

「脳を知る」

平成10年度採択研究代表者

清水 孝雄

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

「脂質メディエーターのdual receptor系と神経機能」

1. 研究実施の概要

脳は脂質の宝庫であり、数多くの脂質メディエーター（生理活性脂質）が産生される。しかし、脂質メディエーターの神経機能についてはまだ未知の分野である。脂質メディエーターの神経発生や、可塑性、神経内分泌系への作用を明らかにすることが本研究の目的である。具体的な研究項目は次の通りである。（1）脂質メディエーターの産生酵素、分解酵素を精製、クローニングし、その脳での局在や細胞内局在、さらに刺激に応じた細胞内局在変化を明らかにする。（2）脂質メディエーターの細胞外への放出機構を明らかとし、トランスポーターの単離を行う。（3）放出された脂質メディエーターに対する細胞膜受容体、核内受容体を単離する。また、既に単離している脂質メディエーター関連の孤儿受容体に関しては、そのリガンド探索を行う。（4）種々の分子を欠損したマウスを作成し、その分子の細胞及び個体レベルにおける機能を明らかとする。このために、生化学的解析と共に、形態学、及び電気生理学的解析を進める。（5）種々の酵素や受容体拮抗薬の広範囲なスクリーニングを行う。進め方としては、生化学・分子生物学的アプローチで新規分子を単離し、その欠損マウスを作成することを第一のステップとする。そのマウスの解析により分子の標的となる疾患を見いだすことができれば、その後、薬剤のスクリーニングなどを行う。初期の段階ではその準備として多サンプルの同時スクリーニング法などの開発を進める。

2. 研究実施内容

脂質メディエーターの神経での機能を解析することを目的に多面的な研究を行い、以下のような成果を得、関連領域を含めて合計27の英文論文（うち原著論文22篇）を掲載し、24回の学会（国内13, 国際11）で公表した。さらに、「エイコサノイドと脂質メディエーター」に関する2003年キーストンシンポジウムをオーガナイズした。また、1件の特許出願をした。

（1）脂質メディエーター産生酵素に関する研究

細胞質型ホスホリパーゼA2 (cPLA2) の α 以外に β が数種、 γ 1種があることを見いだし、そのin vitroでの性質の解明を進めている。 α 、 β のタイプは細胞内カルシウムイオン

ンの増加により制御され、他方、 γ は酸化ストレス（活性酸素）により活性化されることを見いだした。cPLA2、5-リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン産生酵素の脳内における詳細な局在を解析し、cPLA2は小脳プルキニエ細胞を始め多くのニューロンに、また、ロイコトリエン産生酵素のうち、ロイコトリエンC4合成酵素は視床下部、脳下垂体後葉に局在していることを明らかにした。

（2）脂質メディエーター受容体の研究

脂質メディエーターのうち、ロイコトリエンC4の二種類の受容体を単離し、特にCysLT2型が神経に多く発現していることを見いだした。また、ロイコトリエンB4受容体の二種類の受容体についてはその欠損マウスの樹立に成功した。それぞれのマウスの神経機能の解析を進めている。PAF受容体の拮抗分子に関して、コロンビア大学の中西香爾博士と共同研究を行い、種々のギンコライドが異なる親和性で、PAF受容体に結合することを明らかとした。ギンコライドは欧州ではアルツハイマーなどの初期治療に用いられており、本疾患でPAF産生量が増加していることを考え合わせると、神経細胞死へのPAFの関与が示唆された。

さらに、オーファン受容体の脂質リガンドを探索している過程で、p2y9(GPR23)という受容体がリゾホスファチジン酸(LPA)をリガンドとする受容体であることを見いだした。LPAは神経の分化や遊走に関与する分子として既に三種の受容体(Edg-2, Edg-4, Edg-7)が知られているが、今回新たに見いだした受容体はこれらの既知の受容体とは相同性が低く、全く新規の受容体ファミリーに属することがわかった。今後、本受容体の機能解析に進みたい。同時に、他のオーファン受容体のリガンド探索も進めている。

（3）遺伝子欠損マウスの解析による脂質メディエーターのin vivoの機能解析

cPLA2欠損マウスは脳虚血再灌流において著しい梗塞層の縮小を認めた。酵素阻害剤によっても遺伝的欠損マウスと同様の効果が認められることより、cPLA2阻害剤の開発の有効性が期待された。cPLA2欠損マウスはこのほか、炎症性骨破壊、実験性コラーゲン誘発性関節炎モデルでも、極めて軽微な症状を示し、また、血栓の防止に働くことがマウスを用いて明らかとなった。他方、生理的現象の解析においては、cPLA2欠損マウスは胚の着床障害があり、また、海馬CA1領域での長期抑圧に異常があることが明らかとなった。現在、行動解析などを進めている。

