

における各種 LPA 受容体の発現プロファイル調べるために、この細胞から抽出された RNA を鋳型にして RT-PCR を行った。その結果、LPA₄ の mRNA が僅かに検出されたが、LPA₁₋₃ の mRNA はどれも検出されなかった。この細胞において、LPA₄ の発現と LPA への反応性を欠如していることは一見矛盾しているようであるが、LPA に反応することができない程度しか LPA₄ 分子がこの細胞には発現していないためではないかと解釈している。また若しくは、転写後及び翻訳後調節が mRNA 発現とタンパク質発現の間の不一致を招いているのかも

しれない。いずれにせよ、B103 細胞における低い LPA₄ mRNA の発現は考慮の範囲外と見なし、この細胞の LPA への不応性と神経細胞としての性質を利用して、神経細胞における LPA₄ の機能を調べることにした。

LPA₁ と LPA₄ の安定発現株の樹立にあたり、細胞表面上の発現レベル容易にするために N 末端に HA エピトープを付加した。「研究方法」の項で記したように、蛍光標識した HA エピトープを指標に受容体発現量の高い薬剤耐性細胞をフローサイトメーターで分取した。こうして得られた多クローンの混合細胞

を用いれば、単一クローンがたまたま示すかもしれない機能的な異常を観察するリスクを払拭することができる。このような分取を続けて 2 回行って得られた受容体安定発現細胞での発現レベルをフローサイトメーターで調べたところ、LPA₁ の方が LPA₄ よりも高いことが判った (図 1A)。しかしながら、³H ラベルした LPA をリガンドとした結合アッセイでは最大結合量 (B_{max}) が B103-LPA₁ では 0.8 pmol/mg タンパク質であり

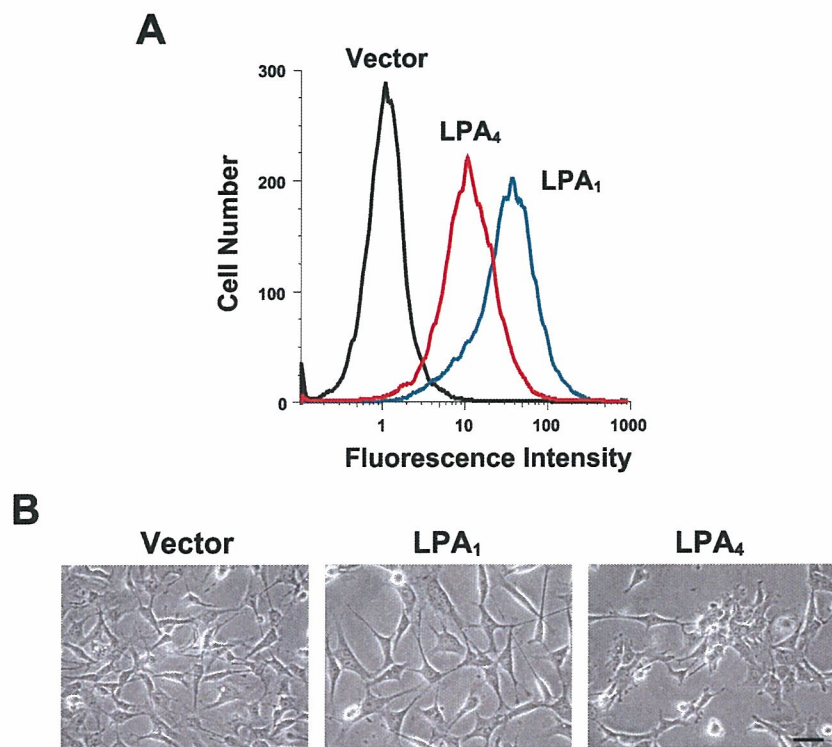


図 1 LPA₁ と LPA₄ の B103 細胞における安定発現。(A) フローサイトメトリー解析。N 末に HA エピトープを付加した LPA₁ または LPA₄ の発現ベクターを B103 細胞にトランスフェクションして受容体を安定発現させた。抗 HA 抗体とフィコエリスリンで標識した二次抗体を使って細胞を染色し、高いレベルで受容体を発現する細胞をセルソーターで分取した。この分取を二回繰り返して得られた細胞群における受容体発現レベルを示す。空ベクターをトランスフェクションした細胞を陰性対照サンプルとした。(B) 血清存在下における B103-vector、B103-LPA₁、B103-LPA₄ 各細胞の形態。細胞を播種して 24 時間後に撮影した。黒線は 40 μm を示す。

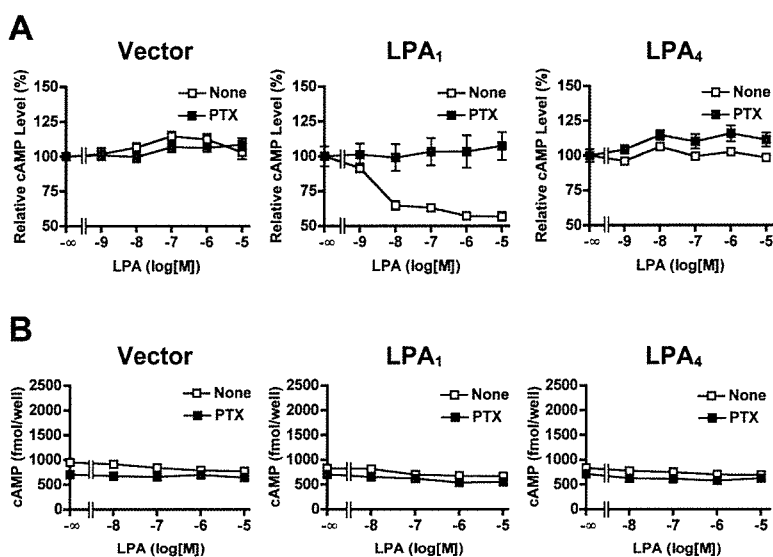


図 2 LPA が B103-LPA₁ と B103-LPA₄ 細胞の cAMP 産生に及ぼす効果。(A) フォルスコリン存在下の cAMP 産生レベル。無血清状態で培養した各細胞を 0.5 mM IBMX と 50 μM フォルスコリン存在下で種々の濃度の LPA で室温において 30 分間刺激した。細胞を溶解後、溶解液中の cAMP 濃度を測定した。LPA 非存在下での cAMP 濃度を 100% として示した。PTX 処理は 100 ng/ml で 24 時間行った。3 回行った実験のうち代表的なデータを示す ($n=4$)。(B) フォルスコリン非存在下の cAMP 産生レベル。無血清状態で培養した各細胞を 0.5 mM IBMX 存在下で種々の濃度の LPA で室温において 30 分間刺激した。細胞を溶解後、溶解液中の cAMP 濃度を測定した。PTX 処理は 100 ng/ml で 24 時間行った。3 回行った実験のうち代表的なデータを示す ($n=4$)。

