

## B. 研究方法

### 1) mBD-6 過剰発現マウスの作製

我々は、mBD-6 遺伝子の開始コドンの前に kozak シークエンス を連結した DNA プライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3') と、mBD-6 遺伝子の 3' 端非転写領域に作製したプライマー (5'-TGTGCATATTCACGAAGAAG-3') を用いて、mBD-6 cDNA を増幅した。

得られた mBD-6 cDNA を、pCAGGS ベクターに挿入した。このベクターでは、挿入された mBD-6 遺伝子は、human cytomegalovirus immediate-early enhancer とそれに続く chicken  $\beta$ -actin promoter により駆動される。chicken  $\beta$ -actin の第一エクソンおよびイントロンに続いて、mBD-6 cDNA が位置し、mBD-6 自身のストップコドンの後、rabbit  $\beta$ -globin poly(A) sequence が、その下流に位置するように設計されている (図 1)。

上記より作製したトランスジーンを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた。これらの操作は、熊本大学動物資源開発研究センターとの共同で行われた。

2 系統において、次世代への遺伝が確認されたが、一方の系統 Tg1 マウスは、ICR および C57BL6/J で維持し、もう一方の系統 Tg2 マウスは、C57BL6/J で維持した。

### 2) RT-PCR

外来遺伝子の発現を確認するために、変異マウスとその同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体

窒素にて凍結した。これらの組織の全 RNA は、ISOGEN (Nippon gene) を用いてプロトコールに従い抽出した。抽出した 5  $\mu$ g の RNA をランダムプライマーにより superscript II (Invitrogen) を用いて逆転写した。PCR のプライマーとして、mBD-6 cDNA 上にセンスプライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3')、rabbit  $\beta$ -globin 上にアンチセンスプライマー (5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3') を作製した。real-time PCR を、Fluorescent Quantitative Detection System Version 3.02 (LineGene) を用いて施行した。

### 3) 筋組織からのペプチドの抽出とウエスタンブロット

変異マウスとその野生型同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体窒素にて凍結した。組織 100mg あたり、1ml の ISOGEN (Nippon gene)

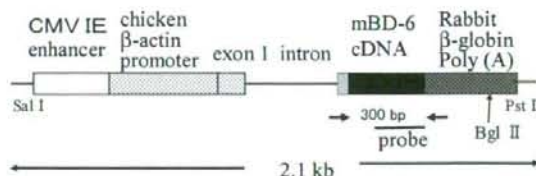


図 1 トランスジーン構成。

mBD-6 を過剰発現するために、pCAGGS ベクターを利用した。

CMV IE enhancer;  
cytomegalovirus immediate-early enhancer

を用いて筋組織をホモジナイズした後、プロトコールに従い蛋白を抽出した。抽出した蛋白のペレットから、0.5% 酢酸水に4℃下、一晩で溶出した成分を10% アンモニア水で中和した。上記サンプルをトリシン SDS-PAGE を用いて分離し、PVDF膜にトランスファーした。一次抗体として、mBD-6 抗血清と4℃、一晩反応させ、洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG 抗体 (ICN) と室温にて一時間反応させ、シグナルは、ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

#### 4) マウス筋組織標本の作製

ジエチルエーテル吸入により麻酔したマウスの腹部大動脈より全血を採血した後、骨格筋を切り出した。切り出した骨格筋は、水で練ったトラガカントゴムを用いて、小コルク片に固定した後、液体窒素により冷却したイソペンタン内で急速に凍結した。この組織標本から、クライオスタット内で、厚さ10µmの切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) は、型通りに施行した。

#### 5) マウス骨密度の測定

マウスの大腿骨を摘出し、骨量、骨密度をpQCT骨密度測定装置により計測した。

#### 6) マウス尿中8-OHdGの測定

マウスの尿を採取後、3000回転5分遠心し、上清の8-OHdG濃度を高感度8-OHdG Check ELISA (日本老化制御研究所) を用いて測定した。尿中クレアチニンは、SRLにて測定した。尿中8-OHdG濃度を尿中クレアチニン濃度でわることにより補正した値を、DNAの酸化損傷の指標とした。

#### 7) defensin 合成ペプチド

hBD-1, hBD-2, hBD-3 および HNP-1の合成ペプチドは、ペプチド研究所より購入し、0.001% 酢酸溶液に2mg/mlの濃度で溶解した。

hBD-3のマウスホモログであるmBD-14のシグナルペプチド切断部位を、hBD-3から類推し、C端より45残基からなるペプチドをペプチド研究所にて化学合成した。3つのジスルフィド結合を空気酸化の手法で合成し、合成物の逆相高速液体クロマトグラフィーにてシングルピークを確認し、最終産物を質量分析により確認した。mBD-14合成ペプチドは、0.01%酢酸溶液に20mg/mlの濃度で溶解した。培養細胞に投与する実験においては、さらに滅菌蒸留水にて10倍に希釈して利用した。

#### 8) 細胞培養

ヒト肺癌由来のA549細胞は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより購入した。細胞は、25U/mlペニシリン、25µg/mlストレプトマイシン (Invitrogen) および、10% (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清(FCS)を含むDMEM培地にて培養した。

マウス肺癌由来のLewis lung carcinoma細胞(LLC)細胞は、RIKENバイオリソースセンターより購入した。細胞は、同様に、25U/mlペニシリン、25µg/mlストレプトマイシン (Invitrogen) および、10% (v/v) FCSを含むDMEM培地にて培養した。

#### 9) ヨウ化プロピジウム(PI)による染色

細胞膜傷害による細胞死を観察するために、培地をpropidium iodide (PI) と

Hoechst 33342 を含む DMEM 培地に置換して染色した。死細胞の割合は、培養皿中央の  $0.43\text{mm}^2$  内の PI 陽性細胞を、同視野で、Hoechst 33342 に染まる核の総数で割ることにより判定した。

#### 10) P2X 受容体の阻害

我々は、hBD-3 の細胞膜傷害に対する P2X 受容体拮抗薬の影響を検討した。PPADS 存在下で細胞を 2 時間培養した後、hBD-3 の効果を評価した。

#### 11) LDH 活性の測定

hBD-3 を含む HEPES buffer 溶液(140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.25mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5mM HEPES, 11 mM glucose, 0.2% bovine serum albumin, pH 7.4) 下で A549 細胞を 45 分培養した後、上清の LDH 活性を測定した。LDH 活性の測定には、LDH-Cytotoxic Test (Wako, Osaka-shi, Japan)を使用した。

#### 12) 細胞総数の測定

$3.38\text{cm}^2$  の well 中に  $1 \times 10^5$  個/ml の A549 細胞懸濁液 1ml を、上記の hBD-3 合成ペプチド、あるいは相当量の 0.001 % 酢酸溶液を含む培地で培養した。48 時間後、トリプシン/EDTA 溶液にて細胞を剥離し、10 % (v/v) FCS を含む DMEM 培地にて細胞を回収し、直ちに、その細胞懸濁液中の細胞数を測定した。細胞数の測定には、コールター・カウンター (ベックマン・コールター株式会社)を使用した。

#### 13) マウスへの腫瘍細胞の接種と、mBD-14 合成ペプチドの持続皮下投与

生後 3 ヶ月の雄の C57BL/6J マウスを

ケタミンおよびキシラジンにて麻酔後、背部の皮下に  $1 \times 10^6$  個の LLC 細胞を接種した。9 日後に、ケタミンおよびキシラジンにて麻酔後、皮下の腫瘍塊の触知を確認し、その後、腫瘍塊近傍の背部皮下に 4.17 mg/ml の mBD-14 合成ペプチド含有 PBS を充填した持続投与ポンプあるいは、相当量の 0.01% 酢酸含有 PBS を充填した持続投与ポンプを埋め、10 日後に腫瘍を摘出し、重量を測定した。持続投与ポンプとしては、ALZET MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2002 (DURECT) を用いた。本ポンプでは、 $0.5\mu\text{l/h}$  の流速で、充填した溶液が皮下に投与されるため、 $50\mu\text{g/日}$  の mBD-14 合成ペプチドが皮下に投与される。

