

図 22. I κ B α 陽性線維の caspase-3 活性
生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、
I κ B α の蓄積した筋線維のいくつかにおいて、アポ
トーシスに関わる caspase-3 の活性型の存在が示
された。

D. 考察

我々は、defensin ファミリーがゲノム上で遺伝子ク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 遺伝子を複数見出した。

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なぜ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った。

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。

次に、我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、興味深い表現型を見出した。すなわち、TgCAGmBD6-1 マウスは、成長障害と筋力低下を示し、骨格筋には、筋線維の壊死と再生の所見が認められた。個体レベルで、defensin と疾患との関連を明確に指摘した初めての知見である。

生後 20 日頃までの TgCAGmBD6-1 マウスでは、明らかな体重減少もなく、筋組織上も核の偏在する正常の筋線維が主体であることから、骨格筋の発生過程に異常はないと考えられる。しかし、生後一ヶ月ころより、成長障害が明らかとなり、進行性に筋力も低下し、生後 6 ヶ月ころには、一見して亀背が認められるようになった。

さらに、血清中のクレアチンキナーゼ活性の上昇を認め、筋破壊による酵素の逸脱を示す所見が得られた。

一方、TgCAGmBD6-2 マウスでは、上記のような体重減少、筋力低下、筋線維の壊死、再生の所見はえられなかったが、NCAM の筋線維内での分布に異常が認められた。TgCAGmBD6-2 マウスの一見正常と思われた筋組織において、TgCAGmBD6-1 マウスと共通の特異的な異常が見出されたことは、病態を検討する上でも非常に興味深い。また、TgCAGmBD6-1 マウスの筋病変が、染色体への挿入変異による偶発的異常ではないことを強く支持している。TgCAGmBD6-2 マウスでは、ゲノム上のトランスジーンのコピー数も少なく、蛋白レベルでの発現量も少ないことが示されており、そのために顕著な異常をきたさなかったものと察せられる。

我々は、これらの病理変化の機序について分子レベルで検討するために、NF- κ B 系について免疫組織学的に評価した。興味深いことに、TgCAGmBD6-1 マウスにおいても TgCAGmBD6-2 マウスにおいても、IkB α の異常に蓄積した筋線維が多数認められた。IkB α の分解に関わるカルパイン 3 の変異や欠損によって、ヒトやマウスで筋ジストロフィーをきたすことが知られており、*in vitro* においても、IkB α の過剰発現が筋原細胞のアポトーシスをもたらすことが知られている。我々も、免疫組織学的に活性型カスパーゼ 3 の存在を示すことができ、TgCAGmBD6 マウスにおいても同様の機序の働いていることを支持している。

これまでの動物モデルの研究は、defensin の抗微生物作用による感染防御上の重要性を示すものであった。しかし、多くの抗菌物質は、抗菌作用と同時に哺乳類細胞への毒性をもつ。さらに、*in vitro* の実験において、defensin は、免疫系のエフェクター因子としての機能だけでなく、炎症反応の制御にも関わっており、defensin 自身も複雑な発現の制御を受けていることが明らかになりつつある。したがって、defensin の過剰発現は、感染防御に有利になる一方で、様々な炎症性疾患を惹起するものと思われる。

我々の研究は、呼吸器疾患との関わりにおいて、二つの方向での発展性を示唆している。一般に pCAGGS ベクターでは、骨格筋において外来遺伝子が最も強く発現することが多く、TgCAGmBD6-1 マウスも骨格筋に最も顕著な病変をきたした。しかし、このような過剰発現による有害事

象は、肺を含めた他の組織においても起こりうると思われる。すなわち、炎症反応の一因子である defensin が、いわゆる炎症性肺疾患と関わりうることも示唆される。実際、ヒトにおいて hBD-1 の遺伝子多型と肺気腫、気管支喘息の関連を示す報告がある。

また、呼吸器疾患と骨格筋との関わりは深い。慢性呼吸不全や肺悪性腫瘍の末期には、体重は減少し、筋力は低下する。この、いわゆるカヘキシアでは、骨格筋の蛋白合成の低下と蛋白の異化亢進により筋量が減少する。その筋萎縮にはアポトーシスが深く関わり、tumor necrosis factor- α のようなサイトカインが直接、あるいは間接的に筋のアポトーシスを誘導するといわれている。TgCAGmBD6-1 マウスでみられた筋萎縮は、炎症反応の一因子である β -defensin とカヘキシアの間の関連を示唆しているのかもしれない。

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-6 を過剰発現するマウスにおいて、筋ジストロフィー症に類似した筋線維の壊死、再生の所見が得られた。抗菌ペプチドの過剰発現は、感染防御に有利になる一方で、様々な炎症性疾患の原因になりうることを示唆する所見である。その機序には、NF- κ B 系の異常が関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表論文発表

