

システニルロイコトリエン受容体

金岡 禧 秀

気管支喘息において気管支平滑筋収縮に関わるシステニルロイコトリエンはSRS-A (slow-reacting substance of anaphylaxis)の本体をなす活性分子として同定され、1型の受容体を介してその作用を及ぼす。我々はシステニルロイコトリエン生合成に必須な酵素およびその受容体の遺伝子欠損マウスを作製し、免疫学的炎症疾患モデルを適用した解析を行い、それぞれの役割を明らかにしてきた。その過程で、新たな受容体の存在、そして1型の受容体の機能が複雑に制御されている可能性を見出したのでここに紹介したい。

1. はじめに

ロイコトリエンは5-リポキシゲナーゼによりアラキドン酸から生成される脂質炎症性メディエーターであり、その名は、白血球 (leukocyte) から生成される三つの二重結合 (triene) をもつ物質であることに由来する。

白血球などの細胞が種々の刺激を受けると、ホスホリパーゼA₂が活性化され膜リン脂質よりアラキドン酸を遊離する。アラキドン酸は核膜に局在する5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質 (5-lipoxygenase-activating protein, FLAP) により5-リポキシゲナーゼに提示されその触媒作用により酸素分子が付加されて5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸が生じ、これが脱水反応を経ることで不安定なエポキシドであるロイコトリエンA₄ (LTA₄) が生成する (図1)。マスト細胞、好酸球、好塩基球、マクロファージ、樹状細胞等の骨髄球系細胞では膜タンパク質であるLTC₄合成酵素がLTA₄にグルタチオンを抱合しLTC₄を生成する。

LTC₄はABCトランスポーター (Abcc1, Abcc4) を介して細胞外に放出され、そこでガンマグルタミルトランスベプチダーゼまたはガンマグルタミルロイコトリエンナーゼによりグルタミン酸が遊離されLTD₄となる。LTD₄はさ

らに膜結合型ジベプチダーゼによりグリシンが遊離されより安定なLTE₄へと代謝される。LTC₄, LTD₄, LTE₄はグルタチオン由来のアミノ酸・システインを共有し、気管支平滑筋収縮作用をもつ生理活性物質としてシステニルロイコトリエンと総称される。

また好中球などの細胞では、LTA₄水解酵素によりLTA₄はジヒドロキシロイコトリエンLTB₄に変換され、好中球、好酸球、マクロファージなどの強力な化学誘発因子として作用する (横溝岳彦博士総説参照¹⁾)。

現在、システニルロイコトリエンに対して2種類のGタンパク質共役受容体、CysLT₁受容体、CysLT₂受容体が同定されている。筆者は1998年よりK. Frank Austen教授の研究プログラムに参加し、免疫・炎症反応におけるシステニルロイコトリエンとその受容体の研究に従事している。本稿では、遺伝子欠損マウスを用いた解析から明らかとなってきた、システニルロイコトリエンの機能、新たなシステニルロイコトリエン受容体の存在、そしてCysLT₁受容体の負の制御に関する最近の知見を紹介したい。

2. LTC₄合成酵素

LTC₄合成酵素は18kDaからなる膜タンパク質であり、LTA₄特異的にグルタチオンを抱合させるグルタチオントランスフェラーゼである²⁾。その一次構造上、ミクロソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ (MGST-1, MGST-2, MGST-3), FLAP, ミクロソームプロスタグランジンE₂合成酵素-1らと比較的高い相同性を有する³⁾。MGST-2とMGST-3は試験管内において生体異物 (xenobiotics) のほ

Cysteinyl leukotriene receptors

Yoshihide Kanaoka (Department of Medicine, Harvard Medical School, Division of Rheumatology, Immunology, and Allergy, Brigham and Women's Hospital, Smith Building, Room 626C, One Jimmy Fund Way, Boston, MA 02115, USA)