B103-LPA₄ の B_{max} 値 (6.0 pmol/mg タンパク質) よりも低かった。この一見した矛盾は、1) 結合アッセイでは形質膜以外に細胞内小器官の膜も含まれている、2) 二つの受容体で HA タグの抗原性に違いがあった、などで説明ができるかもしれない。LPA₁ または LPA₄ の安定発現により二次的に他の LPA 受容体の発現が促進されていないことは、各安定発現細胞由来の RNA を鋳型にした RT-PCR で確認した (データ略)。

これら受容体安定発現細胞の増殖速度には変化はなかったが、血清存在下での形態がそれぞれで独特ものになっていた (図 1B)。B103-LPA₁ 細胞は B103-vector 細胞よりも扁平で、なおかつ遊走性の形態を示していた。興味

深いことに、B103-LPA₄ 細胞は上皮細胞様の形態を示し、B103-vector 細胞よりも細胞どうしで互いに密着していた。以上のことから、LPA₁ と LPA₄ は B103 細胞に異なった細胞形態をもたらす独特の細胞内シグナル経路を持つことが示唆された。

LPA₁ と LPA₄ のアデニル酸シクラーゼ活性への影響

LPA₄ の細胞内シ

グナル経路を明らかにするためにまず、LPA₄ が他の LPA 受容体 (LPA₁₋₃) と同様にアデニル酸シクラーゼ活性を抑制するかについて検討を行った (図 2A)。アデニル酸シクラーゼを GPCR 非依存的に活性化するフォルスコリンで処理した B103-LPA₁ 細胞では、LPA は濃度依存的にアデニル酸シクラーゼ活性を抑制した (IC_{50} は 10 nM 以下)。この抑制効果は百日咳毒素 (PTX) 処理で完全にブロックされたので、 $G_{i/o}$ 型の G タンパク質の関与が示された。しかしながら、B103-vector と B103-LPA₄ 細胞では 10 μM の LPA に対しても cAMP レベルの変化は認められなかった。このことは LPA₄ が $G_{i/o}$ に共役していないことを示唆する。

以前、私どもは LPA₄ を発現させた

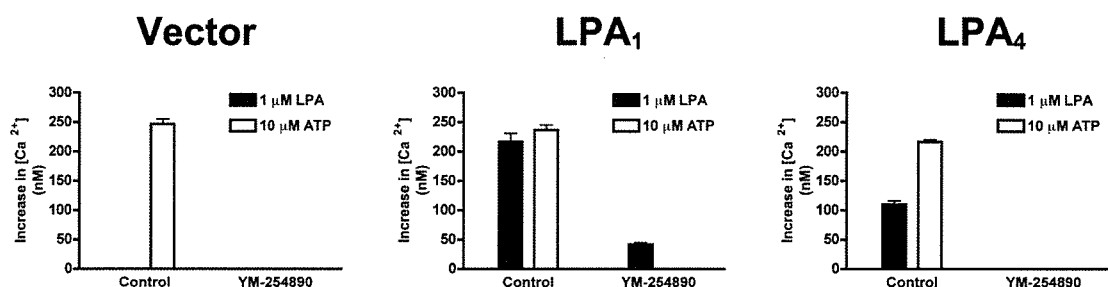


図3 LPA₁とLPA₄を介したCa反応。(A)無血清状態で培養した各細胞に3 μM Fura-2 AMをロードした後、LPAまたはATPで刺激した。YM-254890処理は5 μMで10分間行った。3回行った実験のうち代表的なデータを示す ($n = 3$)

CHO細胞が、LPAに反応してcAMPレベルを上昇させることを報告した。ところが、B103-LPA₄細胞はB103-vectorやB103-LPA₁細胞と同様にcAMPレベルを上昇させることはなく(図2B)、B103細胞ではLPA₄とLPA₁はG_sタンパク質に共役していないことが示唆された。

LPA₁とLPA₄のCa反応への影響

多くの細胞でLPAは細胞内Ca濃度を上昇させることが示されている。実際、LPA₁₋₃はどれもB103細胞に発現させたときにCa反応を引き起こすことが報告されている。そこで、LPA₄がB103細胞でCa反応を引き起こすかについて検討した。B103-vector細胞は1 μM LPAに応答することはなかったが、B103-LPA₁とB103-LPA₄細胞では細胞内Ca濃度の上昇が認められた。LPAはホスホリパーゼCを介したCa反応を誘導するが、これにはPTX感受性G_{i/o}タンパク質とPTX非感受性G_{q/11}タンパク質を介した経路がある。B103-LPA₁とB103-LPA₄細胞でCa反応に至るシグナル経路を調べるために、まずG_{q/11}特異的阻害剤であるYM-254890で細胞を処理した(図3)。なお、G_{q/11}と共役するP2Y受容体を介してCa反応を引き起こすATPを陽性対照リガンドとした。

B103-LPA₄細胞におけるLPAによるCa反応と、B103-LPA₁とB103-LPA₄両細胞におけるATPによるCa反応は5 μM YM-254890で完全にブロックされた(図3)。一方、B103-LPA₁細胞ではYM-254890は部分的にしかCa反応をブロックしなかったが(図3)、PTXを同時に作用させると完全にブロックされた(データ略)。YM-254890の濃度を20 μMまで上げててもB103-LPA₁細胞のCa反応に対する阻害効果は変わらなかったことから、5 μMのYM-254890はG_{q/11}を阻害するのに十分な濃度と考えられた。以上の結果から、B103-LPA₁細胞ではCa反応にG_{i/o}とG_{q/11}の両方が関与する一方で、B103-LPA₄細胞ではG_{q/11}が主に関与することが示唆された。

LPA₁とLPA₄の細胞円形化への影響

LPAは成長円錐崩壊、神経突起退縮、細胞円形化などの形態変化を幾つかの神経細胞で引き起こすことが報告されている。特にB103細胞の円形化においては、マウスLPA₁とLPA₂そしてヒトLPA₁で報告がある。そこで、ヒトLPA₄の細胞円形化への寄与について検討を行った(図4AとB)。B103細胞は、LPA₁またはLPA₄を安定発現させたことにより、LPA投与前の段階で円形を呈す