- 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

Gタンパク質共役型受容体を介した生体制御機構の解析

分担研究者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座 講師

研究要旨

血小板活性化因子(Platelet-activating Factor; PAF)は血小板凝集や白血球の活性化をはじめとする多彩な生理活性を示す脂質メディエーターである。PAFは、細胞膜上のGタンパク質共役型受容体に作用することで生理活性を示す。本研究室で作製したPAF受容体欠損(PAFR-KO)マウスの解析から、我々はPAFが急性呼吸窮迫症候群(ARDS)やアナフィラキシー、虚血再灌流障害をはじめとする様々な疾患に関与することを示してきた。本年度はPAFが関与する疾患をさらに解明することを目的として、PAFR-KOマウスを用いて気管支喘息モデルと骨粗鬆症モデルを解析したので、本稿ではその結果を報告する。

さらにPAF受容体と相同性が高いGタンパク質共役型受容体(TDAG8)がプロトンに反応して細胞内シグナル伝達を惹起する「pHセンサー」であることを発見したので、併せてここに報告する。

1. 気管支喘息の増悪因子としての PAF

1-A. 研究目的

PAFが気道過敏性、気道収縮、気道からの粘液の分泌など、多くの気管支喘息の症状と似た病態をヒトや動物に惹起できることは以前から知られていた。また喘息患者では健常人とは異なり、肺胞洗浄液中にPAFが含まれる。喘息患者の気道には活性化した好酸球や肥満細胞が存在しており、*in vitro*の実験から推察するとこれらの細胞がPAFを産生していることが考えられる。しかもPAFは好酸球の強力な化学走性因子であり、脱顆粒も引き起こすことから好酸球浸潤を伴う炎症を増悪化するポテンシャルを持つ。以上のことから、長い間PAFは喘息の病態に関係す

ると考えられてきた。

PAFR-KOマウスを使って、我々はPAFが肺のアナフィラキシー反応に深く関与することを示してきた。このことはPAFが肺でのアレルギーの初期相に働くメディエーターであることを示唆している。しかしながら喘息に伴うアレルギー誘導型の気道過敏性や慢性炎症、すなわち肺でのアレルギーの遅延相に関するPAFの重要性についてはPAFR-KOマウスを使った検討は未だされていない。そこでマウスの喘息モデルを用いて検討することとした。

1-B. 研究方法

喘息モデルの作製

8-15 週齢の BALB/c に戻し交配したマウスに、卵白アルブミン (OVA) への感作 (0 日目と 14 日目に $50 \mu\text{g}$ を腹腔投与) と経気道的な反復曝露 (10 mg/ml の生理食塩水溶液を 23 日目から 8 日間、2 日おきに 1 時間の間隔を挟んで $30 \text{ 分} \times 3 \text{ 回}$) を施し、好酸球浸潤性の気道炎症を伴う喘息様症状を惹起した。

血清と肺胞洗浄液の調製

麻酔下のマウスの大腿動静脈を切断して採血した。室温で 1 時間凝固させた後に遠心し、回収した血清を -80°C で保存した。脱血死したマウスの気管を切開してカニューレを挿入した。開胸後に $1 \text{ ml} \times 2 \text{ 回}$ の PBS で肺胞洗浄を行った。回収した洗浄液を遠心後、上清は -80°C で保存した。沈殿した細胞は 0.1% BSA を含む冷生理食塩水に懸濁し、チュルク液で染色後に血球計数盤で濃度を求め、回収した細胞数を算出した。うち、一部の細胞をサイトスピンにかけ、ディフクイック染色の後に顕微鏡観察を行い、細胞の形態をもとに好酸球、リンパ球、マクロファージ/単球、好中球の割合を算出した。

肺ホモゲネートの調製

全肺を 1 g 当たり 8 ml の PBS 中でホモゲナイズし、 $18,000 \times g$ 遠心後の上清を回収した。

ELISA アッセイ

血清中の総 IgE と OVA 特異的 IgE、IgG1 のタイターは、適度に希釈後に ELISA 法で測定した。肺胞洗浄液中の IL-4、IL-5、IL-13、そしてシステイニルロイコトリエン (ロイコトリエン $C_4/D_4/E_4$ の総称) の濃度もまた ELISA 法で測定した。肺ホモゲネートに含まれる IL-5 と IL-13 の濃度も肺胞洗浄液と同様に ELISA 法で測定した。

肺の組織学的解析

組織学的解析用の肺は肺胞洗浄をせずに取り出し、空気で膨らませた状態で 10% ホルマリン含有 PBS 中に浸けて固定した。パラフィン包埋後、左右の肺葉について $3 \mu\text{m}$ 厚の切片を上部、中部、下部の計 3 枚ずつ調製し、HE 染色または PAS 染色を施した。

