shimizu, T., Fisher, E. A., and Randolph, G. J. (2004) Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity* 21, 561-574.
 5. Branger, J., Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Pater, J. M., Speelman, P., Shimizu, T., Ishii, S., van der Poll, T. (2004) Platelet-activating factor receptor deficient mice show an unaltered clearance of *Haemophilus influenzae* from their respiratory tract. *Shock* 22, 543-547.
 6. Ishii, S., Kihara, Y., and Shimizu, T. (2005) Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 9083-9087.
 7. Lang, P. A., Kempe, D. S., Tanneur, V., Eisele, K., Klarl, B.A., Myssina, S., Jendrossek, V., Ishii, S., Shimizu, T., Waidmann, M., Hessler, G., Huber, S. M., Lang, F., and Wieder, T. (2005) Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet activating factor. *J. Cell Sci.* 118, 1233-1243.

和文総説

1. 石井 聡 (2004) 新しい脂質メディエーター受容体の探索と発見 *ファルマシア* 40, 623-627.
2. 石井 聡 (2004) 気管支喘息と脂質メディエーター *医学のあゆみ* 210, 871-877.

2)学会発表

1. ○Satoshi Ishii and Takao Shimizu, Physiological and pathophysiological roles of PAF receptor(招待口演) 2nd Int. Conference on Phospholipases A₂ & 8th Int. Congress on PAF and Related Lipid Mediators 2004年10月(ドイツ・ベルリン)
2. ○Satoshi Ishii and Takao Shimizu, Platelet-activating factor (PAF) receptor: studies in knockout mice (シンポジウム口演) 第77回日本生化学会大会 2004年10月(横浜)
3. ○石井 聡、木原泰行、清水 孝雄 TDAG8の新規Gタンパク質共役型受容体型プロトンセンサーとしての同定(ワークショップ口演) 第27回日本分子生物学会年会 2004年12月(神戸)

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 |

研究発表リスト

英文原著

1. Takai D, Nagase T, Shimizu T. New therapeutic key for cystic fibrosis: a role for lipoxins. **Nature Immunol** 2004; 5: 357-8. (News and Views) (論文解説)
2. 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** 2003; 284: L720-L726.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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)
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
 14. Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. **Prostaglandins Other Lipid Mediat** 2002; 68: 599-609.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. **J Biochem** 2002; 131: 773-779.
 21. Weijer S, Leemans JC, Florquin S, Shimizu T, Ishii S, Van der Poll T. Host response of platelet-activating factor receptor-deficient mice during pulmonary tuberculosis. **Immunology** 2003; 109: 552-556.
 22. Souza DG, Pinho V, Soares AC, Shimizu T, Ishii S, Teixeira MM. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. **Brit J Pharmacol** 2003; 139: 733-740.
 23. Talvani A, Santana G, Barcelos LS, Ishii S, Shimizu T, Romanha J, Silva JS, Soares MBP, Teixeira MM. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor-deficient mice. **Microb Infect** 2003; 5: 789-796.
 24. Tokuoka SM, Ishii S, Kawamura N, Satoh M, Shimada A, Sasaki S, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Shimizu T. Involvement of Platelet-Activating Factor and LIS1 in Neuronal Migration. **Eur J Neurosci** 2003; 18: 563-570.
 25. Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a Novel G Protein-Coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family. **J Biol Chem** 2003; 278: 25600-25606.
 26. Rijneveld AW, Weijer S, Florquin S, Speelman P, Shimizu T, Ishii S, Van der Poll T.

- Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. **J Infect Dis** 2004; 189: 711-716.
27. Ishii S, Nagase T, Shindou H, Takizawa H, Ouchi Y, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine asthma model. **J Immunol** 2004; 172: 7095-7102.

和文総説

1. 山本寛, 長瀬隆英. 老年病に合併する感染症の病像と治療のキーポイント. 化学療法の領域 18: 230-234, 2002.
2. 長瀬隆英. 脂質メディエーターと気道炎症. 分子呼吸器病 6: 37-39, 2002.
3. 長瀬隆英. 肺線維症における cPLA₂ の役割. 実験医学 20: 1901-1903, 2002.
4. 長瀬隆英. 脂質メディエーターと肺疾患. 呼吸 21: 875-879, 2002.
5. 長瀬隆英. CGRP ノックアウトマウスと気管支喘息. アレルギー科 16: 53-59, 2003.
6. 長瀬隆英. ロイコトリエン研究: 最近の進歩. アレルギー 53: 1184-1186, 2004.