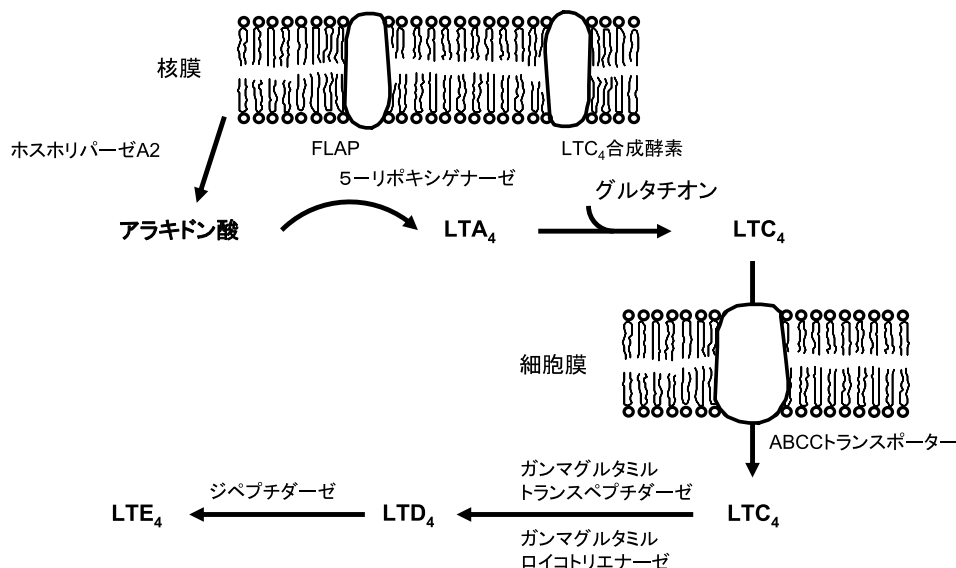


図1 システイニルロイコトリエンの生合成経路

細胞が刺激を受けると、ホスホリパーゼA₂が活性化され、核膜リン脂質よりアラキドン酸が遊離される。アラキドン酸は5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質 (FLAP) により提示され、5-リポキシゲナーゼの作用によりLTA₄が合成される。LTA₄はさらにロイコトリエンC₄合成酵素によりグルタチオンを付加されLTC₄となる。LTC₄はATP依存的に細胞外に放出され、そこでさらにLTD₄、LTE₄へと代謝される。

かにLTA₄も基質とすることが報告されていたため、LTC₄合成酵素が生体内において唯一のLTC₄産成に関わるタンパク質なのかどうかは不明であった。

LTC₄合成酵素遺伝子欠損マウスを用いた解析により、ほとんどの組織(脳、肺、脾臓、消化管)またマスト細胞、マクロファージ、樹状細胞などの血球系細胞においてLTC₄合成酵素が生体内におけるLTC₄産成に必須であることが明らかとなった。また、LTC₄合成酵素欠損による他の生理活性脂質のアラキドン酸代謝物(LTB₄、プロスタグランジン)の亢進はみられず、LTA₄の非酵素的分解のみが亢進することが確かめられた⁴⁾。

次にシステイニルロイコトリエンの生体内での役割を明らかにするため、マクロファージ、マスト細胞活性化後の血管透過性亢進モデルにおいてLTC₄合成酵素遺伝子欠損の影響を調べた。どちらのモデルにおいてもLTC₄合成酵素遺伝子欠損マウスでは血管透過性亢進が約50%抑制されており、システイニルロイコトリエンがアミンやサイトカインと同じく血管透過性亢進に重要な役割を担うことが示唆された⁴⁾。

LTC₄合成酵素の反応機序を明らかにするため、我々はLTC₄合成酵素を大量発現・精製し、宮野・吾郷博士(理化学研究所)との共同研究によりそのX線結晶構造を決定した。LTC₄合成酵素は三量体からなり、三つのグルタチオンが隣接する単量体の隙間に結合して、三つの活性部位を形成するという酵素反応学的に非常に効率のよい構造をしていることが明らかとなった。細胞質型グルタチオン