炎症細胞が肺へ浸潤したレベルは HE 染色した左右の肺葉の切片について、ブラインドで 0 点から 5 点の半定量的なスコア化を行い、両者の和をその個体の点数とした。

杯細胞の過形成のレベルは、PAS 染色した切片で観察された気道 ($16-29$ 個/匹) について、やはりブラインドで 0 点から 4 点の半定量的なスコア化を行い、気道一つ当たりの平均値をその個体の点数とした。

気道過敏性測定

麻酔したマウスに気道切開、カニューレ挿入、開胸を施し、 100% 酸素で 2.5 Hz の人工換気を行った。生理食塩水またはメタコリンの生理食塩水溶液 ($0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 \text{ mg/ml}$) をネブライザーでエアロゾル化し、マウスに 2 分間ずつ吸引させた。一回換気量は 8 ml/kg 、呼気終末陽圧は $3 \text{ cmH}_2\text{O}$ の条件下で、各エアロゾルを吸引後 1 分で気道内圧と流量を測定し、肺抵抗を算出した。気道の反応性は生理食塩水エアロゾル吸引後の肺抵抗を 2 倍にするのに必要なエアロゾルに含まれるメタコリン濃度 (EC_{200}) で表し、この値は実験データを内挿することによって求めた。

表1 肺胞洗浄液中の細胞数と分画

| 処理 | n | 総細胞数 (× 10 ⁵) | 細胞分画 (%) | | | |
|-------------|---|---------------------------|------------|------------|------------|-----------|
| | | | 好酸球 | リンパ球 | マクロファージ/単球 | 好中球 |
| 野生型 SAL | 4 | 1.6 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 2.7 ± 1.5 | 97.2 ± 1.5 | 0.1 ± 0.0 |
| PAFR-KO SAL | 4 | 2.0 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 2.6 ± 1.2 | 97.0 ± 1.4 | 0.3 ± 0.2 |
| 野生型 OVA | 7 | 40.9 ± 6.3 | 69.1 ± 3.0 | 17.7 ± 2.3 | 12.2 ± 1.9 | 1.0 ± 0.2 |
| PAFR-KO OVA | 7 | 47.3 ± 4.1 | 63.5 ± 1.4 | 21.0 ± 2.0 | 13.7 ± 1.3 | 1.7 ± 0.5 |

データは平均 ± 標準誤差を表す。SAL : 生理食塩水処理群 ; OVA : 抗原感作/曝露群。

ムスカリン受容体結合実験

4 匹分 (雌雄 2 匹ずつ) の肺をホモゲナイズし、800 × g の遠心上清を 123,000 × g でさらに超遠心分離した。得られた沈殿を懸濁し、140,000 × g でもう一度超遠心を行った。この沈殿を懸濁し、100 μg 分のタンパク質に相当する量を種々の濃度 (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 nM) の [*N*-メチル-³H]スコポラミン (ムスカリン受容体非特異的アンタゴニスト) と、25°C で 90 分間結合させた。GF/C グラスフィルターでこの反応液をろ過した後、フィルターに吸着した放射能を測定して総結合量とした。非特異的結合は 20 μM のメタコリンの存在下で同様の実験を行って測定して求めた。総結合量から非特異的結合量を差し引いて特異的結合量を算出した。

1-C. 研究結果

抗原 (OVA) 特異的 IgE 及び IgG1 は抗原に感作/曝露したマウスの血清にのみ検出された。また抗原感作/曝露マウスでは、総 IgE 濃度は生理食塩水処理のマウスに比べ約 6 倍上昇していた。しかし野生型マウスと PAFR-KO マウスの間では有意な差は認められなかった (データ略)。

(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。

表2 肺における Th2 サイトカインとシステイニルロイコトリエンのレベル

| 処理 | 肺胞洗浄液 (pg/ml) | | | | n | 肺ホモゲネート (pg/g 肺) | | |
|-------------|---------------|-------------|--------------|---------------|----|------------------|-------------|----|
| | IL-4 | IL-5 | IL-13 | システイニルロイコトリエン | | IL-5 | IL-13 | n |
| 野生型 SAL | 12.0 ± 3.8 | 5.0 ± 0.0 | 1.5 ± 0.0 | 15 ± 0 | 4 | N.D. | N.D. | - |
| PAFR-KO SAL | 9.1 ± 0.9 | 5.0 ± 0.0 | 2.2 ± 0.5 | 15 ± 0 | 4 | N.D. | N.D. | - |
| 野生型 OVA | 66.4 ± 15.4 | 53.8 ± 19.9 | 248.0 ± 45.2 | 239 ± 45 | 10 | 393 ± 32 | 2,152 ± 203 | 13 |
| PAFR-KO OVA | 32.7 ± 5.7 | 20.7 ± 6.0 | 156.4 ± 30.2 | 192 ± 26 | 10 | 388 ± 27 | 1,747 ± 101 | 14 |