#### 14) ADM 遺伝子改変マウス

ADM 遺伝子欠損マウスは Shindo らによって確立された。本マウスにおいては、proadrenomedullin gene の exon1、2、3、および exon4 の一部が、ネオマイシン耐性遺伝子に置換されている。本マウスを C57/BL6 系に 5 回以上 backcross した後に実験に供した。遺伝子型は生後 4 週に PCR 法により確認した。マウスは室温  $23^\circ\text{C}$ 、自動明暗サイクル用照明にて管理した。実験には、8~12 週齢の ADM 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体とその野生型同腹子を用いた。実験に供したマウスの体重は以下のとおりであり、各群間で有意な差はなかった。[saline-treated  $AM^{+/+}$ ,  $30.18 \pm 0.76$  g; saline-treated  $AM^{+/-}$ ,  $30.36 \pm 0.82$  g; OVA-treated  $AM^{+/+}$ ,  $29.00 \pm 1.28$  g; OVA-treated  $AM^{+/-}$ ,  $29.79 \pm 0.79$  g]

## 15) 気管支喘息モデルマウスの作製

アレルギー性気管支喘息モデルとして、卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)による抗原感作、吸入負荷を施行した。抗原感作として、実験第 1 日目および第 8 日目に、aluminum hydroxide (2mg/ml)を含む生理食塩水に溶解した OVA 0.1mg を 0.5ml 腹腔内に投与した。第 13 日目、第 14 日目、1%OVA 溶液を 60 分間、18×11×11cm のプラスチック製容器内で吸入させた。なお、コントロール群には、同様の方法で saline を腹腔内投与、および吸入させた。実験第 15 日目に、気道過敏性試験、気管支肺胞洗浄液の採取、肺組織の採取などを施行した。

## 16) 肺抵抗・肺エラスタンスの測定

pentobarbital sodium 25mg/kg、ketamine hydrochloride 25mg/kg を腹腔内投与することによりマウスを麻酔し、また筋弛緩を得るために pancuronium bromide 0.3mg/kg の腹腔内投与を行った。マウスの前頸部を皮切して気管前面を露出した後、気管を切開し、内径 1mm、長さ 8mm の金属カニューラを挿入して気道を確保した。このカニューラを小動物用人工呼吸器(model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA)の回路に接続した。呼吸条件として、一回換気量 10ml/kg、換気回数 150/分、PEEP 2cmH<sub>2</sub>O、FIO<sub>2</sub> 1.0 を用いた。続いて腹壁を切開し、両側の横隔膜を広範囲に開窓、開胸した。実験中、マウスの体温を維持するために heating pad を用いた。気管カニューラの側孔に接続した piezoresistive microtransducer (Endevco 8510B-2, San Juan Capistrano, CA)を用いて気道内圧(Ptr)

を、また Fleisch pneumotachograph (model no. 00000, Metabo SA, Lausanne, Switzerland)にて気流( $\frac{dV}{dt}$ )を、それぞれ測定した。換気

量(V)は気流値( $\frac{dV}{dt}$ )の積分により算出した。解析ソフトは ANADAT 5.1 (Montreal, Canada)を用いた。

## 17) メサコリンによる非特異的気道反応性の検討

非特異的気道収縮アゴニストである methacholine (MCh) を aerosol 吸入投与し、反応性を検討した。1 回換気量の 3 倍量の深吸気を 2 回行わせた後、超音波ネブライザー(Ultra-Neb100, DeVilbiss, Somerset, PA)を用いて aerosol を作製し、吸入ラインより投与した。はじめに baseline 測定として saline 吸入を 2 分間行った。吸入終了 1 分後から 10 秒間の tidal ventilation の間に気道内圧、気流をサンプリングした。引き続いて、MCh 吸入負荷(0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/ml) をそれぞれの吸入濃度について 2 分間ずつ行い、吸入終了 1 分後から 10 秒間の tidal ventilation の間に気道内圧、気流を同様にサンプリングした。なお、肺抵抗が baseline の 2 倍に増加するのに要する MCh 濃度を EC<sub>200</sub>R<sub>L</sub> と定義し、気道反応性の指標とした。

## 18) 気管支肺胞洗浄液の採取と解析

マウスを深麻酔下で脱血死させた後、気管カニューラより PBS 1ml を 5 回注入・回収した。得られた気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) (おのおの 4.5ml, 回収率 90%) を、遠心分離(450g,

10 分間)し、細胞成分より細胞数・細胞分画を測定した。上清の蛋白濃度は、Bradford 法により測定した。

#### 19) 気管支肺胞洗浄液の生化学的評価

BALF の IgE 濃度は、精製抗マウス IgE capture モノクローナル抗体(mAb) (BD PharMingen)を PBS で 2 $\mu$ g/ml に調製し、ELISA plate(Corning Glass Works, Corning, NY)を用いて、IgE に対する ELISA plate を作製し、スタンダードおよび BALF サンプルと反応させた後、精製ビオチン化抗マウス IgE 抗体、ペルオキシダーゼ結合 streptoavidin、発色基質を反応させ、波長 405nm における吸光度を測定した。

BALF 中の Cys-leukotriene (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>)は、EIA kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) を用いて測定した。同様に BALF 中の IL-4, 5, IFN- $\gamma$ , IL-13 を ELISA kit (Pierce Biotechnology, Inc.あるいは Genzyme TECHNE) を用いて測定した。

#### 20) 血清 OVA 特異的 IgE 抗体の測定

OVA 特異的 IgE 測定は前述の IgE 測定と同様に行った。すなわち、精製抗マウス IgE capture モノクローナル抗体(mAb) (BD PharMingen)を ELISA plate(Corning Glass Works, Corning, NY)に載せ吸着させた。スタンダードおよび血清サンプルを反応させた後、精製ビオチン化 OVA を反応させ、ペルオキシダーゼ結合 streptoavidin、発色基質により測定した。

#### 21) 血清 OVA 特異的 IgG1 抗体の測定

OVA を ELISA plate(Corning Glass Works, Corning, NY)に載せ吸着させた。スタンダードおよび血清サンプルを反応させた後、HRP-conjugated anti-mouse IgG1 (BD PharMingen) を反応させ、発色基質により測定した。

#### 22) 肺組織のサンプリング

深麻酔下でマウスを脱血死させた後、肺を摘出した。摘出した肺は用手的に 20cmH<sub>2</sub>O 圧の気道内陽圧をかけて拡張し、一方の肺の主気管支を絹糸で結紮した。摘出した拡張肺は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋したブロックを sagittal slice、4 $\mu$ m 厚に薄切し、組織標本を作製した。もう一方の摘出肺は、-80°C で凍結し、肺組織中の adrenomedullin 量測定に供した。

#### 23) 肺組織標本の形態学的解析

肺組織標本に対して、好酸球浸潤の程度を評価するために Luna 染色を、気道分泌・杯細胞の多寡を評価するために PAS と Alcian Blue の重染色を行った。好酸球浸潤の程度、気道過分泌・杯細胞の増生の程度について半定量的に評価するために、各染色による陽性細胞の数を 0-3 (0=none to 3=abundant)に分けて顕微鏡下にスコアリングを行った。スコアリングは 2 人の実験者により盲検法で行った。なお、本スコアリングの手法を検証したところ、実験者の間(inter)でも、あるいはスコアリングの施行間(intra)においても、variance は 5%未満であり、有意ではなかった。

さらに得られた組織標本に対して Masson's trichrome 染色を行い、気道の形態学的解析を行った。全てのスライドを光学顕微鏡下にくまなく観察し、膜性細気管支のみを注意深く抽出した。これらをデジタル写真に収め、解析に用いた。各々の関心領域を digitizing tablet を用いてコンピューター上に入力し、各種の測定を Image J software (version 1.37v, National Institutes of Health, USA)を用いて行った。測定は以下について施行した。

1) 基底膜周囲長 : Pbm

基底膜が取り囲む領域の面積 : Abm

2) 平滑筋層の外周囲長 : Psm

平滑筋層の外縁で取り囲まれる領域  
の面積 : Amo

3) 気道の内周縁長 : Pi

気道内腔の面積 : Ai

4) 上皮細胞層の面積 : Ae = Abm - Ai

平滑筋層の面積 : Asm = Amo - Abm

サンプリングした気道のサイズを標準化  
するために Abm で除した値 Ae/Abm,  
Asm/Abm, Ai/Abm を気道領域の面積とし  
て解析に用いた。