S-トランスフェラーゼでは、グルタチオンは直線状に結合しチロシンまたはセリン残基により活性化されるのに対し、LTC₄合成酵素ではグルタチオンはU字状に結合し104番目のアルギニン残基により活性化されることが示唆された⁵⁾。最近、アルギニン104がグルタチオン活性化に必須であることが、部位特異的変異酵素の反応速度論的解析等により確認された^{6,7)}。複数のシステイニルロイコトリエン受容体が異なる機能を有すること(後述)から、炎症性疾患の治療薬としてLTC₄合成酵素阻害剤のデザイン・合成への構造的基礎が築かれた。

3. CysLT₁受容体, CysLT₂受容体

薬理的に少なくとも二つのシステイニルロイコトリエン受容体が同定されていたが、特に1型受容体(CysLT₁受容体)は喘息発作における気管支平滑筋収縮に関わるとされ、その阻害剤(Montelukast, Zafirlukast, Pranlukast)が開発され現在臨床医学の現場で使われている。Evansらは1999年、ヒトCysLT₁受容体遺伝子のクローニングに成功し、339アミノ酸からなるGタンパク質共役型受容体であることを明らかにした⁸⁾。薬理的に予想されたようにCysLT₁受容体はLTD₄に最も親和性が高く、その機能はMontelukastなどにより抑制された。ヒトCysLT₁受容体のmRNAおよびタンパク質は気管支平滑筋に最も多く発現しており、さらに肺マクロファージやマスト細胞、好酸球などの骨髄血球系細胞にも発現がみられた。

Evansらは翌年さらにCysLT₁受容体と38%のアミノ酸

相同性をもつヒト CysLT₂ 受容体遺伝子をクローニングした⁹⁾. CysLT₂ 受容体は LTC₄ と LTD₄ に同程度のしかし CysLT₁ 受容体にくらべ1オーダー低い親和性を持ち、Montelukast など CysLT₁ による抑制はみられなかった. ヒト CysLT₂ 受容体の mRNA およびタンパク質は肺胞マクロファージに最も多く発現しており、気管支平滑筋、他の骨髄血球系細胞、さらには心臓プルキンエ細胞、副腎髄質細胞、脳などにも発現がみられた. これらの組織分布から考えて、CysLT₁ 受容体、CysLT₂ 受容体には気管支平滑筋収縮以外の機能があると推測される.

我々は CysLT₁ 受容体、CysLT₂ 受容体の生体内での役割、特に気管支平滑筋収縮以外の機能を明らかにするため、それぞれのノックアウトマウスを作製した.

CysLT₁ 受容体ノックアウトマウスは、LTC₄ 合成酵素ノックアウトマウスでの結果から予想されたように、マクロファージ、mast細胞活性化後の血管透過性亢進モデルにおいて野生型マウスに比べ透過性亢進が約50%抑制された¹⁰⁾. しかしながら、プレオマイシン誘発性肺線維症モデルでは LTC₄ 合成酵素ノックアウトマウスでは肺線維症が抑制されたのに対し、CysLT₁ 受容体ノックアウトマウスでは、システイニルロイコトリエン産生増加を伴う肺線維症の憎悪という予想外の表現型を示した.

LTC₄ 合成酵素ノックアウトマウスと同様に CysLT₂ 受容体ノックアウトマウスでも肺線維症が抑制されたことから¹¹⁾、システイニルロイコトリエン-CysLT₂ 受容体系が慢性炎症および組織線維症の過程に関わることが示唆された. この表現型は組織所見だけでなく、生化学的コラーゲン測定により再現されており、現在、どの細胞が関わっているのかを解析中である.

4. ロイコトリエン E₄ 受容体 (CysLT_ER)

システイニルロイコトリエンの中で LTE₄ は CysLT₁ 受容体、CysLT₂ 受容体に対して弱いアゴニスト作用しか示さない. しかし薬理的・臨床医学的に LTE₄ 特異的受容体の存在が示唆されてきた¹²⁾. モルモット気管平滑筋収縮作用は LTE₄ の方が LTC₄・LTD₄ より低濃度で有効であること、モルモット気管平滑筋のヒスタミンに対する反応性を LTE₄ だけが増強しうること、喘息患者に対して LTE₄ だけが好酸球などの炎症細胞の気管支粘膜への蓄積を誘発すること、アスピリン喘息患者に対して LTC₄・LTD₄ より LTE₄ の気管支平滑筋収縮作用が強いことなどである.