データは平均 ± 標準誤差を表す。SAL : 生理食塩水処理群 ; OVA : 抗原感作/曝露群 ; N.D. : 未検査。

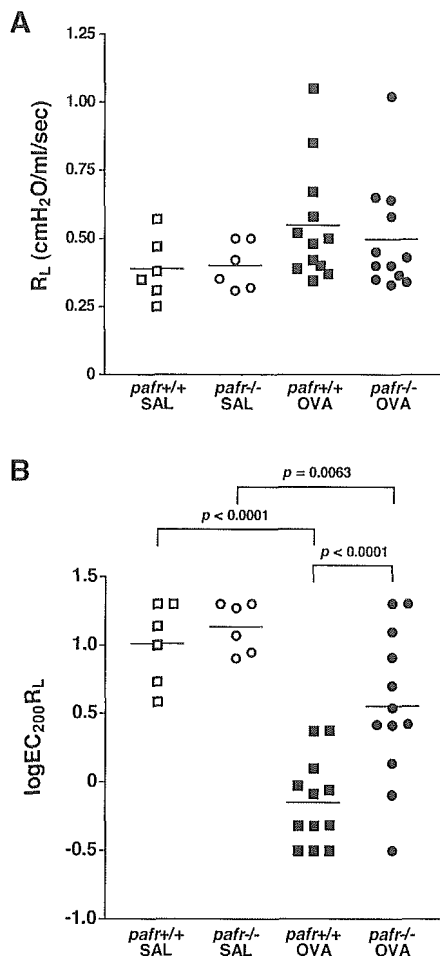


図 2 PAF 受容体依存的気道過敏性の惹起。(A) 気道抵抗のベースライン。生理食塩水のエアロゾルを吸引させた後に測定した各個体の気道抵抗値 (R_L) を示す。水平線は各群の平均値を示す。(B) メサコリンに対する気道反応性。各個体について、A に示したベースライン気道抵抗値を 2 倍に上昇するのに必要なメサコリンの濃度 ($EC_{200}R_L$) を対数で表す。水平線は各群の平均値を示す。

性は約 4 倍の上昇にとどまり、野生型マウスに比べ有意に抑制されていた。

上述の PAFR-KO マウスにおける気道過敏性の抑制のメカニズムを調べる試みとして、ムスカリン受容体に対するリガンド結合実験を行った。種々の濃度の放射能ラベルしたムスカリン受容体アンタゴニスト(スコポラミン)を、抗原に感作/曝露したマウスから調製した細胞膜画分と結合させた。その結果、野生型マウスと PAFR-KO マウスはともに同等の最大結

合量 [B_{max} (fmol/mg タンパク質): 42.7 ± 2.7 と 44.8 ± 1.8 ; 平均±標準誤差 $n = 3$, $p = 0.54$, t 検定] と親和性 [K_d (nM): 237 ± 15 と 197 ± 19 ; 平均±標準誤差 $n = 3$, $p = 0.16$, t 検定] を示すことが明らかとなった。

1-D. 考察

PAF はマクロファージ/単球、好中球と同様に好酸球の化学走性因子である。しかも、これらの細胞は全て PAF を産生することが報告されている。したがって、PAF/PAF 受容体は気管支喘息に伴う気道炎症の惹起に関与すると考えられてきた。しかしながら、予想に反して我々の喘息モデル実験において肺胞洗浄液中の細胞を見ると、PAFR-KO マウスでは炎症細胞の肺への浸潤に異常は認められなかった。これを裏付けるように、肺切片を組織学的に解析した結果、やはり PAFR-KO マウスにおける炎症像は野生型マウスのものと同様であった。以上の結果から、PAF は喘息時の気道炎症には必須ではないことが示唆された。同様に、PAFR-KO マウスでは血清中の OVA 特異的 IgE 及び IgG1 レベルや肺胞洗浄液中の Th2 サイトカインレベルに異常が観察されなかったことから、喘息時の液性免疫反応や Th2 細胞のサイトカイン産生反応に対し PAF は影響を及ぼさないことが示唆された。

気道過敏性は気管支喘息の主要な症状である。メカニズムは不明であるが、PAF はヒトや動物に気道過敏性を惹起することが知られている。PAF 受容体欠損が喘息時の気道過敏性惹起に及ぼす影響を探るため、今回喘息様症状に陥った PAFR-KO マウスの気道過敏性を測定し

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增大するのである。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・大腿骨の骨髓細胞を 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°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°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。