5) 気道長径 : DL および気道短径 : Ds  
また、以下の条件を満たすすべての気道は  
除外した(78/144)。

Ds/DL < 0.6, 境界不鮮明

結果、144 個中 66 個の気道を解析に用いる  
ことにした。極力細胞外基質を除外する  
ため、気道平滑筋層の外縁は精確に追跡  
し、途中で途絶している場合には滑らかに  
基底膜面まで追跡した。この途絶部分の長  
さが Pbm の 10%を超える場合にはこの気  
道断面を評価の対象から除外した。同様の  
方法を用いて、免疫組織学的染色を行った  
標本に対しても評価を行った。

#### 24) $\alpha$ -smooth muscle actin の免疫組織染色

気道平滑筋を正確に同定するために  
 $\alpha$ -smooth muscle actin に対する免疫染色を  
行った。組織標本を脱パラフィン、水和処  
理後、pH6.0 に調製した 0.01M のクエン酸  
バッファーに浸して 121°C で 15 分間加圧熱  
処理し抗原を賦活化した。一次抗体とし  
て、抗マウス  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体  
(DAKO Cytomation) を用い、  
ENVISION+<sup>TM</sup>/HRP kit for Mouse (DAKO

Cytomation, Cat. K4000, CA) と反応させ、さ  
らに正常マウス血清と 60 分間反応させた。  
この反応生成物を組織標本にアプライし、  
3,3'-diaminobenzidine (DAB) で発色させ  
た。コントロールとして、マウス IgG2a 陰  
性コントロール(DAKO Cytomation, Cat.  
X0943, CA)を用いて同様の反応を行った。

#### 25) 統計

ADM に関する実験データの解析には  
one-way ANOVA または nonparametric  
Kruskal-Wallis test を用いた。検定は有意水  
準 5%で行った。誤差は標準誤差(standard  
error: SE)により表記した。データの  
management のために Microsoft Excel 2003  
を、統計学的解析のため、Dr. SPSS II (SPSS  
Japan Inc., version 14.0, Japan) を用いた。

(倫理面への配慮)

実験動物であるマウスに無用な苦痛を  
与えないように十分に配慮した。実験は、  
深麻酔下で施行し、頸椎脱臼もしくは深麻  
酔下での放血や全採血により安楽死をえ  
た。本実験は、東京大学動物実験実施規則  
および東京大学動物実験実施マニュアル  
に準じている。

また、ケタミンの使用については、麻薬  
研究者免許証を取得しており、適正な使用  
のもと、東京都知事に使用量を届け出ている。

#### C. 研究結果

##### 1) 遺伝子改変マウスの作製

6 匹の F0 マウスにおいて、PCR 法およ  
びサザンプロット法により、トランスジ  
ーンの挿入が確認され、2 系統において、  
次世代への遺伝が確認された。

サザンプロット法により、一方の系統で  
は、トランスジーンが複数含まれているこ

とが予想され、もう一方の系統では、トランスジーンが1コピー含まれていることが予想された。ここでは、これらの遺伝子改変マウスを、順に、Tg1 マウス、Tg2 マウスと呼ぶことにする。

## 2) Tg マウスにおける mBD-6 過剰発現の解析

トランスジーンを発現を、Tg マウスの骨格筋より抽出した全 RNA を用いて RT-PCR 法により確認した。トランスジーンを特異的に増幅するプライマーを用いることにより、Tg マウスのいずれの系統においても、トランスジーンが骨格筋に発現していることが確認された。ゲノム上のコピー数に相関して、Tg1 マウスでの発現量は、Tg2 マウスの 3.4 倍であった。

次に、我々は、蛋白レベルでの mBD-6 量を確認するために、等量の骨格筋より抽出した蛋白をウエスタンブロットし、mBD-6 抗血清により解析した。図 2 のように Tg マウスにおいてのみ、mBD-6 ペプチドを検出することができ、発現の上昇が蛋白レベルで確認された。しかし、Tg1 マウスに比較して、Tg2 マウスでのシグナルは非常に弱く、mBD-6 の発現は、やはり Tg1 マウスにて有意に高いことが示された。

## 3) Tg1 マウスの低体重

出生時から生後 20 日後まで、Tg1 マウスと野生型の同腹仔との間に外見上の相違は認められなかった。しかし、生後 6 週間頃には、Tg1 マウスの低体重が認められるようになり、生後 8 週での平均体重は、野生型の同腹仔に比べて、有意に小さく、その約 80% であった (図 3)。加齢に伴い、野生型では体重増加を続けるが、Tg1 マウスでは、体重増加が認められなかった。

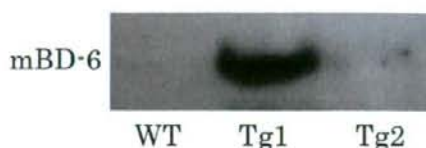


図 2. ウエスタンブロットによる mBD-6 ペプチド過剰発現の確認. Tg マウスの骨格筋より抽出した蛋白中に、4 kD の mBD-6 ペプチドが検出された。しかし、Tg2 マウスの mBD-6 量は、Tg1 マウスに比べて非常に少なかった。

## 4) Tg1 マウスの寿命の短縮

C57BL6/J をバックグラウンドに維持した Tg1 マウスの寿命を記録した (図 4)。Tg1 マウスの寿命は、野生型の同腹仔と比較して有意に短く、ほぼすべてのマウスが生後一年以内に死亡した。著明な体重減少以外に、癌などの特定の死因は認められず、老衰ともいべき状態であった。

Tg2 マウスは、1 年以上生存した。

## 5) Tg1 マウスの筋病変

興味深いことに、生後 6 ヶ月の Tg1 マウスでは、進行性の円背が認められた (図 5)。このような所見は、マウスにおける筋力低下の特徴的な所見である。

生後 3 ヶ月の Tg1 マウスの骨格筋の HE 染では、筋線維の多くは、中心核線維に置換され、円形化し、大小不同も目立ち、肥大線維はしばしば分割して、いわゆる fiber splitting の所見を示した。さらに、エオジンに淡染する壊死線維や単核細胞の集簇巣が散在し、塩基性の再生線維も認められた (図 6)。これらの特徴は、調べたすべての骨格筋、すなわち、横隔膜、頸部の筋、背部の筋に共通して認められた。

一方、Tg2 マウスは、生後 6 ヶ月ころまで、骨格筋の病理像において明らかな異常

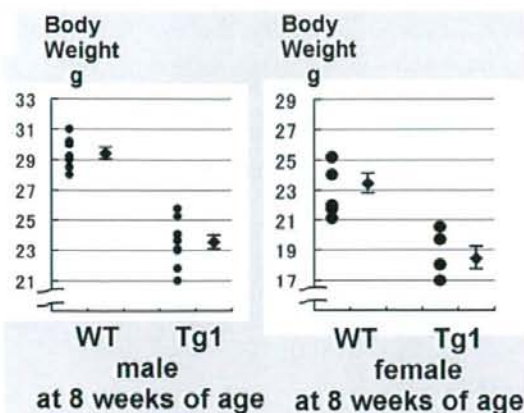


図 3. Tg1 マウスの低体重。

生後 8 週の Tg1 マウスの体重を野生型同腹仔(WT)と比較して、有意に軽い ( $p < 0.01$ )。

は認められなかった。しかし、生後 1 年の Tg2 マウスでは、少数の淡染する変性線維が認められた。また、生後 1 年の Tg2 マウスの腓腹筋において、同年齢の野生型マウスと比較して有意に多い中心核線維が認められた ( $2.5 \pm 0.5\%$  vs.  $0.2 \pm 0.1\%$ ) ( $p < 0.01$ )。

#### 6) Tg マウスの骨密度

生後 3 ヶ月の Tg1 マウスの大腿骨の骨密度は、平均して♂  $0.0451 \text{ g/cm}^2$ 、♀  $0.0424 \text{ g/cm}^2$  であり、野生型の同腹仔の骨密度、♂  $0.0647 \text{ g/cm}^2$ 、♀  $0.0590 \text{ g/cm}^2$  と比較して、有意に低値であった ( $p < 0.01$ ) (図 6)。

#### 7) Tg1 マウスの尿中 8-OHdG

defensin 過剰発現マウス DNA の酸化損傷を評価するために、生後 3 ヶ月の Tg1 マウスの尿中 8-OHdG を測定した。尿中クレアチニン補正した尿中 8-OHdG は有意に上昇しており、酸化ストレスの増強が示された(図 7)。

