

審査の結果の要旨

氏名 飯塚佳子

本研究はマウスロイコトリエン B4 第二受容体 (mBLT2) の生物学的な役割を明らかにする目的で過剰発現細胞を用いた薬理的な解析、発現臓器・発現細胞の同定、発現細胞における機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. mBLT 一過性過剰発現 HEK293 細胞を用いて [³H] LTB4 に対する結合実験を行ったところ BLT2 発現細胞は 0.3 nM [³H] LTB4 に対しては特異的な結合を示さなかったが、3 nM [³H] LTB4 に対しては特異的な結合を示した。これらのことより、BLT2 は BLT1 と比較して低親和性の LTB4 受容体であることが示唆される。
2. mBLT2 を安定的に発現させた CHO 細胞は mBLT1 発現細胞と比べて高濃度の LTB4 に対して細胞内カルシウム上昇と百日咳毒素感受性の G タンパク質を介したアデニル酸シクラーゼ抑制、extracellular-signal regulated kinase (ERK) のリン酸化を示した。これらのことより、BLT2 の活性化には BLT1 と比較して、より高濃度の LTB4 が必要であることが示された。BLT アンタゴニストとして知られる CP105696 は BLT1 を介した細胞内カルシウム上昇反応を抑制したが BLT2 を介したそれには全く影響しなかった。
3. mBLT 安定的過剰発現 CHO 細胞を用いて mBLT1 および mBLT2 の LTB4 の立体異性体 (12-*epi* LTB4, 6-*trans*-12-*epi* LTB4) に対するリガンド認識について調べた。12-*epi* LTB4 は BLT1 と BLT2 の両者に対して特異的な結合を示し、また両者を介して細胞内カルシウム上昇反応、ERK のリン酸化を引き起こした。12-*epi* LTB4 は BLT1、BLT2 に対してアゴニスティックに働くことが示された。また 12-*epi* LTB4 によるカルシウム上昇反応の最大反応は BLT1 に対しては LTB4 の最大反応の約 50%、BLT2 に対しては 80%を示した。BLT2 と比較して BLT1 は 12 位の OH 基の立体構造を厳密に認識することが示された。一方 6-*trans*-12-*epi* LTB4 は BLT1 にも BLT2 に対しても全く作用しないことが示された。
4. Compound A {[pentanoyl (phenyl) amino] methyl} -1, 1'- biphenyl -2-carboxylic acid が BLT2 に対して特異的な結合を示すこと、細胞内カルシウム

上昇反応、ERK のリン酸化を引き起こすことが、mBLT2 安定的過剰発現 CHO 細胞を用いて示された。LTB4 と比較して低濃度で BLT2 を活性化することから Compound A は LTB4 よりも強力な BLT2 アゴニスト活性を持つことが確認された。

5. マウス (C57BL/6) における BLT2 の臓器分布をノザンブロットィングと定量的 RT-PCR によって調べた。 mBLT2 は小腸と皮膚に発現していることが示された。
6. *In situ* hybridization によって皮膚 (C57BL/6) における発現細胞を同定した。 mBLT2 は皮膚のケラチノサイトに発現していることが示された。また BALB/c マウスからケラチノサイト、ランゲルハンス細胞、ファイブロブラストを採取し、定量的 RT-PCR によって BLT2 の発現を確認したところ、ケラチノサイトに最も多い発現が、続いてランゲルハンス細胞にも発現が確認された。
7. 初代培養ケラチノサイトを用いて BLT2 を介したシグナル解析を行った。 LTB4、BLT2 特異的アゴニスト刺激の両者において濃度依存的な ERK のリン酸化が引き起こされた。また BLT1 特異的アンタゴニストである CP105696 の前処理によっても LTB4 による ERK のリン酸化が阻害されなかったことよりケラチノサイトにおける LTB4 依存的な ERK のリン酸化には BLT1 の関与が小さく、BLT2 の関与が大きいと考えられる。ケラチノサイトにおける BLT2 は細胞内シグナルを伝達する機能的受容体であることが示された。
8. LTB4、BLT2 特異的アゴニスト刺激の両者は濃度依存的な初代培養ケラチノサイトの細胞遊走を引き起こした。ケラチノサイトにおける BLT2 の発現が機能的な発現であることが示された。

以上、本論文では薬理的な解析から、mBLT2 は mBLT1 と比較して高濃度の LTB4 をその活性化に必要とすることが明らかとした。生体内での mBLT2 発現臓器・発現細胞の同定を行い、さらに生体内細胞を用いた内在的な BLT2 を介したシグナル、細胞応答を明らかにした。本研究で得られた知見はこれまで未知に等しかった BLT2 の生物学的な役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。