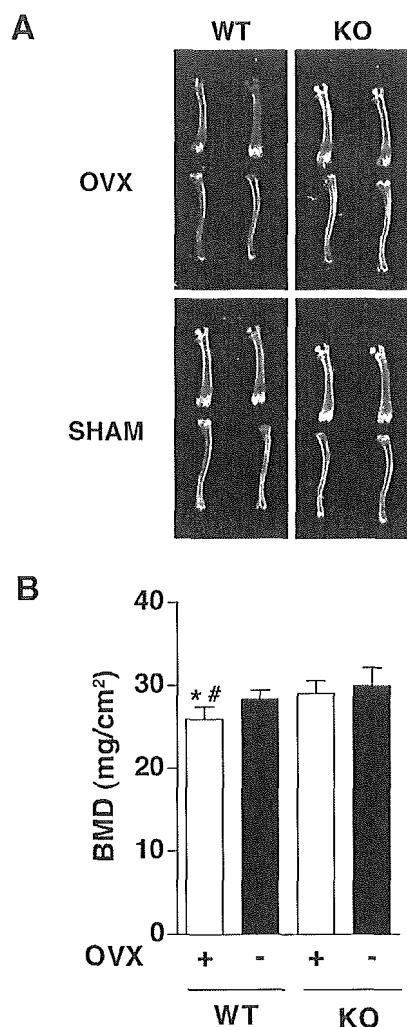


図3。X線撮影による骨の解析。(A) 卵巣摘除4週間後の頸骨及び大腿骨のX線写真。OVX：卵巣摘除；SHAM：模擬手術 (B) 骨密度の測定。卵巣摘除4週間後に大腿骨の骨密度 (BMD) を二重エネルギーX線吸収法で測定した。WT-OVX: $n=6$; WT-SHAM: $n=7$; KO-OVX: $n=5$; KO-SHAM: $n=6$ 。値は平均±標準偏差を示す。* $P < 0.005$ vs. KO-OVX; # $P < 0.05$ vs. WT-SHAM。

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(OH)₂ビタミンD₃(100 nM)、プロスタグランジンE₂(1 μM)、10% FCSを含むαMEMを用いた。その後、コラ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時間後にコラゲナーゼとディスペラ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IL-1β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IL-1β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。

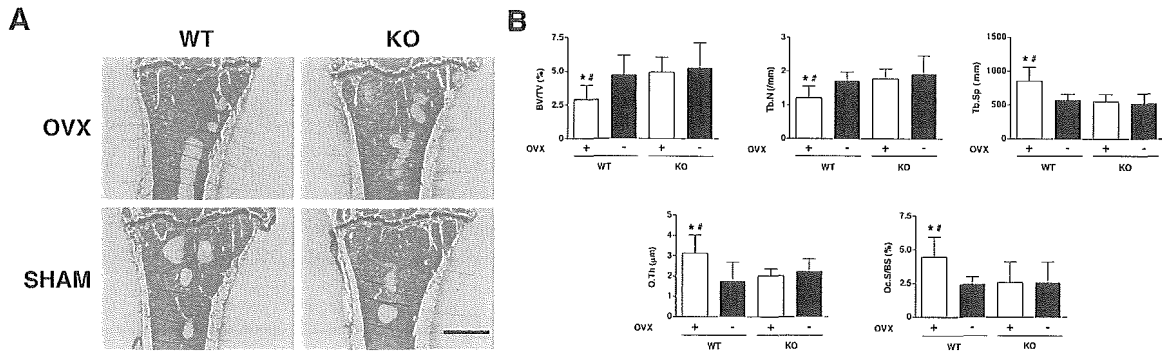


図4 PAFR-KO マウスにおける骨量減少の抑制と骨代謝回転の不変性。(A) 頸骨の骨幹端領域のトルイジンブルー染色像。スケールバーは1.0 mmを表す。(B) 骨の組織形態計測。Aの写真をもとにして海綿骨量 (BV/TV)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁間隔 (Tb.Sp)、類骨面 (O.Th)、骨吸収面 (Oc.S/BS)を測定した。WT-OVX: $n = 6$; WT-SHAM: $n = 7$; KO-OVX: $n = 5$; KO-SHAM: $n = 6$ 。値は平均±標準偏差を示す。* $P < 0.05$ vs. KO-OVX; # $P < 0.05$ vs. WT-SHAM。