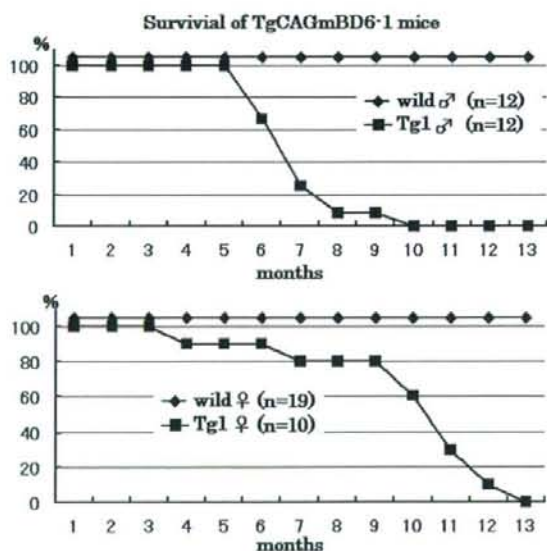


図 4. TgCAGmBD6-1 マウスの生存曲線。

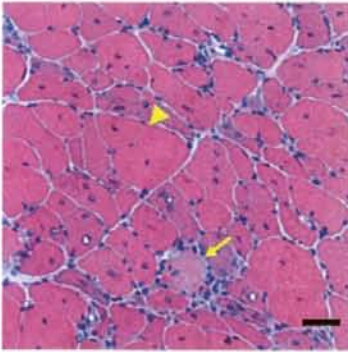
TgCAGmBD6-1 マウスの寿命は、野生型の同腹仔と比較して有意に短く、一年以内にほぼすべてのマウスが死亡した。



図 5. Tg1 マウスの円背

生後 6 ヶ月の Tg1 マウスは、進行性の円背を示した。





Tg1, 6 months

図 5. Tg1 マウスの筋線維変性の進行  
生後 6 ヶ月の Tg1 マウスの下肢筋の HE 染色。中心核線維が増加し、筋線維の大小不同、fiber splitting (矢頭) も認められた。Scale Bars: 40  $\mu$ m

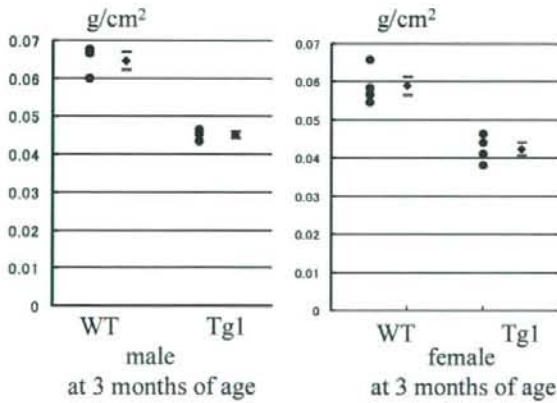


図 6. Tg1 マウスの骨密度低下  
TgCAGmBD-6-1 (Tg1) マウスの大腿骨の骨密度は、野生型の同腹仔と比較して有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。

### 8) hBD-3 の細胞膜傷害性

我々は、短時間の hBD-3 刺激による細胞膜の傷害を PI 染色により評価した。10 分間の hBD-3 刺激により、多くの A549 細胞で、PI の取り込みが認められ、急性の細胞膜傷害を示す所見がえられた。PI 陽性細胞の割合は、hBD-3 濃度に比例して直線的に増加した。70  $\mu$ g/ml 以上の hBD-3 では、統計学的に有意な差をもって細胞傷害性が示された(図 8)。

hBD-3 の細胞傷害性を他のヒト defensin と比較すると、hBD-3 の細胞傷

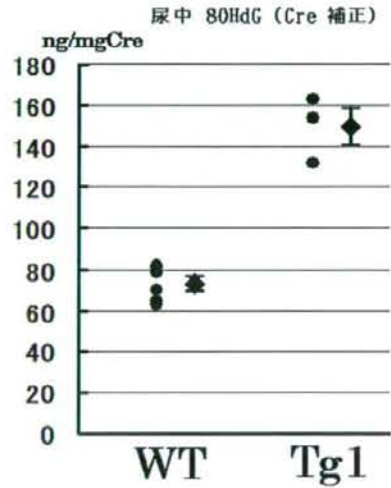


図 7. 生後 3 ヶ月の Tg1 マウスの尿中 8OHdG  
生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの尿中 8OHdG を測定した。尿中クレアチニン補正した尿中 8OHdG は有意に上昇しており、酸化ストレスの増強が示された。

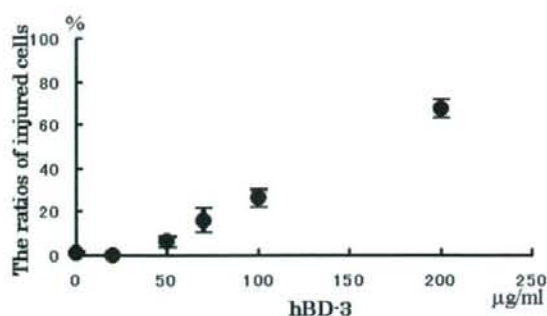


図 8. 10 分間の hBD-3 刺激後の PI 取り込みと hBD-3 濃度依存性

10 分間の hBD-3 刺激により、多くの A549 細胞において PI 取り込みが惹起された。injured cells の割合は、Hoechst 33342 により染まる核全体のなかで、PI 陽性の細胞の割合を示す。その割合は、hBD-3 の濃度に比例して直線的に増加した。

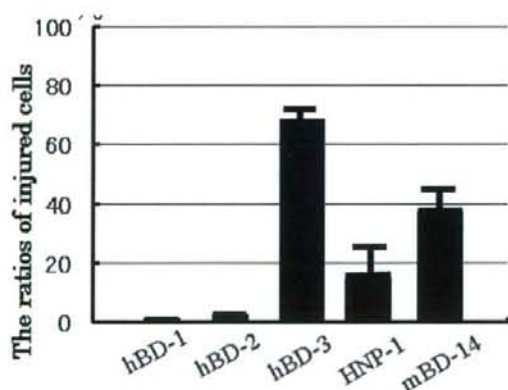


図 9. ヒト defensin (200 µg/ml) の細胞傷害性の比較

hBD-3 の細胞傷害性は、他のヒトβ-defensin や HNP-1 よりも有意に強かった。hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 もまた、著明な細胞傷害を惹起した。

害性は、既に報告のある HNP-1 と比較しても有意に強かった。hBD-1 や hBD-2 では、200 µg/ml の濃度においても、PI 陽性細胞は惹起されなかった。また、hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 は、hBD-3 と同様の強い細胞傷害性を示した (図 9)。

#### 11) hBD-3 の細胞傷害性に対する P2X 受容体拮抗薬の影響

hBD-3 の細胞傷害性の分子機序を検討するために、我々は、P2X 受容体に注目した。A549 細胞から抽出した mRNA の RT-PCR により P2X3、P2X4、P2X5 受容体の発現が認められた。

定量的な評価のために、hBD-3 と 45 時間共培養の後、上清の LDH 活性を測定した。P2X 受容体の拮抗薬である PPADS の存在下では、100 µg/ml の hBD-3 による LDH release が、有意に抑制されることが確認された (図 10)。

#### 12) 低濃度 hBD-3 の抗腫瘍効果

次に、より低濃度の hBD-3 に長時間暴露することによる、A549 細胞への影響を評価した。

20 µg/ml の hBD-3 存在下で、10% (v/v) FCS 含有培地で培養し、12 時間後に評価したところ、コントロールと比較して、有意な PI 陽性細胞の惹起が認められた (図 11)。

さらに、5 µg/ml あるいは、20 µg/ml の hBD-3 添加培地で 48 時間、培養した A549 細胞の総細胞数も有意に少ないことが確認された (図 12)。

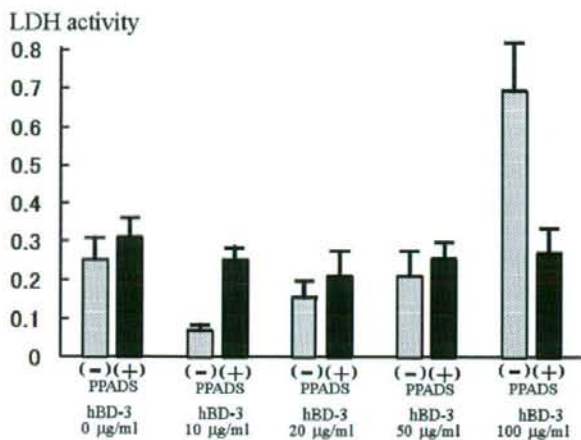


図 10. hBD-3 による培養上清 LDH 活性上昇の測定

hBD-3 存在下で 45 分間培養後の上清の LDH 活性を測定した。300  $\mu$ M の PPADS は、100  $\mu$ g/ml の hBD-3 による A549 細胞からの LDH release を有意に抑制した。