我々は LTE₄ 特異的受容体の存在を調べるため、CysLT₁ 受容体/CysLT₂ 受容体ダブルノックアウトマウスを作製し、薬理的解析を行った¹³⁾. 耳介皮膚での血管透過性亢進反応実験では、CysLT₁ 受容体/CysLT₂ 受容体ダブルノックアウトマウスでは LTE₄ に対する反応性が LTD₄ 又は LTC₄ よりも著しく、野生型マウスの約64倍もの反応を示した (図2). さらに、この反応が、百日咳毒素 (pertussis toxin) や Rho キナーゼ阻害剤により抑制されたことから、Gタンパク質共役型受容体である可能性が示唆された (仮に CysLT_ER と名づけている). 興味深いことに、この LTE₄ によるダブルノックアウトマウスでの血管透過性は CysLT₁ 受容体阻害剤投与によってさらに顕著に亢進した. LTE₄ に対する反応性の亢進は野生型マウス、CysLT₁ 受容体、CysLT₂ 受容体単独のノックアウトマウスではみられないことから、この LTE₄ 受容体は CysLT₁ 受容体、CysLT₂ 受容体によって負に制御されている可能性がある. 現在、我々は LTE₄ 受容体遺伝子の同定・解析を進めている.

CysLT_ER が免疫学的反応による血管透過性亢進にも関

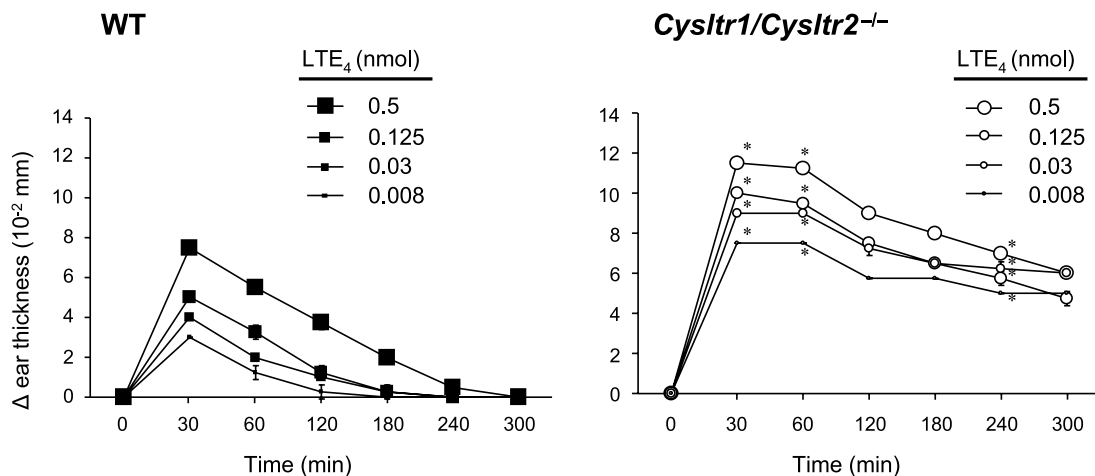


図2 LTE₄ の CysLT_E 受容体を介した組織浮腫

野生型 (WT), CysLT₁/CysLT₂ 受容体ダブルノックアウトマウス (Cysltr1/Cysltr2^{-/-}) の耳介皮膚に LTE₄ を接種し組織浮腫を測定した.