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

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

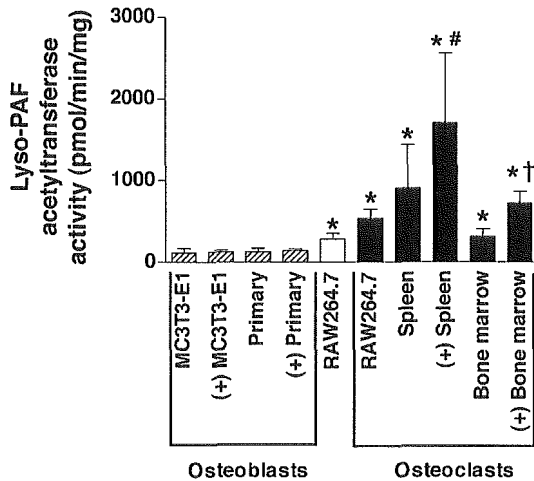


図5 骨の細胞におけるリゾPAF アセチルトランスフェラーゼ活性。MC3T3 細胞及び RAW264.7 細胞はそれぞれマウスの骨芽細胞株とマクロファージ株である。破骨細胞は RAW264.7 細胞や脾臓、骨髄から誘導することができる。(+)は TNF- α および IL-1 β で刺激したことを示す。* $P < 0.05$ vs. primary osteoblasts; # $P < 0.05$ vs. 非刺激 spleen-derived osteoclasts; † $P < 0.05$ vs. 非刺激 bone marrow-derived osteoclasts。値は平均±標準偏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

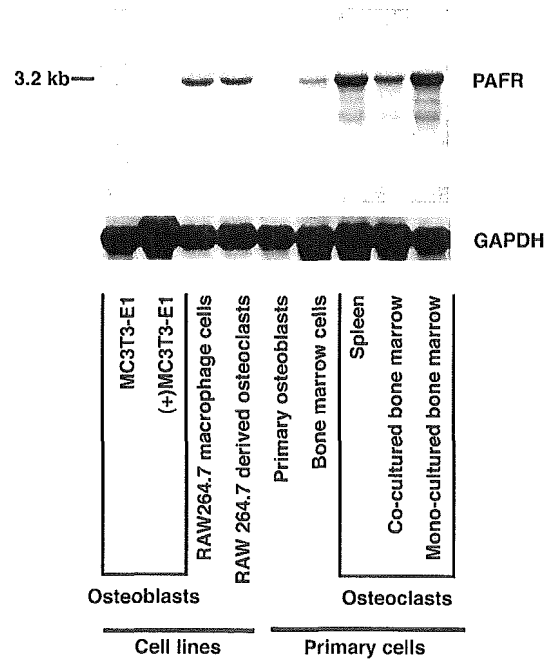


図6 PAF 受容体 mRNA の発現解析。総 RNA 10 μ g に対するノーザンハイブリダイゼーションの結果、約 3.2 kb の長さの mRNA が検出された。

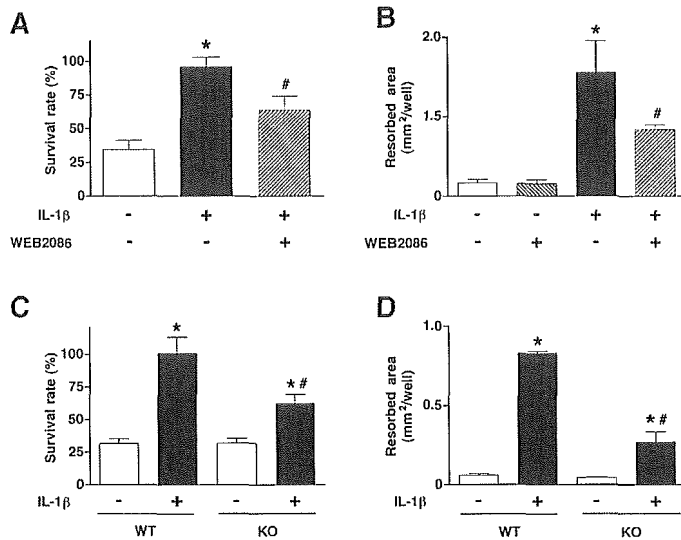


図 7 IL-1 β で促進される破骨細胞のサバイバルとカルシウム吸収に対する PAF 受容体の効果。(A) 破骨細胞のサバイバルへの PAF 受容体アンタゴニスト WEB2086 の効果。* $P < 0.0001$ vs. 未処理群; # $P < 0.0001$ vs. IL-1 β 処理群。 $n = 5$ 。(B) 破骨細胞のカルシウム吸収への PAFR アンタゴニストの効果。* $P < 0.0001$ vs. 未処理群; # $P < 0.005$ vs. IL-1 β 処理群。 $n = 3$ 。(C) PAFR-KO 破骨細胞のサバイバル。* $P < 0.0001$ vs.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