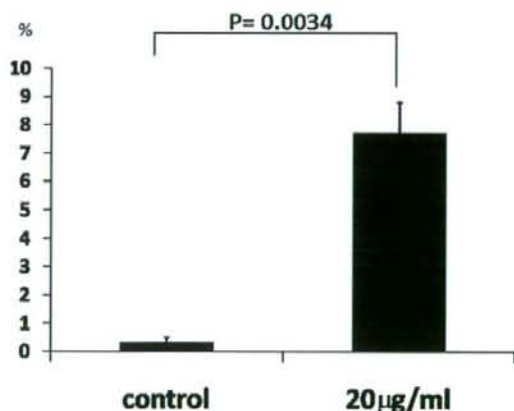


図 11. 12 時間の hBD-3 との共培養により惹起される PI 陽性細胞数

12 時間の共培養では、20  $\mu$ g/ml の hBD-3 存在下で、有意に多くの A549 細胞が、PI 染色陽性像を示した ( $p < 0.01$ )。

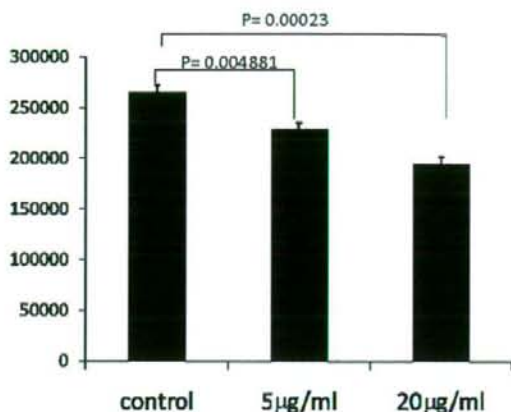


図 12. 48 時間の hBD-3 存在下での培養による細胞数の減少

5  $\mu$ g/ml あるいは 20  $\mu$ g/ml の hBD-3 の存在下で、A549 細胞を 48 時間培養した後の総細胞数を比較した。hBD-3 の存在下で、総細胞数は有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。

### 13) マウス個体における mBD-14 の抗腫瘍効果

C57BL6/J マウスの皮下に接種した LLC 細胞の腫瘍塊近傍で、mBD-14 ペプチドを持続皮下投与した。9 日後に、腫瘍を摘出し、その重量を評価した結果、mBD-14 投与マウスから摘出した腫瘍はコントロール群と比較して有意に小さいことが明らかとなった (図 13)。

また、mBD-14 ペプチドを持続投与したマウスにおいても、肉眼的に明らかな、正常組織の破壊像は認められなかった。

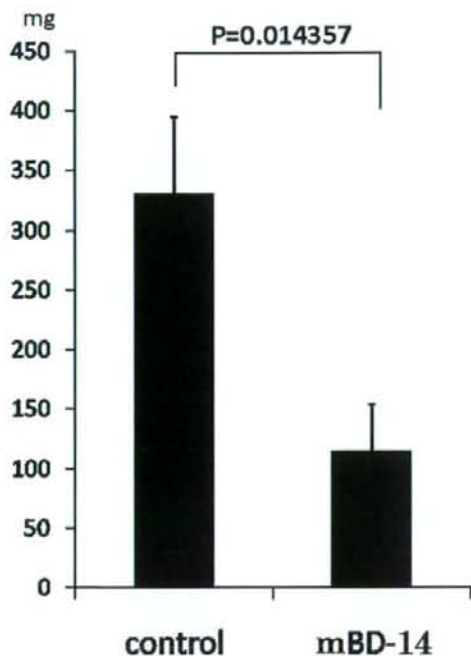


図 13. mBD-14 投与マウスの腫瘍の重量

LLC 細胞を皮下に接種したマウスに対して、mBD-14 を持続皮下投与し、9 日後に腫瘍塊の重量を比較した。mBD-14 投与マウスで、腫瘍塊の重量は有意に低値であった。

#### 14) アドレノメデュリン遺伝子改変マウスの MCh による非特異的気道反応性

非特異的気道収縮物質である MCh の吸入により、肺抵抗・肺エラスタンスは濃度依存的に上昇した。各群において、生理食塩水吸入後の肺抵抗・肺エラスタンスに有意差は認められなかった。MCh 吸入後の肺抵抗を MCh の濃度に対してプロットしたものが図 14 である。

OVA により感作された mutant 群では、明らかに inflexion point が左方に偏位しており、第 4 濃度(2.5 mg/ml)と第 5 濃度(5 mg/ml)においては saline 吸入群より明らか

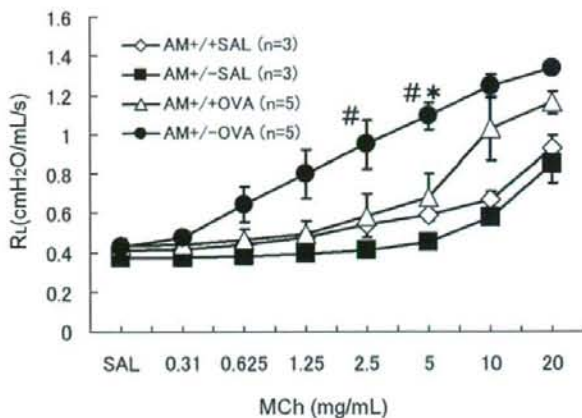


図 14. Methacholine (MCh) dose response curves for lung resistance ( $R_L$ ) in the wild type and the heterozygous adrenomedullin (ADM) mutant mice. SAL, saline. OVA, ovalbumin. # $P < 0.05$  compared with the  $R_L$  in the same MCh dosage of  $AM^{+/+}$  SAL group. \* $P < 0.05$  compared with the  $R_L$  in the same MCh dosage of  $AM^{+/+}$  OVA group.

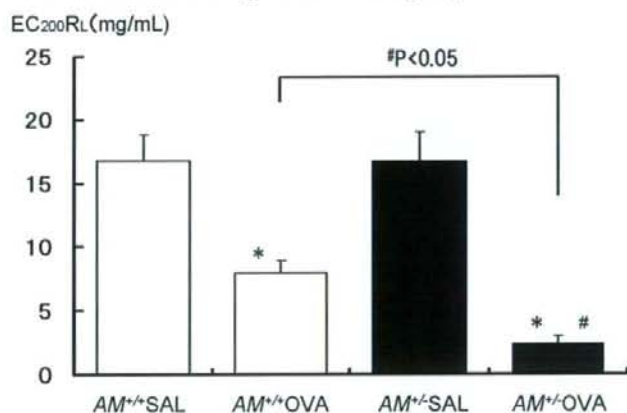


図 15. EC<sub>200</sub>R<sub>L</sub>, Concentration of MCh required to increase  $R_L$  to 200% of baseline values. (n=3 for each  $AM^{+/+}$  group, n=5 for each  $AM^{+/-}$  group) \* $P < 0.05$  compared with the value of corresponding SAL group. # $P < 0.05$  compared with the value of  $AM^{+/+}$  OVA group.

saline-treated  $AM^{+/+}$ ,  $16.81 \pm 2.01$  mg/ml (n=3);  
 saline-treated  $AM^{+/-}$ ,  $16.73 \pm 2.34$  mg/ml (n=3);  
 OVA-treated  $AM^{+/+}$ ,  $7.95^* \pm 0.98$  mg/ml (n=5);  
 OVA-treated  $AM^{+/-}$ ,  $2.41^* \pm 0.63$  mg/ml (n=5),

な肺抵抗の上昇が認められた( $^{\#}P<0.05$ )。さらに、第5濃度(5 mg/ml)においては野生型群と比べても有意に肺抵抗が上昇していた( $^*P<0.05$ )。

気道反応性の指標である  $EC_{200}R_L$  について検討したところ、OVA により感作された群では saline 群と比べて有意に低かった(図 15)。また、OVA 感作群で野生型、mutant を比較すると、mutant 群において有意に  $EC_{200}R_L$  が低値( $^{\#}P<0.05$ )であり、mutant の喘息モデルマウスにおいては MCh 気道過敏性が有意に亢進していることが示唆された。