New therapeutic key for cystic fibrosis: a role for lipoxins

Daiya Takai, Takahide Nagase & Takao Shimizu

One of the hallmarks of cystic fibrosis is the propensity of patients to develop lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*, which eventually compromises lung function. New data suggest loss of CFTR impairs lipoxin production, thus preventing resolution of lung inflammation and creating an environment susceptible to further infection.

[AUTHORS: PLEASE NOTE THAT SOME SECTIONS OF YOUR TEXT WERE REARRANGED AND REWORDED TO INCREASE CLARITY. AS A RESULT, THE REFERENCES HAD TO BE RENUMBERED; PLEASE CHECK THE REFS AND THE REF LIST CAREFULLY TO ENSURE THIS IS CORRECT. ALSO CAN ONE REF BE OMITTED? WE TRY TO LIMIT REFS TO 12. ALSO THE SECOND PART OF THE ORIGINAL TITLE WAS UNCLEAR; DO YOU HAVE ALTERNATIVE SUGGESTIONS?]

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder characterized by progressive lung disease and multiple organ dysfunction caused by abnormal electrolyte transport. CF patients show pancreatic insufficiency, increased sweat electrolyte concentrations and lung pathologies with recurrent bacterial infections. The CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) was identified as the causal gene¹. Soon after the identification of *CFTR*, the molecule encoded was found to be a cyclic AMP-activated chloride ion transporter² whose altered function after *CFTR* mutation [AUTHOR: CORRECT?] can account for the dysfunction of most organs affected in CF. However, this specific molecular defect [AUTHOR: OK? OR WHICH

DEFECT?] cannot explain the lung pathology, as CF patients maintain normal chloride ion concentrations in their lungs³. No medication can complement the functional loss of *CFTR* molecule. Several trials of gene therapy to transfer wild-type *CFTR* nucleotide sequences into the airway epithelium have faced many difficulties, resulting in insufficient *CFTR* expression to achieve clinical benefit⁴. In this issue of *Nature Immunology*, Karp *et al.*⁵ provide insight into another CF therapeutic approach from the viewpoint of the lipid mediators that regulate inflammatory responses.

CFTR maps to the long arm of chromosome 7, where it spans 250 kilobases (kb), and consists of 27 exons. The gene is transcribed into a 6.5-kb mRNA that encodes a 1,480-amino acid membrane protein. Although the clinical course of the disease varies with the type of mutation in *CFTR* (800 independent mutations have been identified so far), the estimated median survival age of patients of CF was still only 33.4 years in the US in 2001 (ref. 2). More than 70% of CF patients have alleles with deletion of the three base pairs encoding phenylalanine at position 508 ($\Delta F508$)² [AUTHORS: PLEASE CLARIFY THE FOLLOWING STATEMENT: ARE YOU DISCUSSING THE MUTATION ON THE OTHER ALLELE IN THESE PATIENTS?] and ones but 22 mutations include $\Delta F508$ are rare, with a frequency of less than 0.1 % of known alleles. In the $\Delta F508$ mutation, mutant *CFTR* protein is misfolded, leading to rapid ubiquitinylation and protein degradation. Thus, affected cells completely lack *CFTR* molecules. In some types of mutations (for example, R347P), mutant molecules can reach the cell membrane and show

partial chloride conductance. Hence, the clinical manifestations of CF are thought to be related to the type of mutation in *CFTR*.

That CF patients maintain normal chloride concentrations in their lungs indicates another mechanism must exist to explain how the functional loss of *CFTR* in affected cells results in the pathophysiology leading to progressive lung disease. CF patients are especially prone to chronic airway bacterial infection with pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and neutrophilic bronchitis and bronchiolitis.