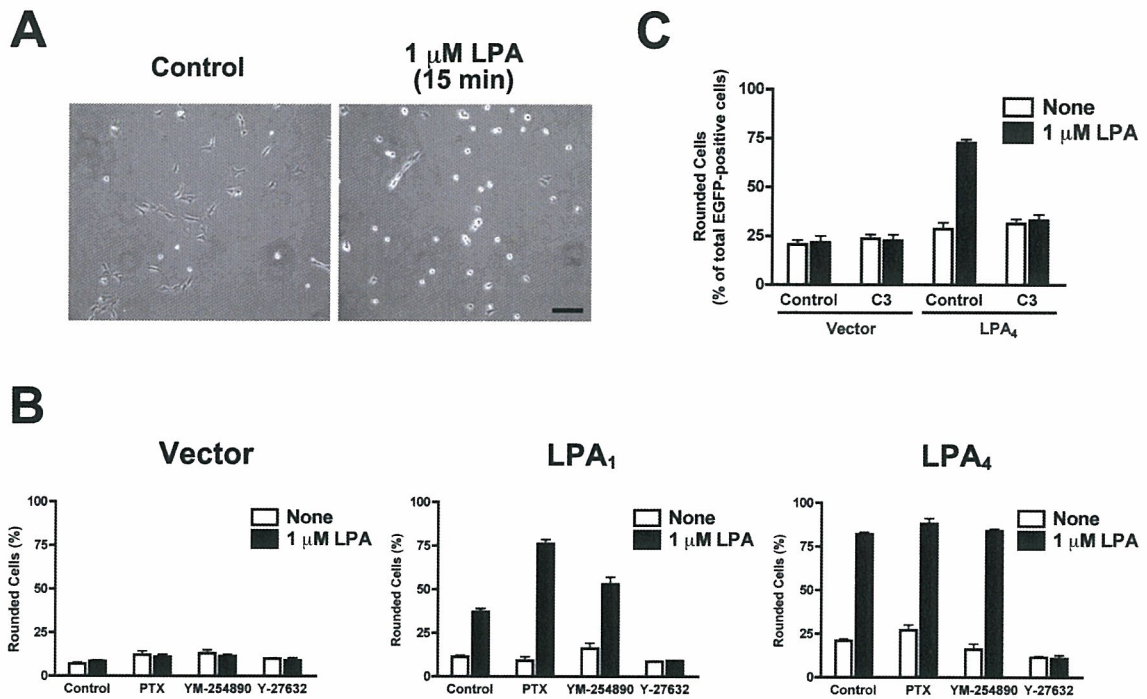
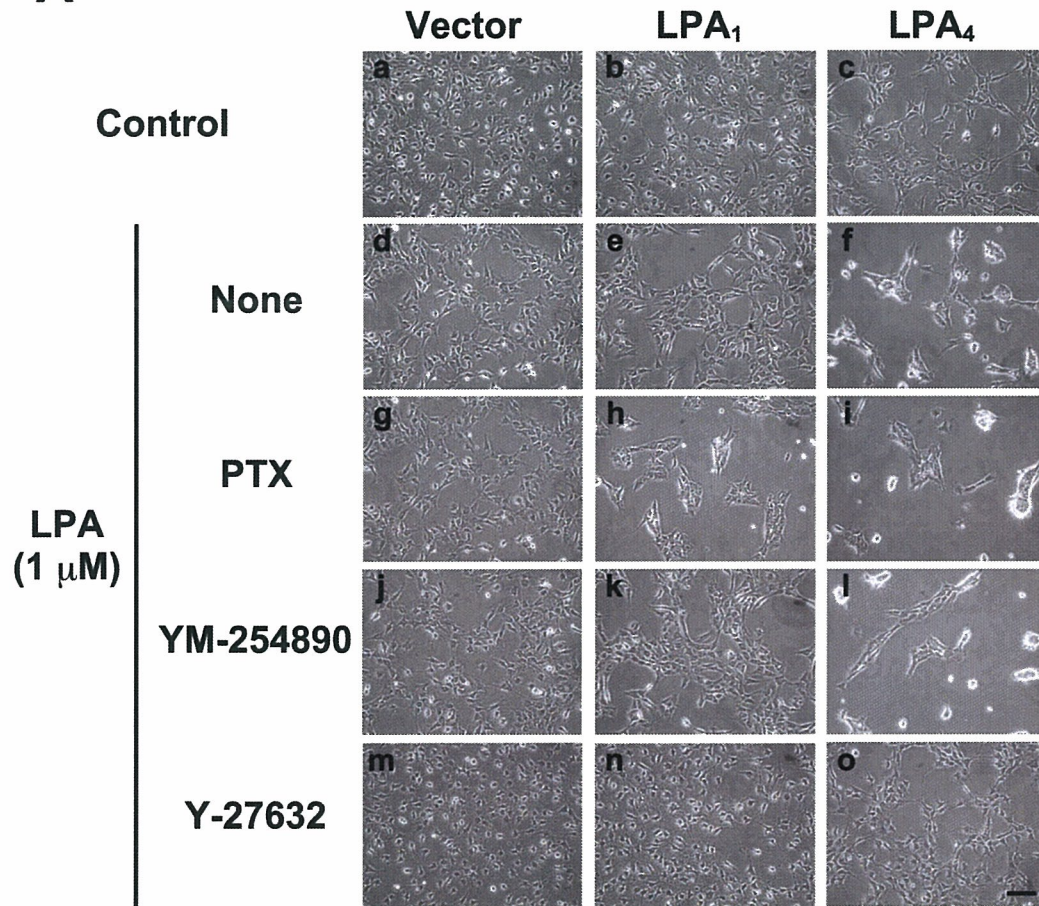


図4 G_{12/13}-Rho-ROCK 経路を介した LPA による B103-LPA₁ と B103-LPA₄ 細胞の円形化。(A) B103-LPA₄ 細胞の円形化の様子。無血清状態で培養した細胞を LPA で刺激した。黒線は 100 μm を示す。(B) PTX、YM-254890、Y-27632 が細胞円形化に及ぼす影響。無血清状態で培養した細胞を 100 ng/ml PTX で 24 時間、または 5 μM YM-254890 で 10 分間、または 5 μM Y-27632 で 10 分間、前処理した。200 個以上の細胞について調べたうちの円形化した細胞の割合を示す (n = 3)。3 回行った実験のうち代表的なデータを示す。(C) C3 細胞外酵素が B103-LPA₄ 細胞の円形化に及ぼす効果。C3 細胞外酵素の発現ベクターまたは空ベクターを EGFP 発現ベクターとともにトランスフェクションした。無血清状態で培養した細胞を 1 μM LPA で 15 分間処理し、固定後に蛍光顕微鏡観察によって EGFP 陽性細胞を同定し、これを C3 細胞外酵素がトランスフェクションされた細胞とした。100 個以上の細胞について調べたうちの円形化した細胞の割合を示す (n = 3)。2 回行った実験のうち代表的なデー

るものの割合が僅かに上昇していた。LPA 刺激 15 分以内に約 80% の B103-LPA₄ 細胞が円形化し、神経突起を退縮させていた。過去の報告と同様に B103-LPA₁ 細胞でも細胞の円形化が観察されたが、その割合は B103-LPA₄ 細胞のものよりも低かった。B103-vector 細胞では LPA による細胞円形化は認められなかった。LPA による細胞の円形化には低分子 G タンパク質の一つである Rho の関与があると言われている。そして、G_{12/13} 型の三量体 G タンパク質が Rho を活性化することも知られている。さらに、G_{q/11} が Rho 依存性的もしくは非依存性的経路で細胞の円形化を引き起こすことも