#### 15) アドレノメデュリン遺伝子改変マウス気管支喘息モデルでの BALF の解析

抗原感作後の BALF の細胞数・細胞分画を評価した。OVA 感作群の好酸球分画の有意な増多が認められた( $P<0.05$ )が、野生型群と mutant 群の間に有意な差は認められなかった。

また、BALF 中総蛋白濃度、総 IgE 濃度、IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ 、LTC4/D4/E4 の濃度については、野生型群と mutant 群の間に有意な差はみられなかった。

#### 16) アドレノメデュリン遺伝子改変マウス気管支喘息モデルの各種抗体の測定

抗原暴露によって、OVA 特異的 IgG1 の血清抗体価は上昇したが、野生型群と mutant 群の間に有意な差は認められなかった。血清中の OVA 特異的 IgE の測定も試みたが、いずれも検出感度以下であった。

#### 17) アドレノメデュリン遺伝子改変マウス気管支喘息モデルの肺組織標本の解析

HE 染色標本では(図 16)、OVA 感作群で単核細胞、好酸球の気道周囲への浸潤が顕

著に認められた。しかし野生型群と mutant 群の間に明らかな差は見られなかった。

Luna 染色標本では、OVA 感作群で顕著な好酸球浸潤を気道周囲に認めたが、その程度は野生型群と mutant 群の間に有意な差が認められなかった。

PAS/Alcian blue 重染色標本では OVA 処置群できわめて強く染色されており、気道過分泌・杯細胞の過形成が示唆された。OVA 負荷により野生型、mutant いずれの群においても杯細胞の過形成が生じたが、その程度については両群間で有意な差が認められなかった(図 17)。

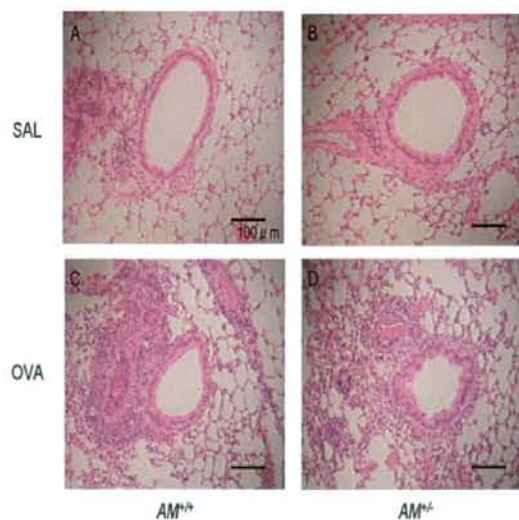


図 16. Photomicrographs of small airways and lung parenchyma from (A) saline-treated wild type, (B) saline-treated ADM mutant, (C) OVA-treated wild type, (D) OVA-treated ADM mutant mice.

18) アドレノメデュリン遺伝子改変マウス  
気管支喘息モデルの気道の形態計測

抽出した 66 の気道成分 ( $AM^{+/+}$ SAL: n=16,  $AM^{+/+}$ OVA: n=14,  $AM^{-/-}$ SAL: n=10,  $AM^{-/-}$ OVA: n=26) に対して、別記の方法で形態計測を行った。OVA で感作した mutant マウスの気道内腔面積 (Ai/Abm) は OVA 感作マウスで有意な狭小化を認めた ( $P=0.007$ )。しかし野生型と比較して有意な狭小化は認めなかった ( $P=0.20$ )。

また、上皮細胞層の面積 (Ae/Abm) も同様に、OVA 感作マウスで有意な肥厚を認めた ( $P=0.00007$ ) が、mutant 群と野生型の間に有意な差は認められなかった ( $P=0.20$ )。

一方で、OVA で感作した mutant マウスの気道平滑筋領域の面積 (Asm/Abm) は非感作マウスのそれと比較して有意に大きかった ( $P=0.00007$ )。また、OVA 感作 mutant マウスの気道平滑筋領域の面積は野生型のそれと比べて有意に高値であった ( $P=0.0001$ ) (図 18)。

この気道平滑筋領域の細胞数 Nuclear Cell Count (NCC) をカウントし、 $Pbm^2$  で補正して評価した。細胞数 (NCC/ $Pbm^2$ ) は OVA 感作マウスで有意に増加しており ( $P=0.0019$ )、また mutant 群の細胞数は野生型と比較して有意に増加していた ( $P=0.012$ ) (図 19)。

また、 $\alpha$ -smooth muscle actin に対する免疫組織化学染色を行った結果を図 20 に示す。OVA 感作マウスにおいては、mutant mouse の気道平滑筋層の面積が野生型と比較して有意に増大していた ( $P=0.0004$ )。

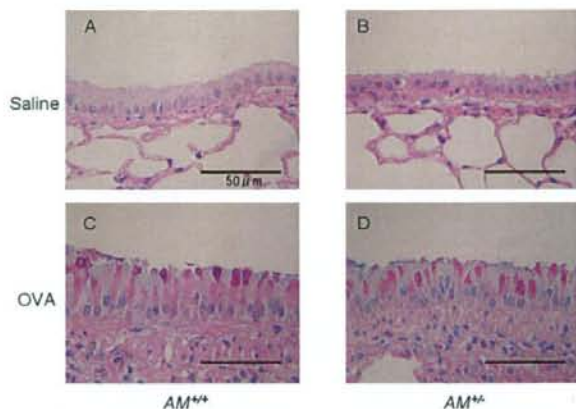


図 17 Photomicrographs of bronchial wall stained by PAS/Alcian blue co-stain (n=12 for each group). Goblet cells hyperplasia is apparent in C and D.

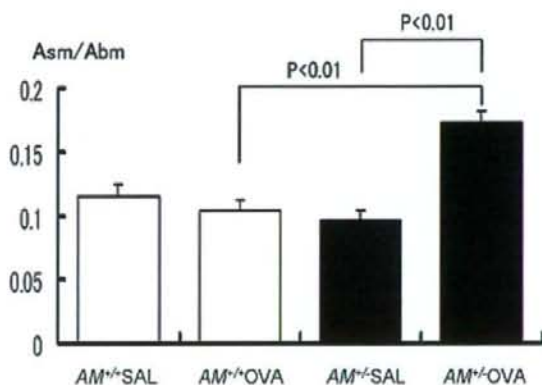


図 18. Area of airway smooth muscle cell layer (Asm/Abm) following OVA- or SAL- inhalational challenge ( $AM^{+/+}$ SAL: n=16,  $AM^{+/+}$ OVA: n=14,  $AM^{-/-}$ SAL: n=10,  $AM^{-/-}$ OVA: n=26). Asm/Abm indicates the standardized area of airway smooth muscle cell layer by Abm. P values are shown where significant ( $P<0.05$ ).

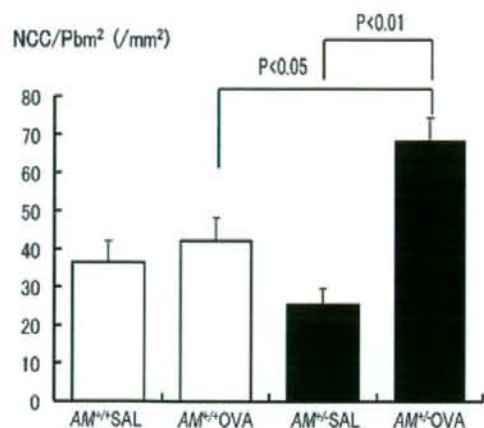


図 19. NCC/Pbm<sup>2</sup> around the respiratory bronchioles following OVA- or SAL-inhalational challenge (AM<sup>+/+</sup>SAL: n=16, AM<sup>+/+</sup>OVA: n=14, AM<sup>-/-</sup>SAL: n=10, AM<sup>-/-</sup>OVA: n=26). NCC/ Pbm<sup>2</sup> indicates the standardized nuclear cell count by Abm. P values are shown where significant (P<0.05).