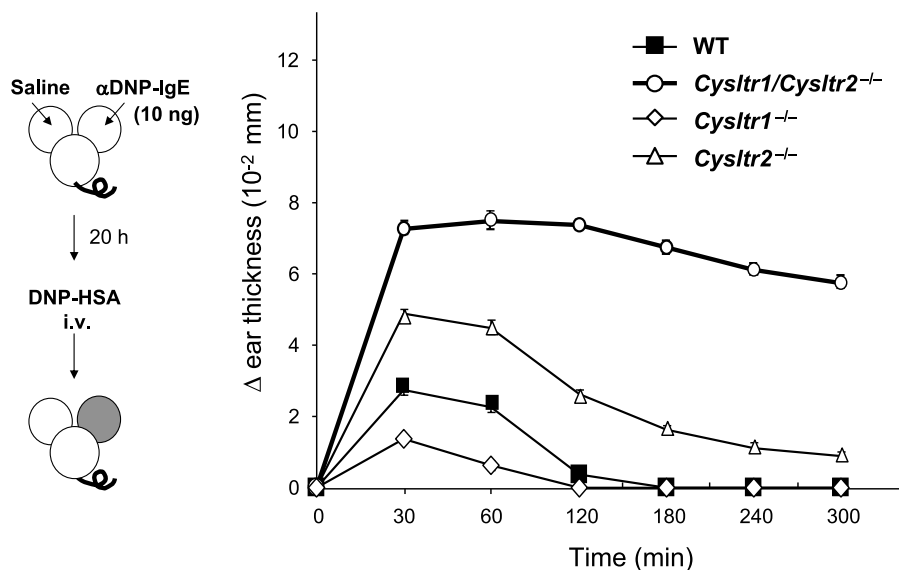


図3 受動皮膚アナフィラキシーにおける CysLT_E 受容体の関与
野生型 (WT), CysLT₁ 受容体ノックアウトマウス (*Cysltr1*^{-/-}), CysLT₂ 受容体ノックアウトマウス (*Cysltr2*^{-/-}), CysLT₁/CysLT₂ 受容体ダブルノックアウトマウス (*Cysltr1/Cysltr2*^{-/-}) を抗ハプテン抗体 (αDNP-IgE) で感作した翌日, ハプテン抗原チャレンジにより, 耳介皮膚浮腫を測定した。

わっているかどうかを調べるため, IgE 依存性受動皮膚アナフィラキシーによる組織浮腫モデル実験を行った (図3)。この反応は LTC₄ 合成酵素ノックアウトマウス, CysLT₁ 受容体ノックアウトマウスでは抑制されることから, システイニルロイコトリエン依存性反応であると言える。ここでは抗ハプテン抗体 (αDNP-IgE) の量を減らして感作しており, この条件下では CysLT₂ 受容体ノックアウトマウスは組織浮腫の亢進がみられ, CysLT₂ 受容体が CysLT₁ 受容体を負に制御していることが示唆される。さらに, CysLT₁ 受容体/CysLT₂ 受容体ダブルノックアウトマウスではさらなる組織浮腫の亢進がみられ, CysLT_ER が関与している可能性が高い。これらの結果はシステイニルロイコトリエン受容体系が複雑に互いを制御していることを強く示唆している。

5. GPR17

オーファン G タンパク質共役型受容体の一つである GPR17 はそのアミノ酸配列が CysLT₁ 受容体 (31%), CysLT₂ 受容体 (36%) と相同性を有することから新たなシステイニルロイコトリエン受容体の候補として挙げられていた。しかし, 我々およびデンマークのグループは, GPR17 発現細胞株は CysLT₁ 受容体発現株や CysLT₂ 受容体発現株と異なり, システイニルロイコトリエンに反応せず (細胞内カルシウム上昇や MAP キナーゼ活性化) 直接の結合も見られないことから, GPR17 はシステイニルロイコトリエン受容体ではないことを報告した^{14,15)}。一方, 我々は GPR17 を CysLT₁ 受容体と共発現させると CysLT₁

受容体の機能を完全に阻害することを見出した¹⁴⁾。そして, その阻害はおそらく GPR17 が CysLT₁ 受容体とヘテロダイマーを形成することで, CysLT₁ 受容体のリガンド結合部位の構造を変化させているためであると思われる。