知られている。そこで、どの三量体 G タンパク質とシグナル経路が LPA による細胞円形化に関わるのかを調べるために、細胞を PTX や YM-254890、そして Rho のエフェクターである ROCK の阻害剤 (Y-27632) で処理した。B103-LPA₄ 細胞において、PTX や YM-254890 は LPA による細胞の円形化に影響を及ぼさなかったが、Y-27632 はこの形態変化を完全に抑制した。Y-27632 は B103-LPA₁ 細胞の円形化反応に対しても同様に抑制効果を示し、また YM-254890 の効果はやはり B103-LPA₄ 細胞と同様に全く認められなかった。興味深いことに、PTX 処理は B103-LPA₁ 細胞の LPA による

A



B

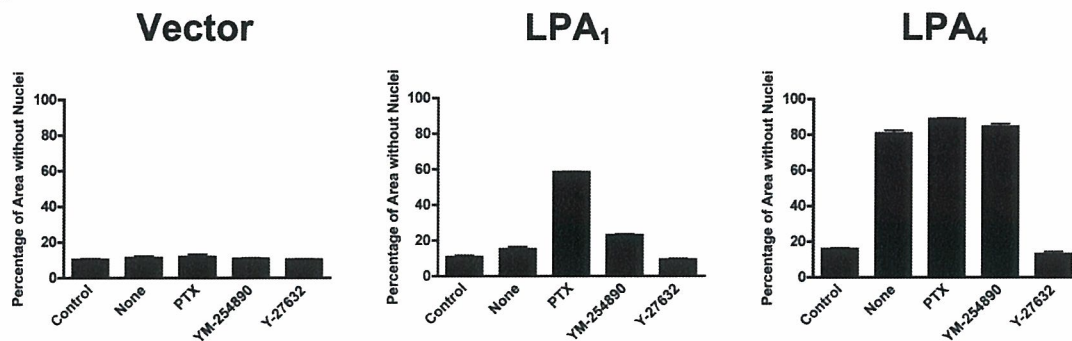


図 5 ROCK を介した B103-LPA₄ 細胞の凝集反応。(A) 無血清状態で培養した細胞を LPA で 3 時間刺激する前に、100 ng/ml PTX で 24 時間、または 5 μM YM-254890 で 10 分間、または 5 μM Y-27632 で 10 分間、各細胞を前処理した。黒線は 100 μm を示す。(B) 細胞凝集の定量化。(A)の細胞を固定化後に、核の染色を施した。細胞凝集の程度を示すパラメーターは「研究方法」に記した手順に従って計算し、グラフの縦軸として表した。データは、異なるウェルで観察した 3 視野の値の平均である。2 回行った実験のうち代表的なデータを示す。

円形化反応を促進した。この円形化反応における Rho の関与を確認するために、B103-LPA₄ 細胞にボツリヌス菌の

C3 細胞外酵素をコードする DNA をトランスフェクションした。C3 細胞外酵素は ADP リボシル化によって Rho を不活

性化する作用がある。C3 細胞外酵素 DNA に混ぜておいた EGFP の DNA をマーカーにして、トランスフェクションされた細胞を蛍光顕微鏡で同定した。EGFP 陽性の細胞、すなわち C3 陽性の B103-LPA₄ 細胞は LPA による細胞円形化が起きなくなっていた (図 4C)。

LPA の ROCK 依存的細胞凝集作用

上述したように、血清存在下で B103-LPA₄ 細胞は B103-vector 細胞と比べてより凝集して増殖していた (図 1B)。LPA₄ が LPA に反応することが B103 細胞の細胞間接着を促すのかを検討するために、無血清状態で 24 時間培養した B103-LPA₄ 細胞を 1 μM LPA で刺激をした。この実験では、播種した細胞の密度を細胞円形化実験のときよりも高くしたため、個々の細胞の円形化は観察できない代わりに細胞の凝集化が観察できるようになっている (図 5A-f)。B103-LPA₄ 細胞は一過性に凝集した。その程度は LPA 刺激後 2-3 時間で最大に達し、24 時間後には細胞形態は元に戻るといった過程を辿った (データ略)。

細胞凝集に関わる LPA₄ 受容体のシグナル経路を明らかにするために、B103-LPA₄ 細胞を幾つかの阻害剤で処理した。LPA による B103-LPA₄ 細胞の形態変化は Y-27632 で完全に抑制された (図 5A-o)。これとは対照的に、PTX や YM-254890 では細胞凝集は抑えることができなかった (図 5A-i と-l)。この細胞凝集の結果を「研究方法」の項に示した手順で定量化し、図 5B に示した。以上の結果、B103-LPA₄ 細胞において Rho は、G_{i/o} と G_{q/11} 非依存的に LPA による細胞凝集に関わることが示唆さ

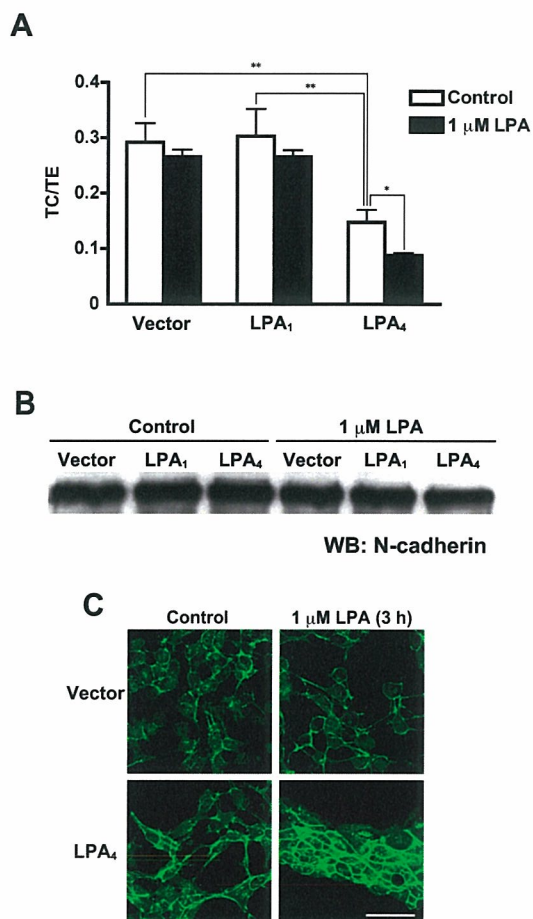


図 6 B103-LPA₄ 細胞で顕著な N-カドヘリン依存的な細胞接着。(A) 細胞間接着の Ca 依存性。無血清状態で培養した細胞を LPA で 2 時間刺激し、2 mM CaCl₂ (TC 処理) または EDTA (TE 処理) を含む HBSS で細胞を洗浄した。引き続き、0.01% トリプシンを加えて 37°C において 30 分間処理した。穏やかに 10 回ピペッティングして細胞塊を解離させ、小さくなった細胞塊の数を細胞カウンターで数えた。細胞間接着程度は TC/TE 比で表した (このパラメーターはカドヘリン活性と逆相関していることに注意)。5 回の実験の平均値を示す。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$ 。(B) B103 細胞における N-カドヘリンの発現。無血清状態で培養した細胞を LPA で 3 時間刺激し、溶解した。同じ量のタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、ウェスタンブロットティングで N-カドヘリンを検出した。(C) B103-vector と B103-LPA₄ 細胞における N-カドヘリンの免疫染色。無血清状態で培養した細胞を LPA で刺激し、固定後に抗 N-カドヘリン抗体とフル