#### D. 考察

我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、筋ジストロフィーに相当する骨格筋線維の変性、再生の所見と筋力低下を呈することを見出した。

同時に、この  $\beta$ -defensin 過剰発現マウスの表現型は、早老症にも類似する。特に Tg1 マウスのるいそう、寿命の短縮、骨密度の低下は、代表的な早老症の所見である。さらに、尿中 8-ODdG の増加から、加齢変化の代表的な要因である酸化ストレスが、本マウスにおいても増強していることが明らかとなった。

我々の研究は、defensin の哺乳類細胞自身への作用が、個体レベルで疾患をきたしうることを実証した初めての知見である。

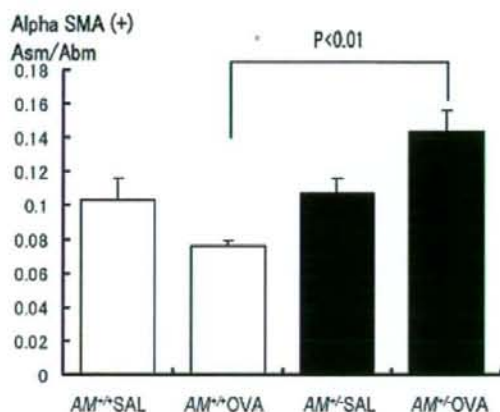
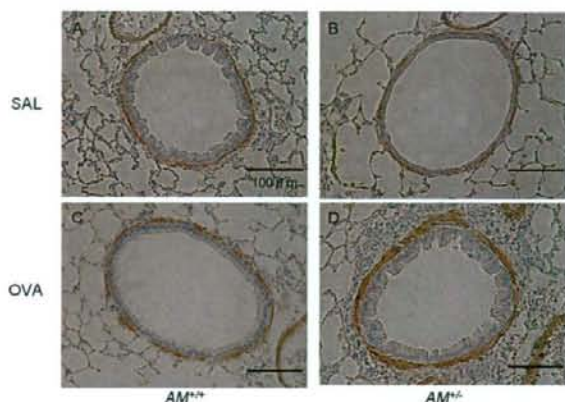


図 20. Photomicrographs of small airways and lung parenchyma from (A) saline-treated wild type, (B) saline-treated ADM mutant, (C) OVA-treated wild type, (D) OVA-treated ADM mutant mice after OVA- or SAL-inhalational challenge. Specimens were stained with anti- $\alpha$ -SM actin antibody immunohistochemically. Scale bar, 100 $\mu$ m (above). Area of airway smooth muscle cell layer (Asm/Abm) following OVA- or SAL- inhalational challenge in the immunohistochemically stained sections with anti- $\alpha$ -SM actin antibody (AM<sup>+/+</sup>SAL: n=16, AM<sup>+/+</sup>OVA: n=14, AM<sup>-/-</sup>SAL: n=10, AM<sup>-/-</sup>OVA: n=26). P values are shown where significant (P<0.05) (below).

これまでの動物モデルの研究は、defensinの感染防御上の重要性を示すものであった。しかし、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り、またそれ自身、細胞傷害性を有する。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。さらに、このような炎症と加齢変化との関連が示唆されたことも興味深い。

一方、多くの細胞実験や動物実験において、老化と癌化は、相反し、老化の促進に働く分子が、癌に対しては防御的に働くことが予想される。

我々は、ヒトdefensinの中でも、hBD-3が際立った細胞傷害性を示すことを見出し、その抗腫瘍効果を個体レベルでも確認した。

高濃度のhBD-3は、極めて短時間に細胞膜破壊を主因とする細胞死を惹起した。そのメカニズムには不明な点が多いが、今回、P2受容体の関与を示唆する所見がえられ、興味深い。また、特記すべきことに、hBD-3は、5・20 µg/mlの低濃度でも、腫瘍細胞に対する細胞傷害性を有することも確認された。したがって、hBD-3の細胞傷害性は、上記の炎症性疾患における重要性に加えて、何らかの生理的意義を有している可能性も示唆される。マウス個体においても、mBD-14が、腫瘍の増殖を抑制したことは、抗腫瘍効果としての新しい意義の重要な根拠になるであろう。

呼吸器疾患において、肺癌は、極めて重要な位置を占め、さらなる治療の進歩が期待される領域である。hBD-3の抗腫瘍効果の研究の発展は、新たな創薬につながる

可能性も含む、重要な知見であると考えられる。

また、我々は、血管拡張性ペプチドであるアドレノメデュリンの遺伝子改変マウスを用いて、アドレノメデュリンの減少が、気道過敏性の亢進を促進させ、そのメカニズムのひとつとして、気道平滑筋の過形成の促進が関与している可能性を見出した。

気管支喘息は世界で年間およそ3億人が罹患するcommon diseaseである。吸入ステロイド剤の開発・普及により、年々気管支喘息による死亡率は低下の傾向にあるものの、今日でもおよそ3000人が気管支喘息により死亡している。喘息死に至った患者の気道においては気道上皮剥離と気道内過分泌、気管支平滑筋の増生・肥厚といったリモデリングの所見を呈している。リモデリングを来した気道は気管支拡張剤に対する反応性が減弱するため、気管支喘息が重症化・難治化する原因として極めて重要である。したがって、このリモデリングを抑制する有効な治療が開発できれば、喘息の難治化・重症化を防ぎ、喘息による死亡率を低下させることに役立つと考えられる。

今回の研究結果はADMの減少が気道過敏性の亢進に関与することを、遺伝子改変マウスを用いて証明した初めての報告である。さらに、そのメカニズムについて検討した結果、好酸球性気道炎症の関与、免疫グロブリン、サイトカインといった炎症性メディエーターの関与、杯細胞の過形成、気道粘液過分泌の関与等を支持する所見は認められなかった。

しかし、注目すべきことに、気道平滑筋



層の面積は mutant 群で有意に増加しており、気道平滑筋細胞の増殖や肥大に ADM が関与している可能性が示された。

ADM の不足が気管支平滑筋細胞の増殖を促し、気道リモデリングを促すことは、極めて画期的な知見と考える。ADM が気管支平滑筋細胞の増殖を抑えるという報告は vitro においても vivo においてもこれまでになされていないが、血管平滑筋細胞の増殖が ADM により抑制されることを考慮すると気管支平滑筋においても同様の機序で ADM が気管支平滑筋細胞の増殖を抑制するものと推定される。

今回の知見より、ADM を投与することによって気道修復の際に生じる平滑筋細胞の増殖を抑え、リモデリングを生じにくくする可能性があり、今後 ADM が気管支喘息の気道リモデリングを防ぐ薬剤として臨床応用できる可能性を示唆された。

## E. 結論

1) defensin 過剰発現マウスは、筋の変性疾患に類似する所見とともに、酸化ストレスの増強を伴う、寿命の短縮、低体重、骨密度低下など、老化の促進を示唆する所見を示した。

2) Defensin の中でも、hBD-3 は、細胞傷害性が強く、この作用は、マウス個体での腫瘍増殖の抑制効果として確認された。これらの知見は、defensin の新たな生理的意義を示すとともに、創薬への可能性も示唆している。

3) アドレノメデュリンの遺伝子改変マウスを用いて、アドレノメデュリンの減少が、気道過敏性の亢進を促進させることを実証した。そのメカニズムとして、平滑筋細胞の過形成性の関与が示された。

気管支喘息に伴う気道のリモデリングの機序の解明と新たな治療戦略につながる知見である。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto H et. al. Adrenomedullin insufficiency increases allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *J Appl Physiol.* 102:2361-2368, 2007.
- 2) Yamaguchi Y et. al.  $\beta$ -defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292: C2141-C2149, 2007.

### 2. 学会発表

- 1) 山口泰弘 ら、高濃度  $\beta$ -ディフェンシンによる気道上皮由来細胞の細胞死と P2X 受容体の関与. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会(2008)
  - 2) 山口泰弘 ら、シンポジウム“細胞分子呼吸器学から臨床へ” 抗菌ペプチド defensin の新しい病態生理学的意義 (2008)  
第 48 回日本呼吸器学会学術講演会
  - 3) 花岡陽子 ら、 $\beta$ -defensin 6 過剰発現マウスの肺機能評価  
第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 (2008)
  - 4) 山口泰弘 ら、老化モデルとしてのディフェンシン過剰発現マウスの表現型と筋障害の機序  
第 49 回日本老年医学会学術集会 (2007)
  - 5) Yamaguchi Y. et. al. The molecular mechanism of human  $\beta$ -defensin cytotoxic effects on mammalian cells 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR) (2006)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳動物、及びその製造方法 (出願中)