行った。その結果、PAF 受容体は主に骨

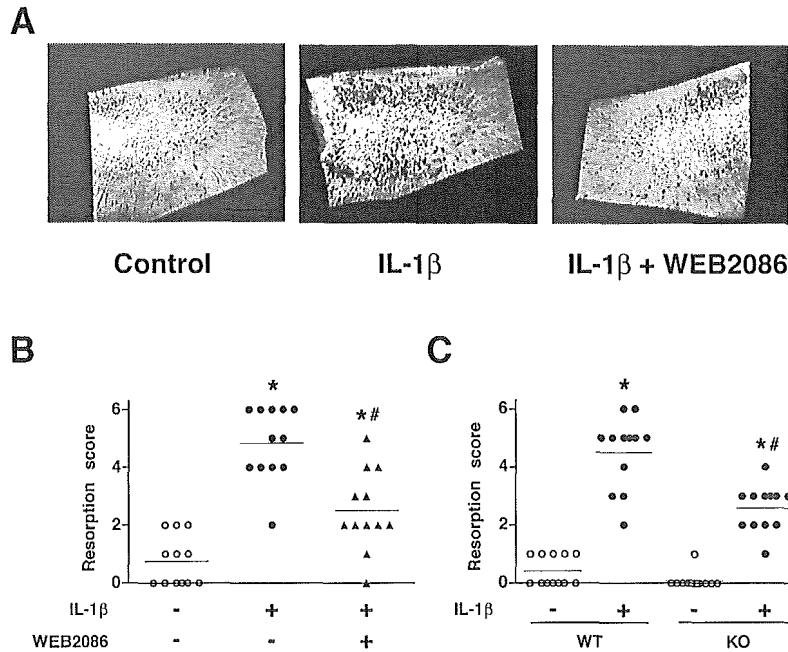


図 8 IL-1 β で促進される破骨細胞による骨吸収に対する PAF 受容体の効果。(A) IL-1 β 存在下で培養した頭頂骨 X 線撮影像。(B) と (C) 骨吸収に対する PAF 受容体アンタゴニストの効果 (B) と PAF 受容体欠損の効果 (C)。A の写真をもとにして個々の頭頂骨の骨吸収の程度を半定量的にスコア化した結果を示す。水平線は各群の平均値を示す。スケールバー: 1.0 mm。

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

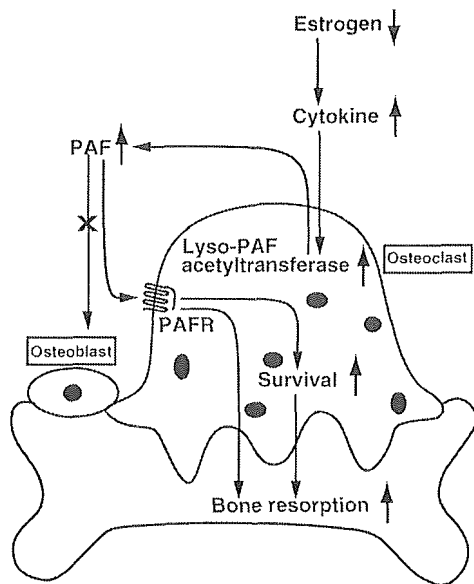


図9 骨吸収における PAF と PAF 受容体の働きについての提唱モデル。詳細は本文参照。

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、(B)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、(F)PAF産生が増加する、(G)PAFは骨芽細胞を介さずに破骨細胞

に作用する、(H)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有な例である。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ンネル型の分子(バニロイドレセプター1 や酸感受性イオンチャンネル)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、反応停止には最終濃度 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

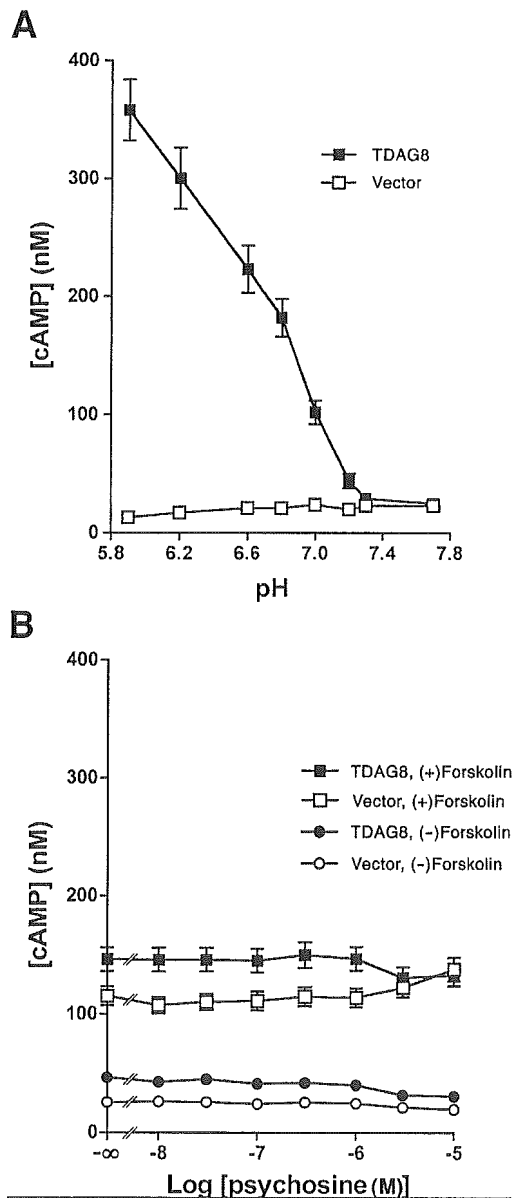


図 10 TDAG8 による pH 依存的な cAMP 産生。
(A) cAMP 産生の pH 依存性。n = 4。
(B) cAMP 産生へのサイコシンの無影響。n = 4。
pH 7.2 における結果を示す。なお pH 5.9
でも同様の結果が得られた。