れた。Rho は、アクチン骨格の再構成を介して細胞間接着を調節することが知られている。上記の LPA による細胞

凝集現象にアクチン骨格の再構成が関わるかを検討するために、B103-LPA₄細胞をアクチン重合化阻害剤であるサイトカラシンDで処理をした。その結果、LPAによる細胞の形態変化は起こらなくなった(データ略)。したがって、LPAによる細胞凝集反応にはアクチンの再構成が必要であることが示された。B103-LPA₄細胞と同様に、PTXで処理をしたB103-LPA₁細胞もLPA処理後に凝集した(図5A-h)。

LPA₄を介したN-カドヘリン依存性細胞間接着

LPAでB103-LPA₄細胞を刺激して形成された細胞凝集物は、ピペッティングをしてもほとんどほぐれなかった(データ略)。細胞間接着はCa依存性のものと非依存性のものがあるが、カドヘリンは前者の主要な責任分子である。カドヘリン依存性接着は元来、Ca存在下でトリプシン耐性であり、かつCa非存在下でトリプシン感受性であると定義されている。そこで、カドヘリン活性を測るための細胞間接着アッセイの一つである「細胞分散アッセイ」を行うことによって、LPAによる細胞間接着がカドヘリン依存性なのかについて検討を行うこととした。そのために、「研究方法」で記した手順に従って、Ca存在下でトリプシン処理したときの細胞塊の数(TC)とEDTA存在下でトリプシン処理したときの細胞塊の数(TE)を求め、両者の比(TC/TE)を算出した。どちらの処理でもまず大きな細胞凝集塊が生じ、これをピペッティングでほぐすと細胞塊の数自体は増える。カドヘリン依存性細胞間接着はCa

／トリプシン処理後にも維持されるが、EDTA／トリプシン処理によって細胞間接着はほぼ完全に崩壊することから、TC/TE比はカドヘリン依存性細胞間接着の程度に逆比例するパラメーターとして捉えることができる。LPA刺激後にB103-LPA₄細胞のカドヘリン依存性細胞間接着の程度は上昇した(図6A)。B103-vectorとB103-LPA₁細胞ではLPA刺激による変化は認められなかった。なお、LPA刺激する前の段階から、B103-LPA₄細胞の凝集の程度は他の細胞に比べ亢進していた。

カドヘリンにはクラシックカドヘリン、デスモソーマルカドヘリン、プロトカドヘリン、種々のカドヘリン様タンパク質などがあり、大きなスーパーファミリーを構成している。神経系で発現するとされる二つのクラシックカドヘリン、すなわちN-カドヘリンとE-カドヘリンの発現レベルをウェスタンブロッティングで調べた。B103細胞では過去の報告通り、N-カドヘリンが豊富に発現していたが(図6B)、E-カドヘリンの発現は検出できなかった(データ略)。LPA処理によるN-カドヘリンの発現レベルの変化はなかった。Ca／トリプシン処理後のN-カドヘリンはウェスタンブロッティングで見限り無傷であったが、EDTA／トリプシン処理したときは完全に切断されることが観察された(データ略)。LPAで刺激後のB103-LPA₄細胞では、細胞間接着面にN-カドヘリンの集積が太く明るいバンドとして認められた(図6C)。B103-vector細胞ではこのような変化は認められなかった。

1-D. 考察

過去の多くの研究で、Rho-ROCK 経路を介して LPA が神経細胞に形態変化を引き起こすことが示されてきた。この現象の責任受容体としては、LPA₁ と LPA₂ が報告されている。最近私どもは、p2y₉/GPR23 が第 4 番目の LPA 受容体であること、そしてこの分子が一次構造上 EDG ファミリーの LPA 受容体には属さないことを報告した。LPA₄ が神経細胞に発現することは、この分子が神経系において重要な役割を持つことを示唆する。本研究では、LPA₄ が B103 神経細胞に円形化や N-カドヘリン依存的な凝集化などの形態変化をもたらすことを明らかにした。しかもこれらの形態変化が Rho-ROCK 経路を介していることも併せて明らかにした。

Ca 反応とアデニル酸シクラーゼ活性抑制反応は、LPA がもたらす細胞応答の主なものである。実際、B103 神経細胞に発現した EDG ファミリーの 3 つの LPA 受容体が、これら 2 つの細胞応答を惹起することが報告されている。LPA₁ は Ca 反応を G_{q/11} を介して惹起しているようである (図 3)。アデニル酸シクラーゼ活性抑制反応が PTX 感受性であることは (図 2A)、LPA₁ が G_{i/o} にも共役していることを示唆している。今回、LPA₄ が B103 細胞で Ca 反応を惹起することを示したが、この結果は以前に私どもが LPA₄ を安定発現した CHO 細胞で観察した LPA による Ca 反応と矛盾しない。YM-254890 を使った今回の結果から、LPA₄ はおそらく G_{q/11} を介して Ca 反応を惹起すると考えられる。しかしながら、B103-LPA₄ 細胞では LPA はアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し

なかった。(図 2A) ゆえに、他の LPA 受容体と違い、LPA₄ はこの細胞において G_{i/o} には共役していないらしい。

神経突起の退縮と進展は、神経ガイダンス時の神経細胞のリモデリングやシナプスの可塑性のために重要である。神経突起の退縮は、セマフォリンやネトリン、エフリンに加え、LPA やスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) を含むリゾリン脂質によってももたらされる。B103 細胞に発現した LPA₁ と LPA₂ は LPA 刺激を細胞内に伝え、神経突起の退縮によって細胞を円形化させることが明らかになっている。そして本研究では、LPA₄ が B103 細胞を円形化させることを示した (図 4A)。Sugiura らは、ラットの脳が 1 g あたり 3.73 nmol の LPA を含むことを報告している。以上のことは、LPA による神経突起の退縮に LPA₄ が関与する可能性を示している。神経突起の形成にはアクチン骨格の再構成が必要であり、その調節因子としての Rho の影響は大きい。例えば、S1P は S1P₂、S1P₃、S1P₅ 受容体を介して Rho 依存的な神経突起の退縮を引き起こすことが知られている。幾つかの研究で、LPA による神経突起の退縮に Rho と ROCK の重要な役割が明らかにされている。C3 細胞外酵素と Y-27632 を用いた本研究で明らかになったように、LPA₄ による B103 細胞の円形化反応も Rho と ROCK に依存していた (図 4B と C)。