GPR17 による CysLT₁ 受容体の機能阻害は病態生理学的にも重要である。IgE 依存性受動皮膚アナフィラキシーによる組織浮腫はシステイニルロイコトリエン-CysLT₁ 受容体依存性のマウスモデルであるが, GPR17 ノックアウトマウスではこの組織浮腫が顕著に亢進し, GPR17/CysLT₁ 受容体ダブルノックアウトマウスでは CysLT₁ 受容体単独ノックアウトマウスと同じレベルまで抑制された (図4)¹⁴⁾。

さらにダニ抗原誘発性喘息モデルにおいて, GPR17 ノックアウトマウスは気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数の増加, 肺組織における炎症の憎悪, 免疫グロブリン (IgE, 抗原特異的 IgG1) の増加, ヘルパー T 細胞 2 型 (Th2)・Th17 サイトカインの増加が顕著であった。そして, これらの炎症パラメーターはすべて GPR17/CysLT₁ 受容体ダブルノックアウトマウスでは CysLT₁ 受容体単独ノックアウトマウスと同じレベルまで抑制されていた¹⁴⁾。これらのことより, GPR17 が CysLT₁ 受容体に対して構成的・特異的に負の調節因子として作用することを示している。

6. Th2 免疫における役割

アスペルギルスなどのカビ類やイエダニはアレルギー性喘息における主要な抗原 (アレルゲン) である。しかしこれらのアレルゲンが喘息を引き起こす背景となる特殊な免疫反応 (ヘルパー T 細胞 2 型, Th2) をもたらす機序は不

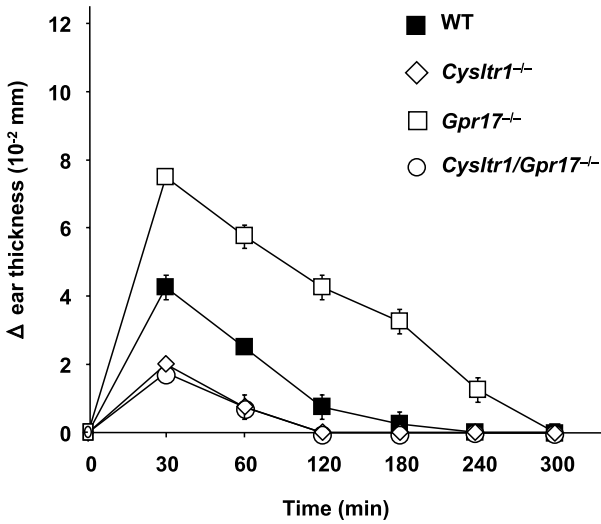


図4 受動皮膚アナフィラキシーにおけるGPR17によるCysLT₁受容体の抑制作用

野生型(WT), CysLT₁受容体ノックアウトマウス(*Cysltr1*^{-/-}), GPR17ノックアウトマウス(*Gpr17*^{-/-}), GPR17/CysLT₁受容体ダブルノックアウトマウス(*Cysltr1/Gpr17*^{-/-})を抗ハプテン抗体(αDNP-IgE)で感作した翌日, ハプテン抗原チャレンジにより, 耳介皮膚浮腫を測定した。

明である。我々は、ダニ抗原中の多糖が樹状細胞上のC型レクチン受容体Dectin-2を活性化してシステイニルロイコトリエンを産生することを見出した¹⁷⁾。ダニ抗原感作マウス喘息モデルにおいてDectin-2受容体の活性化はTh2及びTh17免疫反応を引き起こすことが知られている。ダニ抗原をパルスした後の樹状細胞を非感作マウスに経鼻的に注入することにより感作し, 2週間後ダニ抗原をチャレンジして気道炎症を引き起こすというモデルを用いた。Dectin-2受容体をRNA interferenceによりノックダウンさせた樹状細胞では予想どおりTh2(好酸球浸潤)及びTh17(好中球浸潤)免疫反応が抑制された。一方, LTC₄合成酵素欠損マウス(図5), CysLT₁受容体欠損マウスからの樹状細胞ではTh2反応だけが特異的に抑制された。抑制されたTh2反応はTh2サイトカインを発現しているCD4⁺T細胞の肺への蓄積の減少によることから, システイニルロイコトリエン-CysLT₁受容体系がTh2免疫応答の発現に関わることが示唆された¹⁸⁾。現在, システイニルロイコトリエン-CysLT₁受容体がTh2免疫応答を引き起こす分子・細胞学的メカニズムを研究している。