分担研究総合報告書

G タンパク質共役型受容体による生体制御機構の解明

研究分担者 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 准教授

研究要旨

- 1) リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid; LPA) は特異的な三量体 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して多彩な生理活性を示す脂質メディエーターである。LPA は特に神経細胞の形態や生存に影響を及ぼす。2003 年に我々は、 $p2y_9$  または GPR23 と呼ばれていたリガンド不明の GPCR が、新しい第 4 番目の LPA 受容体 ( $LPA_4$ ) であることを突きとめ報告した (Noguchi, K., Ishii, S., and Shimizu, T. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 25600-25606)。神経細胞における  $LPA_4$  の機能を評価するために、本研究では内在性の LPA 反応性を欠いたラット神経芽細胞腫由来の B103 細胞を用いた。 $LPA_4$  を安定発現した B103 細胞において、 $G_{q/11}$  依存性 Ca 反応が LPA によって惹起されたが、アデニル酸シクラーゼ活性への影響は認められなかった。さらに、この細胞は LPA に反応して顕著な細胞形態変化、すなわち神経突起の退縮、細胞凝集、カドヘリン依存性細胞間接着を示した。これらの形態変化には低分子 G タンパク質 Rho を介した細胞内シグナルが関わっていることが明らかになった。したがって、これらの結果は、 $LPA_4$  が  $LPA_1$  と同様に  $G_{q/11}$  と  $G_{12/13}$  と共役する一方で、 $LPA_1$  と違って  $G_{i/o}$  とは共役していないことを示している。 $LPA_4$  は神経突起退縮と細胞凝集作用を通して、神経発生や神経細胞移動などの生物学的機能を持つ可能性がある。
- 2)  $p2y_5$  はリガンドが未同定の GPCR (オーファン GPCR) である。アミノ酸配列が  $LPA_4$  と最も相同性の高いことから、我々は  $p2y_5$  の LPA 受容体としての可能性を検討した。LPA 無応答性の細胞である RH7777 細胞と B103 細胞に  $p2y_5$  を発現させて解析したところ、LPA は Ca 応答やアデニル酸シクラーゼの活性に作用を及ぼさない一方、Rho を介すると考えられる著しい細胞形態変化を引き起こすことが明らかとなった。 $p2y_5$  発現 B103 細胞に  $G_3$  と  $G_{13}$  タンパク質のキメラ融合タンパク質をさらに発現させたところ、LPA 依存的なサイクリック AMP 産生が観察されるようになった。また、 $p2y_5$  を発現する RH7777 細胞の膜画分においては、 $p2y_5$  への  $[^3H]$ -LPA の特異的結合、LPA による  $[^{35}S]$ -GTP $\gamma$ S 結合 (G タンパク質における GDP/GTP 交換反応) の促進も観察された。ヒト臍帯静脈内皮細胞では、内在的に発現する  $p2y_5$  mRNA を RNA 干渉法で発現抑制したところ、LPA によって惹起される細胞形態変化が起きなくなった。我々はさらに  $p2y_5$  のリガンド選択性も検討

し、グリセロール骨格の *sn*-2 位に脂肪鎖を持つ 2-アシル型 LPA が 1-アシル型 LPA に比べて  $p2y_5$  のより強いアゴニストとして機能することを明らかにした。本研究でオーファン GPCR の一つである  $p2y_5$  が LPA の第 6 番目の受容体であることを確認したことになることから、我々はこの受容体を  $LPA_6$  と命名することを提案したい。

- 3) 細胞外 pH 感知性受容体 TDAG8 は G タンパク質共役型受容体の一種であり、細胞外 pH の低下に伴い活性化されることは我々が以前に報告した (Ishii, S., Kihara, Y., and Shimizu, T. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 9083-9087)。TDAG8 はヒトでは脾臓、胸腺、血球細胞で発現が高いが、これらの組織以外の様々な癌化した組織で発現の増加が確認されている。そこで、TDAG8 をマウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma (LLC) 細胞に過剰発現させ、これをマウスに尾静脈投与したところコントロール細胞投与マウスと比べて肺における腫瘍形成が促進されることが明らかとなった。また、皮下に LLC 細胞を注射した場合も同様の結果が得られた。様々な *in vitro* 解析を行ったところ、TDAG8 は酸性条件で PKA 及び ERK を介して細胞増殖の維持に関わり、さらに癌関連遺伝子である Cox-2 の発現を誘導していることが示された。悪性腫瘍内部が酸性であることは昔からよく知られている。これは血管から離れた部位で癌細胞が増殖すると低酸素状態となり、pH を下げる乳酸などが蓄積することに起因すると考えられている。今回の結果から、TDAG8 はこのような腫瘍内の酸性状態を感知して癌細胞の増殖を維持し、さらに Cox-2 などの癌関連遺伝子を誘導していると考えられる。

### 1) $LPA_4$ 受容体を介した LPA の生物作用

#### 1-A. 研究目的

リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid; LPA) は生体内に存在する生理活性脂質の一つで、細胞の成長や移動、分化などを制御していると考えられている。LPA の作用は細胞膜表面に発現する特異的 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を活性化することで細胞内に及ぶ。EDG ファミリーに属するアミノ酸配列の相同性が高い 3 つの受容体 ( $LPA_1$ ,  $LPA_2$ ,  $LPA_3$ ) が主な LPA に特異的な GPCR である。薬理的解析によると、 $LPA_1$  と  $LPA_2$  は少なくとも  $G_{1/o}$ 、 $G_q$ 、 $G_{12/13}$  の 3 種類の G タンパク質と共役してい

るが、 $LPA_3$  は  $G_{1/o}$  と  $G_q$  のみで  $G_{12/13}$  とは共役していないとされている。LPA 受容体の種類とそれら分子が共役する G タンパク質の種類に応じて、LPA は多彩な細胞内シグナリング経路を活性化すると考えられる。

脳には LPA が他の臓器に比して豊富に存在すると報告されている。また、神経細胞の細胞株や神経前駆細胞、初代培養神経細胞に対し、LPA は細胞の形態変化を引き起こす。他に神経細胞の生存や細胞周期に影響を与えとも報告されている。 $LPA_1$  欠損マウスには嗅覚の障害や行動異常が認められており、神経因性疼痛の発症に関わるとの

報告もある。発生途中のマウス大脳皮質にLPAを試験管内で投与すると、折畳み構造が顕著になるが、LPA<sub>1</sub>とLPA<sub>2</sub>の二重欠損マウスではこのLPAの薬理作用は観察されない。LPAの神経細胞に対する作用のうち、上記のように責任受容体が明らかになったはあるものの、未解明なものも依然として残っている。

2003年に我々は、p2y<sub>9</sub>またはGPR23と呼ばれていたリガンド不明のGPCRが、LPAに反応することを突きとめ報告した。4番目のLPA受容体であったことからLPA<sub>4</sub>と命名したこのGPCRは、興味深いことにEDGファミリーに属するLPA<sub>1-3</sub>とはアミノ酸配列の相同性が低かった。LPA<sub>4</sub>はラットの胎児海馬由来神経細胞や不死化した海馬神経前駆細胞で発現するとの報告がある。これらの事実から、LPA<sub>4</sub>が神経発生や神経細胞移動といった神経系の発達過程に重要な役割を果たしている可能性が予想される。しかしながら、このLPA受容体の解析は進んでおらず、神経系における機能は不明である。そこで本研究では、LPA<sub>4</sub>を安定発現させた神経細胞株を用いて、この受容体の神経系における機能を明らかにすることを試みた。

## 1-B. 研究方法

### LPA<sub>4</sub>安定発現細胞株の樹立

LPA<sub>4</sub>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、LPA<sub>4</sub>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mRNA発現を可能にする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、ラット神経芽細胞腫由来のB103細胞にトランスフェクションした。その後G418で薬剤選択をかけ、トランスフェクションの26日後に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で、ポリクローナルなLPA<sub>4</sub>の安定高発現細胞群を取得することができた。この細胞群はモノクローナルな細胞と比べ、細胞機能に偏りが無いと考えられるので、導入したLPA<sub>4</sub>の機能を観察するのに適している。ヒトLPA<sub>1</sub>のcDNAはヒト脳のポリ(A)+RNAをRT-PCRによって得た。これをもとに、LPA<sub>4</sub>と同様にN末端にHAタグを付加したLPA<sub>1</sub>のcDNAを入れ子PCRで調製し、ポリクローナルな安定高発現B103細胞群を取得した。

### cAMP濃度の測定

コラーゲンでコートした96ウェルプレートに細胞(3.2×10<sup>4</sup>個)を播種し、無血清培地で24時間培養した。バッファーA(25mM HEPES-NaOH [pH 7.4]と0.1% BSAを含むHBSS)で二回洗い、0.5mM IBMXを含む100