To understand the new findings from Karp *et al.*⁵, a discussion of how the onset and resolution of inflammation is regulated by lipid mediators is required. A group of eicosonoid lipid mediators known as lipoxins are anti-inflammatory molecules similar to prostaglandin E2 that are synthesized during multicellular responses such as inflammation, atherosclerosis and thrombosis (reviewed in ref. 6). In the airway system, activated epithelial cells generate 15S-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) from arachidonic acid with 15-lipoxygenase and release 15S-HETE⁷. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) quickly take up 15S-HETE and convert it to 15S-epoxytetraene with 5-lipoxygenase. The 15S-epoxytetraene is then hydrated into 5S,6R,15S-trihydroxy-7,9,13-*trans*-11-*cis*-eicosatetraenoic acid (LXA₄) and its positional isomer 5S,14R,15S-trihydroxy-6,10,12-*trans*-8-*cis*-eicosatetraenoic acid (LXB₄). In addition to these native lipoxins, aspirin (acetylsalicylic acid) triggers the endogenous generation of 15-epimeric lipoxins (15-epi-LXA₄ and 15-epi-LXB₄) by the enzyme cyclooxygenase-2.

LXA₄ and LXB₄ have an inhibitory effect on

Daiya Takai and Takahide Nagase are in the Department of Respiratory Medicine and Takao Shimizu is in the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan. [AUTHOR: CORRECT?]
e-mail: tshimizu@m.u-tokyo.ac.jp [AUTHOR: CORRECT?]

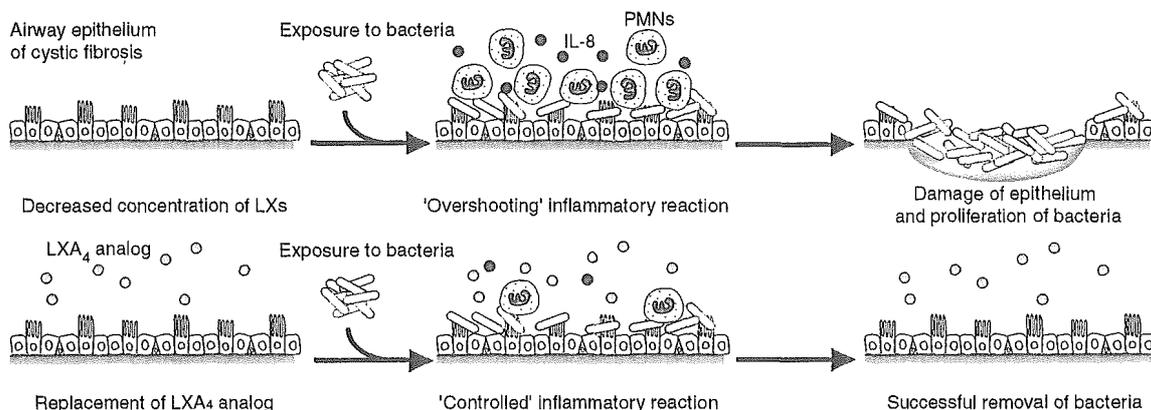


Figure 1 The pathophysiology of CF-affected airway systems and bacterial infection. Top: In the CF airway, because of decreased concentrations of lipoxins, bacterial infection results in an 'overshooting' of inflammation, with excessive numbers of PMNs and interleukin 8 (IL-8), tissue damage and failure to remove bacteria. Bottom: After supplementation with LXA₄ analog, bacterial infection causes 'controlled' inflammation with a moderate number of PMNs, and successful removal of the bacteria results.

PMNs and eosinophils and also activate monocytes and macrophages. Thus, these lipoxins are proposed to be involved in resolving inflammation. LXA₄ and LXB₄ avoid unwanted effects elicited by PMNs such as PMN-dependent vascular injury and further release of chemoattractants after the initial steps of inflammation. The 15-epi-lipoxins have also inhibitory effect on PMNs. The lipoxin receptor was identified as a seven-transmembrane receptor [AUTHOR: PLEASE SPECIFY BY NAME.] that belongs to the G_i-coupled chemoattractant receptor family.