一般的に G_{12/13} の活性化は Rho や ROCK の活性化とアクチン重合を伴う。G_{q/11} もまた Rho を活性化する報告もあるが、Y-27632 が B103-LPA₁ 及び B103-LPA₄ 細胞の円形化反応を完全に抑制したという本研究の結果は、この

細胞において LPA₁ と LPA₄ から Rho の活性化に至る経路には主に G_{12/13} が介在しているように思われる。LPA による神経突起の退縮現象は多くの論文で扱われているが、責任受容体に言及したものはなく、mRNA の発現をもとに LPA₁ や LPA₂ が候補受容体として示唆されているにとどまっている。本研究は、過去の論文で観察されていた LPA 関連現象の幾つかに LPA₄ が介在する可能性を示唆している。

LPA は細胞運動を刺激し、また癌細胞の浸潤を調節することが示されているが、両者には主に LPA₁ と G_{i/o} が介在している。血清存在下において、B103-LPA₁ 細胞は扁平な形態をしており、ディッシュ全体にあまねく分散していた (図 1B)。この形態学的特徴は、おそらく LPA₁-G_{i/o}-Rac シグナル経路を介した LPA の作用によるものであろう。B103-LPA₁ 細胞とは対照的に、B103-LPA₄ 細胞は血清存在下で凝集していた (図 1B)。こちらには G_{12/13}-Rho-ROCK シグナル経路が介在しているように思われる (図 5)。この細胞間接着には *de novo* 合成を伴わない N-カドヘリンの関与があった (図 6)。Rho はアクチン骨格の再構成を促すので、LPA で誘発される細胞骨格の変化が図 6 で示すように N-カドヘリンの細胞内局在に影響を与えていると考えられる。その結果、強い細胞間接着を B103-LPA₄ 細胞にもたらしているのであろう。Y-27632 やサイトカラシン D で処理した細胞では LPA による細胞凝集が消失していること (図 5 と一部データ略) は、この考えに矛盾しない。N-カドヘリンは神経系細胞に広く発現

しており、シナプス形成やミエリン化を含む神経の発生や機能発現に重要な分子である。Weiner らは以前、ラットのシュワン細胞において N-カドヘリンを含む細胞間結合が LPA によって生じることを報告している。さらに LPA は、ラット胎児由来海馬の神経前駆細胞や分裂終了したマウス大脳皮質神経細胞に対して凝集反応を引き起こすことも報告されている。本研究で得られた結果は、LPA₁ や LPA₂ に加え LPA₄ もまた、LPA が上述したような薬理作用を神経細胞へ及ぼす際の責任受容体である可能性を高めている。Rac や G_{i/o} を活性化する LPA₁ や LPA₂ とは対照的に、LPA₄ は G_{i/o}-Rac 経路を活性化することはないようであるので (図 3A)、神経の発生や機能発現に重要とされる Rho と Rac の活性化の適切なバランスを維持するのに独特の役割を果たす受容体なのかもしれない。

PTX は LPA₁ を介した細胞円形化反応を促進した (図 4B)。以前の報告でも、LPA が 1321N アストロサイトーマ細胞を円形化させる反応を PTX はやはり促進している。Rho の活性が G_{i/o} を介した Rac の活性化によって阻害されることが知られている。実際、上述の 1321N アストロサイトーマ細胞でも Rho を介した神経突起退縮が Rac によって抑制されている。B103 細胞やマウス胎児髄膜線維芽細胞、マウス皮膚線維芽細胞などにおいて、LPA₁ は G_{i/o} と共役し、Rac を強く活性化することが報告されている。以上をまとめると、B103-LPA₁ 細胞を PTX で処理すると LPA 刺激時の G_{i/o} の活性化、さらには Rac の活性化は抑制され、結果的に Rho を介した細

胞円形化反応を亢進するに至ると考えられる。LPA による B103-LPA₁ 細胞の凝集を PTX 処理が亢進する現象 (図 5A-h と B) も、おそらくこの機構によって説明できるであろう。

LPA₄ が Rho 依存的な細胞の形態変化をもたらすことを本研究で示した。LPA による Rho の活性化には LPA₁ と LPA₂ を介する過去の報告がある。しかしながら、LPA₁ と LPA₂ に依存しない経路も提唱されている。Contos らは、LPA₁ と LPA₂ の両方を欠損したマウスに由来する胎児髄膜線維芽細胞が LPA に反応してストレスファイバー形成することを示している。この細胞は LPA₃ mRNA を発現していないので、未知の LPA 受容体が存在する可能性を示している。さらにこの可能性を支持するのは、LPA₁ と LPA₂ の両方を欠損したマウスに由来する皮膚線維芽細胞が LPA に反応して Rho を活性化することを示した Hama らの報告である。マウス皮膚線維芽細胞に LPA₄ が高発現することと本研究結果を併せて考えると、この細胞では LPA₄ も LPA による Rho の活性化に関わっているのかもしれない。さらに、Hama らは LPA による Rac の活性化が完全に LPA₁ と LPA₂ に依存することを観察しており、このことは本研究の結果から導かれた「LPA₄ が G_{i/o}-Rac シグナル経路を活性化しない」という仮説を支持する。

LPA₁ または LPA₄ を安定発現した B103 細胞では LPA 刺激前から円形化した細胞の割合がわずかに上昇していた (図 4B)。さらに、無血清培養した B103-LPA₄ 細胞は、B103-vector や B103-LPA₁ 細胞よりもお互いにより強

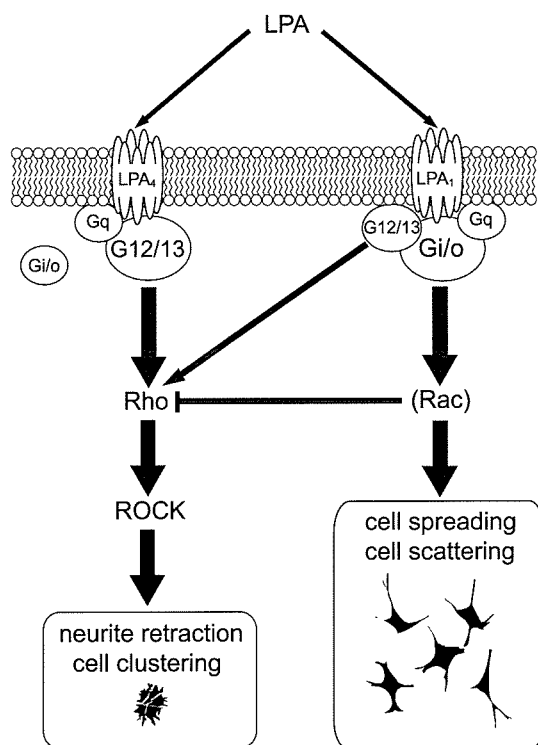


図 7 B103 細胞に異なる形態をもたらす LPA₁ と LPA₄ の独特な細胞内シグナル経路。LPA₄ の発現は G_{12/13}-Rho-ROCK 経路を介して細胞を円形化及び凝集化させる。これとは対照的に、LPA₁ の発現は細胞を扁平化及び分散化させる。PTX 処理で G_{i/o} の活性を阻害した LPA₁ 発現細胞は、LPA₄ 発現細胞のように凝集化する。このことはおそらく G_{i/o}-Rac 経路を介した Rho の活性化抑制機構の存在を反映したものであろう。LPA₁ と LPA₄ はともに G_q と共役しているが、このシグナル経路は細胞形態には影響を与えない。

