

氏 名 (本籍)                    <sup>かも</sup>蒲            <sup>はら</sup>原            <sup>まさ</sup>正            <sup>ずみ</sup>純

学 位 の 種 類                    博            士 (薬            学)

学 位 記 番 号                    薬            第            4 5 8            号

学位授与年月日                    平 成 14 年 6 月 19 日

学位授与の要件                    学位規則第 4 条第 2 項該当

### 学 位 論 文 題 目

新規ロイコトリエン受容体の同定と生理機能の解明

論 文 審 査 委 員                    (主 査) 教 授 山 添            康

教 授 榎 本 武 美

教 授 中 畑 則 道

# 論文内容要旨

プロスタグランジン (PGs) やトロンボキサン (TXs), ロイコトリエン (LTs) のようなエイコサノイドはアラキドン酸代謝産物の1つのファミリーであり, 生体のホメオスタシスを維持するために様々な生理作用を発揮している。エイコサノイドの1つLTsはアラキドン酸の5-リポキシゲナーゼ系代謝産物において低濃度で強い生理活性を示す一連の生理活性脂質である。現在までに, IUPHAR (International union of Pharmacology) によって, LTsの受容体は薬理的に3つに分類されている。すなわち,  $LTB_4$  を特異的に認識する受容体 (BLT) とペプチドLTsを認識する2つの受容体 ( $CysLT_1, CysLT_2$ ) である。LTs受容体遺伝子としては, BLTと $CysLT_1$ が単離同定されているが,  $LTC_4$ に親和性の高いとされる $CysLT_2$ の遺伝子は如何なる種においても単離同定されていない。そこで, 本研究では, LTs類の受容体の構造および性質を明らかにすることを目的として, 現在まで見出されていない新規遺伝子の探索を行い, LTsに反応する受容体の単離同定を行った。

遺伝子構造が明らかとなっている既知のLTs受容体, BLTと $CysLT_1$ のみならず, PGsやTXsなどのエイコサノイド受容体はG蛋白質共役型受容体 (GPCR; G-protein coupled receptor) と総称される受容体ファミリーに属している。GPCRはアミノ末端を細胞外, カルボキシル末端を細胞内とし, 細胞膜を7回貫通する構造を共有するスーパーファミリーを形成していることから「7回膜貫通型受容体」と総称される場合もある。従って, スーパーファミリー内での構造の類似性から, 比較的容易に新規GPCR遺伝子群を抽出することが可能である。そこでまず,  $LTB_4$ 受容体BLTのアミノ酸配列をもとに公共データベースから新規GPCRの探索を行い, 新規GPCR遺伝子JULF2を見いだした。JULF2が反応する生体内生理活性物質の探索を行った結果, JULF2は $LTB_4$ に反応し, 低用量でJULF2発現細胞の細胞内cAMP濃度を低下させることを見いだした ( $EC_{50}=8.1nM$ )。これまで薬理的に,  $LTB_4$ の受容体がBLT以外に存在することは全く示唆されていなかったが, BLTとJULF2は互いに37%の相同性を有しており, さらに, ゲノム配列の解析から2つの受容体は染色体14q11-12に並んで存在していることが判明した。また, BLTは種間において70-80%程度の相同性しか示さないのに対し, JULF2はクローニングしたヒト/ラット/マウス間において90%以上保存されていたことから, JULF2は進化の過程で保存されるべき重要な遺伝子であることが推察された。