Recently, another class of anti-inflammatory lipid mediators, resolvins, which are produced from ω -3 polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid, was identified⁸. Although the production of resolvins seem to be regulated through the availability of ω -3 polyunsaturated fatty acids, thus using a different mechanism than the tightly regulated production of lipoxins, competition with 'pro-anti-inflammatory' mediators among chemicals sharing structural similarity indicates that inflammatory reaction is highly regulated and balanced by interactions among cells participating in the inflammation process at each stage. A similar well-known example of such balancing interaction occurs between prostacyclin and thromboxane: both are produced from the same precursor but have diametrically opposite functions in platelet activation, vasoconstriction and possibly in immunological reactions^{9,10}.

The enzyme phospholipase A₂ (PLA₂) is essential in the production of proinflammatory mediators, which also include various eicosanoids. Although many distinct types of

PLA₂ have been reported, cytosolic PLA₂ is thought to be particularly important. Cytosolic PLA₂ preferentially hydrolyzes phospholipids containing arachidonic acid and is activated by submicromolar concentration of calcium and by phosphorylation of serine residues. Lung inflammatory diseases, including acute lung injury and pulmonary fibrosis, are attenuated in mice with disruptions in the gene encoding cytosolic PLA₂ (refs. 11,12). Given that lipoxins belong to the 'downstream' mediators of cytosolic PLA₂, these observations may indicate the complexity of the regulation of lipid mediators in the lung. Is the chronic airway infection and inflammation of CF due to disruption of this regulation?

Karp *et al.*⁵ found decreased concentrations of LXA₄ in airway fluids of CF patients. In a mouse airway infection model, supplementation with LXA₄ analogs attenuates PMN accumulation in airway and improves resolution of *P. aeruginosa* infections⁵, although those [AUTHOR: WHICH IS "those"?] authors used C57BL/6 mice, not *Cftr*^{-/-} mice, which are susceptible to *P. aeruginosa*-induced inflammation. These results together demonstrate a previously unknown pathophysiology in the airway system in CF: because of decreased concentrations of lipoxins, bacterial infection results in 'overshooting' of inflammation, tissue damage and failure to remove bacteria (Fig. 1, top). However, after supplementation with LXA₄ analogs, bacterial infection causes inflammation but is well controlled and bacteria are successfully removed [AUTHOR: CORRECT?] (Fig. 1, bottom). Karp *et al.* also demonstrated increased lymphocyte recruitment by LXA₄ analogs⁵. This result is consistent with the

hypothesis that lipoxins and resolvins make regional inflammation mature from the 'acute' phase to the 'chronic' phase⁸. Ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug like aspirin, has been used clinically for the management of CF. There was a substantial reduction in the rate of decrease in lung function in children with CF who were treated with high-dose ibuprofen¹³, although this drug does not produce 15-epi-LXA₄.

Although lipoxins' antagonistic effects on cysteinyl leukotriene receptors have been clearly demonstrated, a complete view of the anti-inflammatory mechanisms of lipoxins and resolvins has not been achieved. Do they regulate small GTPase proteins, protein kinase A or transcription factor NF- κ B in inflammatory cells? Karp *et al.*⁵ did not demonstrate such an 'exorbitant' connection of an ion channel to a lipid mediator in this study. However, electrolyte and/or pH imbalance might affect the production, export and uptake of lipid mediators. The catalytic activities of various enzymes (such as leukotriene A₄ hydrolase-aminopeptidase, a zinc-containing chloride-sensitive enzyme) might be affected by local electrolyte concentrations. Alternatively, mutant CFTR molecules might directly regulate the expression of 5-lipoxygenase and/or 15-lipoxygenase, which are essential for production of lipoxins. Nevertheless, the present observations and the authors' interpretation of CF-associated lung disease as a deficiency of maturation of regional inflammation might produce new possibilities for therapeutic intervention in this intractable disease. Furthermore, in a more fundamental and broader sense, this study provides a hint for the elucidation of

the molecular 'switch' governing how acute inflammation matures and finally resolves. Clearly, these findings bear clinical relevance for the modulation of lipid mediators in CF-affected airways and for our understanding of the relationship between CFTR deficiency and selective inhibition of anti-inflammatory lipid mediators.