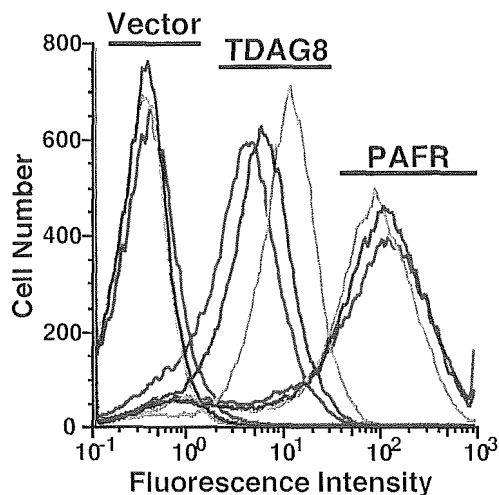


図 11 pH 依存的な TDAG8 の細胞内移行。TDAG8、PAF 受容体またはベクターをトランスフェクトした安定発現細胞を pH 5.7 (赤)、6.0 (青)、7.7 (緑) の HEM-PSS で 37°C、30 分間刺激した。固定後に細胞表面上に発現する HA エピトープタグのレベルをフローサイトメーターで測定した。

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ため、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

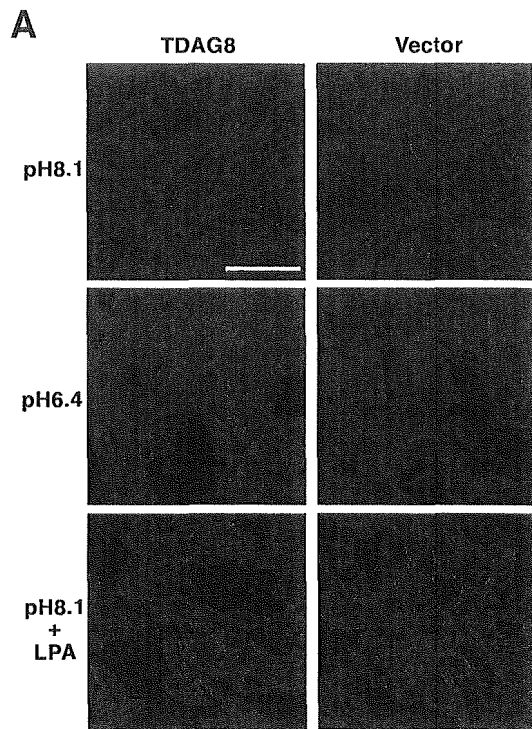
TDAG8 を安定発現する細胞では刺激するバッファの pH が低くなるにつれて、cAMP 産生量の上昇が pH 7.2 以下で再現よく観察された(図 10A)。ベクターをトランスフェクションしただけの細胞(図 10A)または PAF 受容体を安定発現する細

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、その効果は酸に回答した TDAG8 ほどは強くなかった(図 12A)。



B

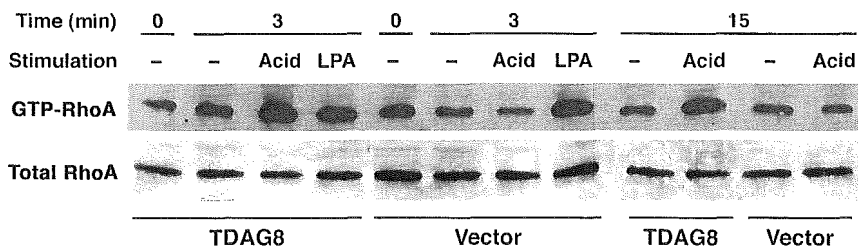


図 12 酸で刺激した TDAG8 によるアクチンストレスファイバー形成と Rho の活性化。(A) 共焦点蛍光顕微鏡観察によるアクチンフィラメントの再構成。血清飢餓状態においた細胞を pH 6.4 または $1 \mu\text{M}$ LPA/pH 8.1 で 37°C 、15 分間刺激した。その後、を固定しローダミン-ファロイジンで染色した。スケールバー: $10 \mu\text{m}$ 。(B) TDAG8 により活性化した RhoA のプルダウンアッセイ法による検出。血清飢餓状態においた細胞を 37°C で pH 6.4 (*acid*) または $1 \mu\text{M}$ LPA/pH 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 にはアシド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.
- 一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

和文総説

1. 石井 聡 (2004) 新しい脂質メディエ