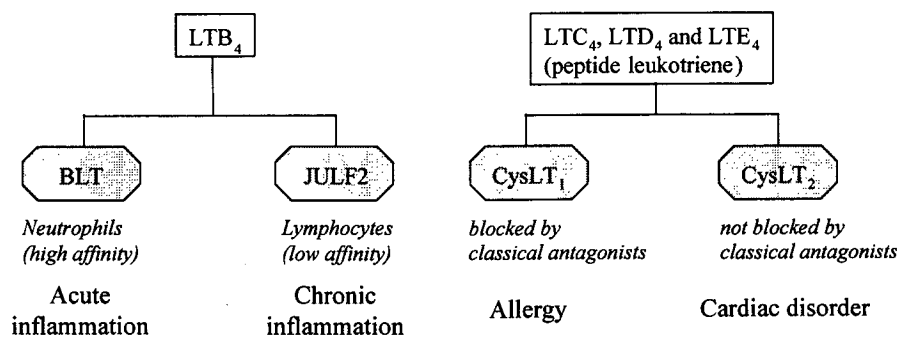
$LTB_4$ は炎症時に産生される強力な白血球走化因子として知られている。そこで, ボイデンチャンバーを用いて細胞走化性の検討を行ったところ, JULF2発現細胞が $LTB_4$ に誘引されてチャンバー下層に遊走することが観察された。BLT同様, JULF2もまた機能的に細胞走化性に関与していることが示されたが, この走化活性はBLTに比べて10倍程度弱いものだった。そこで, JULF2とBLTの発現分布の比較検討を行った結果, BLTは顆粒球, 特に好中球に特異的に発現しているのに対し, JULF2はリンパ球に最も強く発現していることが明らかとなった。これまで $LTB_4$ の受容体は, 薬理的な解析から一つのみが存在すると考えられてきた。しかしながら, 古くより $LTB_4$ 受容体を標的とした抗炎症薬の研究が盛んに行われてきたにもかかわらず, 開発された多くの阻害剤が動物実験において著名な成績を上げる一方, 臨床では

ほとんど効果が得られていなかった。本研究による JULF2 の発見は、LTB<sub>4</sub> 研究の再考を提起し、慢性炎症に関与の大きいリンパ球に発現している LTB<sub>4</sub> 受容体の発見は、LTB<sub>4</sub> と炎症疾患との関連を明らかにする上でも重要な意味をもつと考えられた。

公共データベースを用いた新規 GPCR 探索は、JULF2 を見いだすことには成功したが、薬理的に存在が示唆されていながら実態が明らかとなっていない CysLT<sub>2</sub> の発見には至らなかった。そこでこれを単離するため、オリゴキャップ法にて作製されたヒト完全長 cDNA ライブラリーをもとに新規 GPCR 探索を行った。その結果、CysLT<sub>1</sub> と 31% の相同性を有する新規 GPCR 遺伝子 PSEC0146 を見だし、PSEC0146 がペプチド LTs (LTC<sub>4</sub> と LTD<sub>4</sub>) に同程度に作用して細胞内 Ca<sup>2+</sup> の流入を引き起こすことを見いだした。この Ca<sup>2+</sup> 流入は古典的 LTC<sub>4</sub> 阻害剤 (CysLT<sub>1</sub> 拮抗剤) によって遮断されず、また結合実験の結果、PSEC0146 は LTC<sub>4</sub> に対して K<sub>d</sub>=2.99nM の親和性を有する受容体であったことから、PSEC0146 はこれまで単離同定が望まれていた CysLT<sub>2</sub> であることが判明した。