1. Riordan, J.R. *et al. Science* **245**, 1066–1073 (1989).
2. Gibson, R.L., Burns, J.L. & Ramsey, B.W. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 918–951 (2003).
3. Verkman, A.S., Song, Y. & Thiagarajah, J.R. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C2–15 (2003).
4. Griesenbach, U., Ferrari, S., Geddes, D.M. & Alton, E.W. *Gene Ther.* **9**, 1344–1350 (2002).
5. Karp, C.L. *Nat. Immunol.* **5**, '–' (2004). **[ED: PLEASE PROVIDE PAGE NUMBERS (KARP)]**
6. Serhan, C.N. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**, 433–455 (2002).
7. Nagase, T. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 485–489 (1990).
8. Serhan, C.N. *et al. J. Exp. Med.* **196**, 1025–1037 (2002).
9. Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A. & Serhan, C.N. *Science* **237**, 1171–1176 (1987).
10. Shimizu, T. & Wolfe, L.S. *J. Neurochem.* **55**, 1–15 (1990).
11. Nagase, T. *et al. Nat. Immunol.* **1**, 42–46 (2000).
12. Nagase, T. *et al. Nat. Med.* **8**, 480–484 (2002).
13. Konstan, M.W., Byard, P.J., Hoppel, C.L. & Davis, P.B. *N. Engl. J. Med.* **332**, 848–854 (1995).

A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice

Takahide Nagase,¹ Naonori Uozumi,² Tomoko Aoki-Nagase,¹
Kan Terawaki,^{2,3} Satoshi Ishii,² Tetsuji Tomita,¹ Hiroshi Yamamoto,¹
Kohei Hashizume,³ Yasuyoshi Ouchi,¹ and Takao Shimizu^{2,4}

Departments of ¹Geriatric Medicine, ²Biochemistry and Molecular Biology, and ³Pediatric Surgery, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, and ⁴Core Research

for Evolutional Science and Technology of Japan Science and Technology Corporation, Tokyo 113, Japan

Submitted 18 November 2002; accepted in final form 25 December 2002

Nagase, Takahide, Naonori Uozumi, Tomoko Aoki-Nagase, Kan Terawaki, Satoshi Ishii, Tetsuji Tomita, Hiroshi Yamamoto, Kohei Hashizume, Yasuyoshi Ouchi, and Takao Shimizu. A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L720–L726, 2003. First published December 27, 2002; 10.1152/ajplung.00396.2002.—Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is an acute lung injury of high mortality rate, and sepsis syndrome is one of the most frequent causes of ARDS. Metabolites of arachidonic acid, including thromboxanes and leukotrienes, are proinflammatory mediators and potentially involved in the development of ARDS. A key enzyme for the production of these inflammatory mediators is cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). Recently, it has been reported that arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) is a potent inhibitor of cPLA₂. In the present study, we hypothesized that pharmacological intervention of cPLA₂ could affect acute lung injury. To test this hypothesis, we examined the effects of ATK in a murine model of acute lung injury induced by septic syndrome. The treatment with ATK significantly attenuated lung injury, polymorphonuclear neutrophil sequestration, and deterioration of gas exchange caused by lipopolysaccharide and zymosan administration. The current observations suggest that pharmacological intervention of cPLA₂ could be a novel therapeutic approach to acute lung injury caused by sepsis syndrome.

acute respiratory distress syndrome; lipopolysaccharide; sepsis; eicosanoid; leukotriene

ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (ARDS) is characterized by acute lung injury, and severe sepsis is one of the most important causes of ARDS (9, 10, 31). Although patients with ARDS are intensively treated with currently available drugs, the mortality rate for ARDS remains high, and it ranges from 40 to 70%. Potential mechanisms that cause ARDS include damage to the alveolar-capillary membrane and polymorphonuclear neutrophil (PMN) adhesion, activation, and sequestration, leading to respiratory failure (9, 10, 31).