く接着していた (図 6A)。これら細胞形態学的効果は LPA 受容体の構成的活性化によるものかもしれない。実際、リゾリン脂質やプロスタノイドなどの脂質メディエーター GPCR が構成的に活性化されていて発現細胞に形態変化を及ぼす報告が幾つもある。例えば、プロスタグランジン F_{2α} 受容体のアイソフォームである FP_B をトランスフェクションしたヒト胎児腎臓 HEK293 細胞において、リガンド非存在下で細胞円形化やカドヘリン依存性細胞間接着が観察されている。なお、この構成的活性化にホスファチジルイノシトール

-3-キナーゼとβ-カテニンが関わる
ことが提唱されている。無血清状態での
B103-LPA₁やB103-LPA₄細胞で観察され
た円形反応の亢進は、細胞が産生した
LPA がオートクリンに自らの発現する
受容体に作用したことに起因する可能
性も考えられる。以上2つの仮説は、
Y-27632 で細胞を処理すると、円形化
した細胞の割合が減少することと矛盾
しない (図 4B)。

1-E. 結論

本研究では図 7 に示すように、新規
LPA 受容体 LPA₄ がラット神経細胞株に

おいて Rho の活性化に寄与すること
をはじめ示した。LPA₄ を介した Rho の
活性化は、細胞の円形化や凝集などの
形態変化を引き起こした。LPA は神経
細胞に対して神経突起の退縮や細胞塊
の形成を誘導することがよく知られて
いる。LPA₄ のエフェクターとして Rho
が同定されたことは、EDG ファミリー
の LPA 受容体では説明が付かない LPA
の薬理作用の幾つかについて、新たな
解釈を与えてくれるであろう。神経系
における内在性 LPA₄ の機能について
より理解を深めるには、さらなる研究
が必要である。

研究協力者

・清水孝雄 東京大学大学院医学系研
究科 生化学分子生物学講座 教授
・柳田圭介、野口響子 東京大学大学
院医学系研究科 生化学分子生物学講
座 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. van der Sluijs, K.F., van Elden, L.J.R.,
Nijhuis, M., Schuurman, R., Florquin,
S., Shimizu, T., Ishii, S., Jansen, H.M.,
Lutter, R., and van der Poll, T. (2006)
Involvement of the platelet activating
factor receptor in host defense against
Streptococcus pneumoniae during
postinfluenza pneumonia. **Am. J.
Physiol.** 290, L194-L199.

2. Doi, K., Okamoto, K., Negishi, K.,
Suzuki, Y., Nakao, A., Fujita, T., Toda,
A., Yokomizo, T., Kita, Y., Kihara, Y.,
Ishii, S., Shimizu, T., and Noiri, E.
(2006) Attenuation of folic
acid-induced renal inflammatory injury
in platelet-activating factor
receptor-deficient mice. **Am. J. Pathol.**
168, 1413-1424.

3. Schaefer, M.B., Ott, J., Mohr, A., Bi,
M.H., Grosz, A., Weissmann, N., Ishii,
S., Grimminger, F., Seeger, W., and
Mayer, K. (2007) Immunomodulation
by n-3- vs. n-6-rich lipid emulsions in
murine acute lung injury – role of
platelet-activating factor receptor. **Crit.
Care Med.**, 35, 544-554.

4. Yanagida, K., Ishii, S.
(correspondence), Hamano, F.,
Noguchi, K., and Shimizu, T. (2007)

LPA₄/p2y₉/GPR23 mediates
Rho-dependent morphological changes
in a rat neuronal cell line. **J. Biol.
Chem.**, 282, 5814-5824.

和文総説

1. 石井 聡 (2004) 「ロイコトリエン」とは? Q&A でわかるアレルギー疾患 2, 161-162.

2) 学会発表

1. ○Keisuke Yanagida, Satoshi Ishii,
Kyoko Noguchi, Fumie Hamano and
Takao Shimizu “LPA₄/p2y₉/GPR23
mediates morphological changes in rat
neuronal cell line”, 20th IUBMB
International Congress of Biochemistry
and Molecular Biology and 11th
FAOBMB Congress, Kyoto, Japan,
(June 18-23, 2006).
2. ○Yasuyuki Kihara, Yoshihiro Kita,
Satoshi Ishii and Takao Shimizu
“Arachidonic acid cascade in the
animal model of multiple sclerosis”,
20th IUBMB International Congress of
Biochemistry and Molecular Biology
and 11th FAOBMB Congress, Kyoto,
Japan, (June 18-23, 2006).

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

研究成果の刊行に関する一覧

英文原著

1. Yamaguchi Y, Nagase T, Tomita T, Nakamura K, Fukuhara S, Amano T, Yamamoto H, Ide Y, Suzuki M, Teramoto S, Asano T, Kangawa K, Nakagata N, Ouchi Y, Kurihara. β -defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Jan 10; in press
2. Yamamoto H, Nagase T, Shindo T, Aoki-Nagase T, Nakamura K, Yamaguchi Y, Hanaoka Y, Kurihara H, Ouchi Y. Adrenomedullin insufficiency increases allergen induced airway hyperresponsiveness in mice. *J Appl Physiol* (in press).
3. van der Sluijs, K.F., van Elden, L.J.R., Nijhuis, M., Schuurman, R., Florquin, S., Shimizu, T., Ishii, S., Jansen, H.M., Lutter, R., and van der Poll, T. (2006) Involvement of the platelet activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. *Am. J. Physiol.* 290, L194-L199.
4. Doi, K., Okamoto, K., Negishi, K., Suzuki, Y., Nakao, A., Fujita, T., Toda, A., Yokomizo, T., Kita, Y., Kihara, Y., Ishii, S., Shimizu, T., and Noiri, E. (2006) Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 168, 1413-1424.
5. Schaefer, M.B., Ott, J., Mohr, A., Bi, M.H., Grosz, A., Weissmann, N., Ishii, S., Grimminger, F., Seeger, W., and Mayer, K. (2007) Immunomodulation by n-3- vs. n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury – role of platelet-activating factor receptor. *Crit. Care Med.*, 35, 544-554.
6. Yanagida, K., Ishii, S. (correspondence), Hamano, F., Noguchi, K., and Shimizu, T. (2007) LPA₄/p2y₉/GPR23 mediates Rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J. Biol. Chem.*, 282, 5814-5824.