ペプチド LTs は遅延型アナフィラキシー誘発物質 (SRS-A) として初めて同定された物質であることから、CysLT<sub>1</sub> 同様 CysLT<sub>2</sub> もまた肺や気管に発現していると予想されてきた。しかしながら、PSEC0146 の発現解析の結果、RT-PCR では肺に弱く発現していることが確認されるものの、Northern blot 解析では肺や気管における mRNA の発現は検出できなかった。むしろ非常に興味深いことに、PSEC0146 の発現は心臓における発現が極めて高かった。そこで、循環器領域における PSEC0146 の発現は心臓における発現が極めて高かった。そこで、循環器領域における PSEC0146 の性状/機能解析を開始した。まず、2 つのペプチド LTs 受容体の心血管系における RT-PCR および *in situ* hybridization 解析を行った結果、CysLT<sub>1</sub> は心臓部位ではほとんど発現していないのに対し、CysLT<sub>2</sub> は心筋細胞、繊維芽細胞、そして冠動脈平滑筋細胞に発現していることが明らかとなった。SRS-A の作用点という意味では、受容体の CysLT<sub>1</sub> と CysLT<sub>2</sub> のいずれも候補となりうるが、実際の臨床の場合において古典的 LTD<sub>4</sub> 阻害剤が喘息治療薬として用いられ、著大な効果を示していることを考えると、炎症やアレルギーにおける CysLT<sub>1</sub> の関与は大きいと思われる。逆に、ペプチド LTs が引き起こす心収縮力や冠血流量の低下作用を考えた場合、CysLT<sub>1</sub> の心血管系での発現はほとんど認められなかったことから、循環器領域における CysLT<sub>1</sub> の関与は小さいと予想された。実際、CysLT<sub>2</sub> の発現のみが確認されたヒト冠動脈平滑筋細胞 (HCASMC) に対し、LTC<sub>4</sub> は低容量 (EC<sub>50</sub>=10.2nM) で Ca<sup>2+</sup> 流入を引き起こし、細胞遊走も引き起こすことが観察された。さらに、HCASMC 細胞に対する上記 LTC<sub>4</sub> の作用は古典的 LTD<sub>4</sub> 阻害剤に耐性であったことから、作用のほとんどは CysLT<sub>2</sub> を介して発揮されるものであり、CysLT<sub>2</sub> が循環器領域において機能していることをはじめて明らかにした。

以上本研究により、2 種の新規 LT 受容体の同定に成功し、全 4 種の LTs 受容体の全てを明らかにした。すなわち、急性期炎症と関連する好中球 LTB<sub>4</sub> 受容体としての BLT, 慢性期炎症と関連するリンパ球 LTB<sub>4</sub> 受容体としての JULF2 (BLT2), 炎症/アレルギー関連で機能する CysLT<sub>1</sub>, そして心血管系で機能する PSEC0146 (CysLT<sub>2</sub>) 受容体、と定義づけた。未だ LTs 受容体の機能の一端を証明したばかりであり、LTs 類の生理的役割の解明は完全ではないが、受容体遺伝子構造の全てを明らかにしたことで今後の LTs 研究の一助になったと考えられる。



**Nomenclature and peculiarities of the leukotriene receptors.**

## 審査結果の要旨

プロスタグランジンのようなエイコサノイドはアラキドン酸代謝産物は生体のホメオスタシスを維持するために様々な生理作用を発揮している。エイコサノイドの1つロイコトリエンはロイコトリエン $B_4$  ( $LTB_4$ )と脂肪酸にペプチドが結合したペプチドロイコトリエン ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ )の2つに大別され、低濃度で強い生理活性を示す。この生理作用は個別の細胞膜受容体を介して発揮されると考えられている。

そこで、本研究では、ロイコトリエン類の受容体の構造および性質を明らかにすることを目的として、現在まで見出されていない新規のG蛋白質共役型受容体 (GPCR) 遺伝子の探索を行い、ロイコトリエンに応答するGPCRを同定した。さらに同定されたGPCRの発現分布を解析し、生理機能および病態との関連性の解明を行った。

唯一遺伝子が判明しているロイコトリエン受容体BLT受容体の一次配列をもとに、ロイコトリエン類に応答するであろう新規オーファンGPCRを探索した結果、GPCRが得られた。JULF2は36.6%の相同性をBLT受容体と示したが、ペプチドロイコトリエンには反応せず、JULF2は $LTB_4$ の新規低親和性受容体であることが判明した。発現解析から単核球に関連する生理作用を媒介する受容体としてJULF2を位置付けることができた。

次にCysLT<sub>2</sub>受容体遺伝子をヒト全長cDNAライブラリーから単離した。このPSEC0146の発現によって $LTC_4$ と $LTD_4$ に同程度の反応して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、しかも古典的 $LTD_4$ 受容体拮抗薬によって作用が遮断されないことが示された。これらの特徴がこれまで薬理的に示されてきたCysLT<sub>2</sub>受容体の特徴と完全に一致し、PSEC0146がCysLT<sub>2</sub>受容体であることを証明できた。これらの結果は生化学的薬理学および新薬開発に寄与することが大である。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。