Platelet-activating factor (PAF) and metabolites of arachidonic acid are potentially involved in the devel-

opment of ARDS (23, 30, 32). PAF is a proinflammatory mediator produced from phospholipids (12–14). Thromboxanes (TXs) and leukotrienes (LTs) are potent mediators generated from arachidonic acid by cyclooxygenase and 5-lipoxygenase (7), respectively. TXA₂ may increase lung permeability, whereas LTB₄ is a potent neutrophil chemoattractant. Phospholipase A₂ (PLA₂) is a key enzyme for the production of proinflammatory mediators, including eicosanoids and PAF. Although a number of distinct types of PLA₂ have been reported to be characterized, cytosolic PLA₂ (cPLA₂) is thought to be particularly important (29, 30, 34, 36, 37). The cPLA₂ preferentially hydrolyzes phospholipids containing arachidonic acid and is activated by submicromolar concentration of Ca²⁺ and by phosphorylation of a serine residue (5, 16, 18, 33). Recently, it has been reported that an analog of arachidonic acid in which the –COOH functionality is replaced by –COCF₃, named arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK), is a potent and selective slow-binding inhibitor of cPLA₂ (33, 35).

In the present study, we hypothesized that pharmacological intervention of cPLA₂ could affect acute lung injury. To test this hypothesis, we chose to use ATK as an inhibitor of cPLA₂ and examined the effects of ATK in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS) and zymosan administration.

METHODS

Animal preparation. We used male C57BL/6 mice (7–8 wk old). Animals were anesthetized with pentobarbital sodium (25 mg/kg ip) and ketamine hydrochloride (25 mg/kg ip) in combination and then paralyzed with pancuronium bromide (0.3 mg/kg ip). Anesthesia and paralysis were maintained by supplemental administration of 10% of the initial dose every hour. After tracheostomy, a metal endotracheal tube (inside diameter 1 mm, length 8 mm) was inserted in the trachea. Animals were mechanically ventilated (model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA) with tidal volumes of 10 ml/kg and frequencies of 2.5 Hz. We opened the thorax widely by means of midline sternotomy and applied a positive end

Address for reprint requests and other correspondence: T. Nagase, Dept. of Geriatric Medicine, Faculty of Medicine, Univ. of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, 113-8655 (E-mail: takahide-tky@umin.ac.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

expiratory pressure of 2 cmH₂O by placing the expired line underwater. During the experiments, oxygen gas was continuously supplied to the ventilatory system (F_IO₂ = 1.0). A heating pad was used to maintain the body temperature of animals. To assess the development of lung injury physiologically, we measured lung elastance (E_L) and resistance (R_L) as previously described (1, 21–27). Briefly, we measured the tracheal pressure (Ptr), flow, and volume (V). We calculated E_L and R_L by adjusting the equation of motion: $Ptr = E_L \cdot V + R_L(dV/dt) + K$, where K is a constant. Changes in E_L and R_L reflect lung parenchymal alterations and stiffening of the lungs.

Experimental acute lung injury induced by LPS/zymosan administration. One minute before intravenous administration, two deep inhalations (three times tidal volume) were delivered to standardize volume history and measurements were made as baseline. In the physiological study, mice were divided into four experimental groups, i.e., saline-treated (n = 6), ATK/saline-treated (n = 4), LPS/zymosan-treated (n = 7), and ATK/LPS/zymosan-treated groups (n = 5). In the LPS/zymosan-treated group, mice received 3 mg/kg LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) intravenously. Two hours later, 10 mg/kg of zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) were intravenously administered (19, 30). In the saline-treated group, animals received saline instead of LPS and zymosan in the same manner and served as controls. In the ATK-treated group, 20 mg/kg ATK (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) were administered intraperitoneally 30 min before saline or LPS administration. The current dose of ATK and timing of ATK administration were applied on the basis of previous reports (11, 20) and our preliminary experiments. In all groups, measurements were made at 30-min intervals for 4 h.

Assessment of respiratory failure. At the end of experiment, blood samples for gas analysis were obtained from the left ventricle. We then measured PaO₂, PaCO₂, and pH to assess the extent of respiratory failure (blood gas analyzer; AVL Medical Systems, Schaffhausen, Switzerland).

Bronchoalveolar lavage fluid. At the end of the experiment, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed (1 ml of phosphate-buffered saline five times) in saline-treated (n = 6), LPS/zymosan-treated (n = 7), and ATK/LPS/zymosan-treated groups (n = 5). In each animal, 90% (4.5 ml) of the total injected volume was consistently recovered. After BAL fluid (BALF) was centrifuged at 450 g for 10 min, total and

differential cell counts of the BALF were determined from the cell fraction (29, 30). The supernatant was stored at -70°C until measurement of protein was performed. The concentration of protein was measured by Lowry's method with bovine serum albumin as a standard.