和文総説

1. 長瀬隆英. COPD ガイドラインを高齢者にどう生かすか. 日本老年医学会雑誌 43: 602-603, 2006.
2. 長瀬隆英. 明らかになったわが国の COPD 患者数. *Medical Practice*. 23: 955-957, 2006.
3. 長瀬隆英. COPD の薬物療法 – ガイドラインに基づく治療. *医学のあゆみ* 218: 1011-1014, 2006.

4. 長瀬隆英. COPD に対する新薬の可能性. 総合臨床 55: 2439-2440, 2006.
5. 長瀬隆英. 22 世紀へむけた呼吸器学研究フロンティア. 呼吸と循環 54: 1277, 2006.

β -defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice

Yasuhiro Yamaguchi^{1,3,4}, Takahide Nagase², Tetsuji Tomita¹, Kyoko Nakamura⁴,
Shigetomo Fukuhara⁴, Tomokazu Amano³, Hiroshi Yamamoto¹, Yukie Ide⁵,
Misao Suzuki⁶, Shinji Teramoto¹, Tomoichiro Asano³, Kenji Kangawa⁷,
Naomi Nakagata⁵, Yasuyoshi Ouchi¹, Hiroki Kurihara^{3,4}

¹Department of Geriatric Medicine, ²Department of Respiratory Medicine, and
³Department of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, and ⁴Division of Integrative Cell
Biology, Department of Embryogenesis, Institute of Molecular Embryology and
Genetics, and ⁵Division of Reproductive Engineering, and ⁶Division of Transgenic
Technology, Center for Animal Resources and Development, Kumamoto University,
Kumamoto-shi, Kumamoto, Japan, and ⁷Department of Biochemistry, National
Cardiovascular Center Research Institute Suita-ku, Osaka, Japan

abbreviated title : β -defensin-induced muscle degeneration

Corresponding to Yasuyoshi Ouchi

Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine,

The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

TEL 81-3-5841-3498, FAX 81-3-5684-4958, E-mail: youchi-tyky@umin.ac.jp

Abstract

Defensins comprise a family of cationic antimicrobial peptides characterized by the conserved cysteine residues. They are produced in various organs including skeletal muscle, and are identified as key elements in the host defense system as potent effectors. At the same time, defensins have potential roles in the regulation of inflammation and, furthermore, can exert cytotoxic effects on several mammalian cells. Here, we developed transgenic mice overexpressing mouse β -defensin-6 to explore the pathophysiological roles of defensin family as a novel mediator of inflammatory tissue injury. Unexpectedly, the transgenic mice showed short life-span, poor growth, and progressive myofiber degeneration with the functional muscle impairment, predominant centronucleated myofibers and elevated serum creatine kinase activity, as seen in human muscular dystrophy. Furthermore, some of the transgenic myofibers showed I κ B α accumulation, which would be related to the myofiber apoptosis of Limb-girdle muscular dystrophy type 2A. The present findings may unravel a concealed linkage between the innate immune system and the pathophysiology of degenerative diseases.

Keywords

muscular dystrophy, innate immunity, NF- κ B

Introduction

Antimicrobial peptides have emerged as a part of the host defense mechanism in animals and plants (1, 2). Defensins comprise a family of mammalian cationic antimicrobial peptides, and α -, β -, and θ -defensin subfamily exist, which conserve 3 specific disulfide pairings. They are produced by leukocytes and various types of epithelial cells constitutively or in response to microbial signals and inflammatory cytokines (3-7).

While immune response is indispensable for the survival of humans, the chronic inflammatory response is harmful and leads to various common disorders. In addition to the potent antimicrobial effects, defensins could act on diverse immune cells and epithelial cells through CCR6, Toll-like receptor 4 (TLR4) or other mechanisms, regulating the whole immune response (8-13). Furthermore, they exert cytotoxic effects on mammalian cells themselves (14). α -defensin causes cell lysis of variable cultured cells through the permeabilization of cell membrane (15) and subsequent DNA injury (14, 16). Although little evaluation had been reported as for β -defensin cytotoxicity (13, 17), treatment of mouse blastocysts with human β -defensin-2 (hBD-2) led to their degeneration and death (18). So, some participation of defensin family would be likely in the pathogenic immune response of various diseases (19).

Recently, we identified mouse β -defensin-6 (mBD-6), a β -defensin subfamily member expressed in skeletal muscle (20). mBD-6 expression was also augmented by bacterial endotoxin, maybe under the regulation of NF- κ B pathway like hBD-2 and mouse β -defensin-3 (21). To explore the novel effects of this molecule, we generated transgenic mice overexpressing mBD-6 constitutively. Here, we show that the dysregulated β -defensin expression resulted in extensive myofiber degeneration, reminiscent of human muscular dystrophy.

Muscular dystrophy is an inherited disorder characterized by progressive muscle degeneration. The most common form, Duchenne muscular dystrophy, is caused by the mutations in dystrophin gene, and other causative molecules like dystroglycan and sarcoglycan organize dystrophin-glycoprotein-complex binding to laminin (22-24). Another form of muscular dystrophy, Limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A), has proved to be due to the defects of calpain 3, a proteolytic enzyme (25-27). While the identification of responsible genes for muscular dystrophy has improved, the pathogenic mechanisms are not clear enough to date. Multiple factors, including immune response, are related to the pathophysiology of muscular dystrophy (28). The present finding may give a clue to the novel involvement of innate immunity in degenerative diseases like muscular dystrophy.

Materials and Methods

Generation of transgenic mouse

The transgene was constructed by inserting the mBD-6 cDNA 3' downstream to the chicken β -actin promoter in the pCAGGS plasmid (Gift from J. Miyazaki) (29). The excised transgene was microinjected into fertilized C57BL6/J mouse oocytes. The genomic DNA was isolated from the mice tail and was analyzed by Southern blotting and/or PCR. On Southern blot analysis, the genomic DNA was digested with Bgl II, resolved on 1.0% agarose gel, and transferred to the membrane. A 250-bp fragment containing 2nd exon of mBD-6 was labeled by [³²P]dCTP using a random primed DNA labeling kit (Roche). The labeled probe was hybridized to the membrane using ExpressHyb (Clontech). PCR was performed using the primers spanning mBD-6 cDNA (forward primer: 5'-GGTTATTGTGCTGTCTCATC-3'; reverse primer: 5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3'). The PCR condition was 94 °C for 40 sec, 60 °C for 30 sec, 72 °C for 60 sec, carried out for 35 cycles. The one line, Tg(CAG-mBD6)1 mice were maintained on ICR mice, and the other line, Tg(CAG-mBD6)2 mice were maintained on C57BL6/J mice. The immunohistochemical analysis was performed on Tg(CAG-mBD6)1 mice after backcrossed to C57BL6/J strain. Animal care and use in