PAF受容体欠損マウスは種々の炎症性疾患に抵抗性である。他方、欠損マウス解析の仕事から、PAFは精子の活性化、神経伝達の促通、また、神経細胞の遊走に関与することが明らかとなった。すなわち、PAF受容体欠損マウスは胎生期に小脳原基の厚さに異常があった。さらに、in vitroで小脳顆粒細胞の培養を行い、細胞追尾法により、移動速度を測定したところ、PAF受容体欠損マウスあるいはPAF受容体拮抗分子の投与により細胞移動は著しく減弱した。既に、PAF分解酵素であるPAFアセチルヒドロラーゼの β サブユニットが滑脳症を引き起こすLis-1遺伝子と同一であることが報告されているが、今回の結果を合わせて、PAFが神経細胞の移動や成熟にからむ分子であることが明らかとなった。Lis-1欠損と比べて、PAF受容体欠損マウスの脳形態異常がはるかに軽微であることを考えると、

PAFは既にクローニングされた受容体以外を介して働いている可能性が示唆された。実際、我々の研究でもPAF受容体欠損マウス由来の神経細胞でPAFが濃度依存性に移動速度に影響を与えた。群馬大学グループは独自にホスホリパーゼD過剰発現、あるいは欠損のショウジョウバエを作成し、解析したところ、いずれも感覚器の形成異常が認められた。脂質代謝に関わる重要な酵素であるホスホリパーゼDの個体レベルでの初めての発見である。

(4) 関連分野の研究

神経軸索伸長の反発因子であるセマフォリン3A(Sema3A)欠損マウスの解析から、本分子が嗅覚系の投射に関与していること、また、セマフォリン下流分子であるプレキシシンA1と結合する分子としてB1が存在することを酵母ツーハイブリッド法にて証明した。セマフォリンが膜の崩壊(コラプス)を引き起こす分子機構は不明であるが、脂質メディエーターや脂質組成の変化などの視点から引き続き解析を続けたい。また、嗅覚受容体、フェロモン受容体の解析を通して、Gタンパク共役型受容体(GPCR)の細胞膜移行(ソーティング)の機構の解明を続けている。

3. 研究実施体制

分子生物学グループ

- ① 研究分担グループ長：清水孝雄（東京大学大学院医学系研究科、教授）
- ② 研究項目：
 1. ホスホリパーゼA2の研究
 2. 脂質メディエーター受容体の研究
 3. 遺伝子欠損マウスの作成と解析

脂質生化学グループ

- ① 研究分担グループ長：和泉孝志（群馬大学医学部、教授）
- ② 研究項目：
 1. オーフエン受容体脂質リガンドの探索
 2. ホスホリパーゼDの機能解析

電気生理学グループ

- ① 研究分担グループ長：渋木克栄（新潟大学脳研究施設、教授）
- ② 研究項目：
 1. 遺伝子改変マウスの神経可塑性の解析
 2. 遺伝子改変マウスのニューロン-グリア関連の解析

脳形態学グループ

- ① 研究分担グループ長：島田厚良（愛知県コロニー、室長）
- ② 研究項目：
 1. 正常マウス、および加齢促進マウスの形態解析
 2. 脂質メディエーター産生酵素の脳内局在の組織学的解析

創薬グループ

① 研究分担グループ長：赤松 穰（明治製菓薬品総合研究所、所長）

② 研究項目：

1. ホスホリパーゼA2など脂質メディエーター産生酵素阻害剤のスクリーニング
2. ロイコトリエン受容体拮抗分子の探索

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Miyaura, C., Inada, M., Matsumoto, C., Ohshiba, T., Uozumi, N., Shimizu, T., and Ito, A. (2003) An Essential Role of Cytosolic Phospholipase A2-alpha in PGE2-mediated Bone Resorption Associated with Inflammation. *J. Exp. Med.* 197, 1345-1352
- Hegen, M., Sun, L, Uozumi, N., Kume, K., Goad, B., Nickerson-Nutter, C. L, Shimizu, T., and Clark, J. (2003) Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 197, 1353-1358
- Wong, D. A., Uozumi, N., Kita, Y., and Shimizu, T. (2003) Cytosolic phospholipase A2a in mouse platelets: Clinical and therapeutic implications. *Advances in Prostaglandin, Leukotriene and Other Bioactive Lipid Research.* (Yazici, Z. Folco, G, C., Drazen, J. M., Niigam, S., and Shimizu, T. eds) pp 81-86, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. :ISBN: 0306477637
- Asai, K, Hirabayashi, T, Houjou, T, Uozumi, N., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2003) Human Group IVC phospholipase A2 (cPLA2): roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 8909-8914
- Nagase T., Uozumi N., Aoki-Nagase T., Terawaki K., Ishii S., Tomita T., Yamamoto H., Hashizume K., Ouchi Y., Shimizu T. (2003) 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
- Usui, H., Taniguchi, M., Yokomizo, T., and Shimizu, T. (2003) Interaction of plexin A1 and plexin B1 at the cytoplasmic domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 927-31
- Brink, C., Dahle'n, S.K., Drazen, J., Evans, J.F., Hay, D.W.P., Nicosia, S., Serhan, C.N., Shimizu, T., and Yokomizo, T. (2003) Classification of Leukotriene and Lipoxin Receptors: Distribution, Function and Molecular Aspects. *Pharmacol. Rev.* 55, 195-227

- Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi Y.K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K. and Shimizu, T. (2003) Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J. Neurosci.* 23,1390-1397.
- Vogensen, S.B., Stromgaard, K., Shindou, H., Jaracz, S., Suehiro, M., Ishii, S., Shimizu, T., and Nakanishi, K. (2003) Preparation of 7-substituted ginkgolide derivatives: potent platelet-activating factor (PAF) receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 46, 601-608
- Uozumi, N., Shimizu, T. (2002) Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 59-69
- Toda A, Yokomizo T, Shimizu T. (2002) Leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:575-85
- Ishii, S., Nagase, T., and Shimizu, T. (2002) Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 599-609
- Ito, N., Yokomizo, T., Sasaki, T., Kurosu, H., Penninger, J., Kanaho, Y., Katada, T., Hanaoka, K., and Shimizu, T. (2002) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-activation and Ca influx for leukotriene B4-induced enzyme release. *J. Biol. Chem.* 277, 44898-44904
- Noiri, E., Satoh, H., Taguchi, J., Brodsky, S.V., Nakao, A., Ogawa, Y., Nishijima, S., Yokomizo, T., Tokunaga, K. and Fujita, T. (2002) Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension* 40, 535-540
- Soares, A.C., Pinho, V.S., Souza, D.G., Shimizu, T., Ishii, S., Nicoli, J.R., and Teixeira, M.M. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. *Brit. J. Pharmacol.* 137, 621-628
- Stromgaard, K., Saito, D.R., Shindou, H., Ishii, S., Shimizu, T., and Nakanishi, K. (2002) Ginkgolide derivatives for photolabeling studies: preparation and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* 45,4038-46
- Wong, D.A., Uozumi, N., Kita, Y., and Shimizu, T. (2002) Discrete role for cytosolic phospholipase A2-alpha in platelets: Studies using single and double mutant mice of cytosolic and group IIA-secretory phospholipase A2. *J. Exp. Med.* 196, 349-57
- Izumi, T., Yokomizo, T., Obinata, H., Ogasawara, H., Shimizu, T. (2002) Leukotriene receptors: classification, gene expression, and signal transduction. *J. Biochem.* 132, 1-6
- Honda, Z., Ishii, S., and Shimizu, T. (2002) Platelet-activating factor

receptor. *J. Biochem.* 131, 773-779

- Barbuti, A., Ishii, S., Shimizu, T., Robinson, R.B., and Feinmark, S.J. (2002) Block of the background K⁺ channel, TASK-1, contributes to the arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. *Am. J. Physiol.* 282, H2024-H2030
- Ogasawara, H., Ishii, S., Yokomizo, T., Kakinuma, T., Komine, M., Tamaki, K., Shimizu, T., and Izumi, T. (2002) Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors, mCysLT1 and mCysLT2: Differential pharmacological properties and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 277, 18763-18768
- Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kita, Y., Yamamoto, H., Ohga, E., Ouchi, Y. and Shimizu, T. (2002) A pivotal role of cytosolic phospholipase A2 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nature Med.* 8, 480-484
- Ohshima, N., Ishii, S., Izumi, T., and Shimizu, T. (2002) Receptor-dependent metabolism of platelet-activating factor in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 277, 9722-9727
- Shimizu, T. (2002) Leukotriene receptors. in *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Vol. 5, pp. 1920-1921, John Wiley & Sons, Inc.
- Klein, A., Pinho, V., Alessandrini, A. L., Shimizu, T., Ishii, S., Teixeira, M. M. (2002). Platelet-activating factor drives eotaxin production in an allergic pleurisy in mice. *Brit. J. Pharmacol.* 135, 1213-1218
- Nagase, T., Ishii, S., Shindou, H., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2002) Airway hyperresponsiveness in transgenic mice overexpressing platelet activating factor receptor is mediated by an atropine-sensitive pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 200-205
- Hanaka, H., Shimizu, T., and Izumi, T. (2002) Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase. *Biochem. J.* 361, 505-514

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：2件）