TX and LT assay. TXA₂ (measured as TXB₂), LTB₄, and LTC₄/D₄/E₄ in the BALF were determined by enzyme immunoassay (EIA) kits (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The detection limits of the EIA assays for TXB₂, LTB₄, and LTC₄/D₄/E₄ were 3.6, 6, and 10 pg/ml, respectively.

Myeloperoxidase activity assay. At the end of experiments, the left lungs were removed from mice of each group (n = 4, respectively). Myeloperoxidase (MPO) activity was measured as previously reported (3, 15). Briefly, the frozen lungs were weighed and homogenized in hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (0.5% HTAB in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0). The homogenates were sonicated and centrifuged at 40,000 g for 15 min. The supernatant was mixed with assay buffer containing potassium phosphate buffer, H₂O₂, and o-dianisidine hydrochloride. Then, the supernatant was placed in a spectrophotometer for reading at 460 nm as previously described (3, 15).

Histological study. At the end of experiments, the right lungs of the mice were removed and fixed with 10% formalin. After fixation, the tissue blocks obtained from midsagittal slices of the lungs were embedded in paraffin. Blocks were cut 4 μm thick with a microtome, and then hematoxylin-eosin staining was performed.

Data analysis. Comparisons of data among each experimental group were carried out with analysis of variance. If statistical significances were detected, a Scheffé test was then applied as a post hoc test. Data are expressed as means ± SE. P values <0.05 were taken as significant.

RESULTS

Physiological data following LPS/zymosan or saline administration. There were no significant differences in baseline E_L and R_L among each group. Fig. 1 and Table 1 demonstrate the physiological data after LPS/zymosan or saline administration. As shown, E_L and R_L in LPS/zymosan-treated group were significantly increased compared with saline-treated group, which

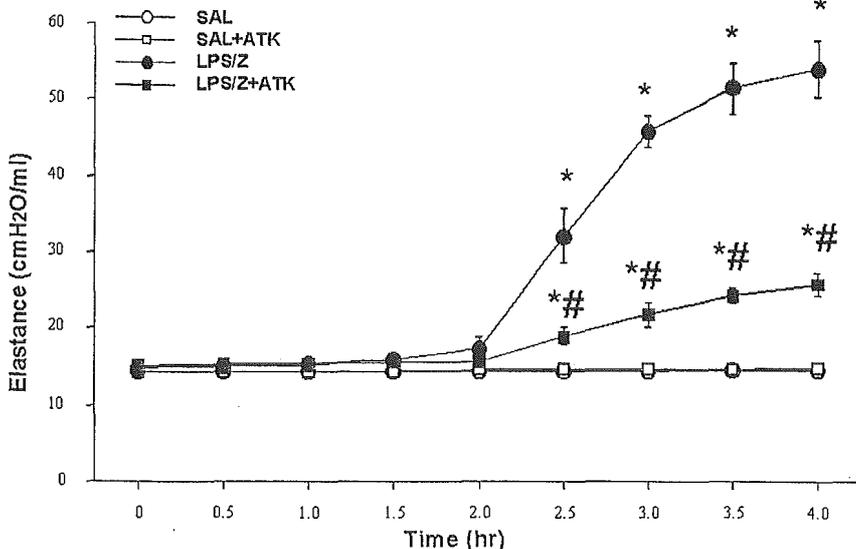


Fig. 1. The time course of response in lung elastance in saline-treated (SAL, n = 6), arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK)/saline-treated (SAL+ATK, n = 4), LPS/zymosan-treated (LPS/Z, n = 7), and ATK/LPS/zymosan-treated groups (LPS/Z+ATK, n = 5). In LPS/zymosan-treated groups, zymosan was administered 2 h after LPS treatment, whereas saline was treated in the same fashion in the saline-treated groups. *P < 0.001 vs. saline-treated group; #P < 0.001 vs. LPS/zymosan-treated group.