7. おわりに

システイニルロイコトリエンは, 喘息患者の気管支平滑筋収縮作用をもつことがよく知られていた。しかし, システイニルロイコトリエン生合成酵素・その受容体の各々を欠損するマウスが作製され, その解析が進むにつれ, 新たな病態生理的役割が明らかとなりつつある。システイニル

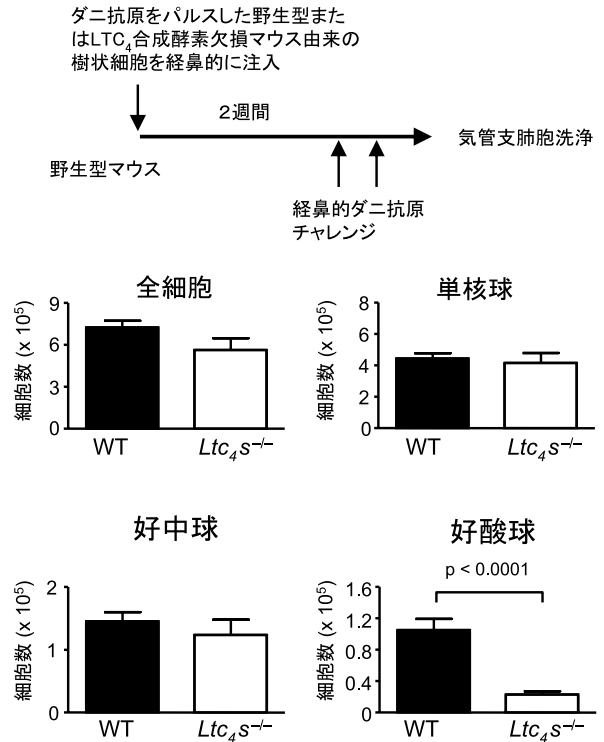


図5 樹状細胞のシステイニルロイコトリエンによるTh2免疫反応

ダニ抗原をパルスした野生型(WT)またはLTC₄合成酵素欠損マウス(*Ltc4s*^{-/-})由来の樹状細胞を経鼻的に注入し, 2週間後ダニ抗原をチャレンジした。2日後気管支肺胞洗浄液を行い洗浄液中の炎症細胞数を解析した。

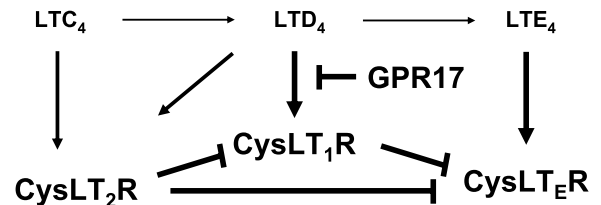


図6 システイニルロイコトリエン受容体のリガンド特異性と制御

ロイコトリエン受容体系が複雑に互いを制御していること, オーフアンGタンパク質共役型受容体GPR17がCysLT₁受容体を負に制御していること(図6)などは他のリガンドに対するGタンパク質共役型受容体にも存在する可能性がある。CysLT₂Rがアスピリン喘息に関わっている可能性は高くその阻害剤の開発は有用かもしれない。これらの視点から, この分野のさらなる発展を期待したい。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は, プリガム婦人病院, リウマチ・免疫・アレルギー部門において研究に携わった多くの研究者と研究協力者の創意と努力の賜物と考えております。また, LTC₄合成酵素の結晶構造解析は理化学研究所

の宮野・吾郷博士らとの共同研究であり、この機会をお借りし深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 横溝岳彦 (2002) 生化学, 74, 1139-1147.
- 2) Yoshimoto, T., Soberman, R.J., Spur, B., & Austen, K.F. (1988) *J. Clin. Invest.*, 81, 866-871.
- 3) Lam, B.K., Penrose, J.F., Freeman, G.J., & Austen, K.F. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7663-7667.
- 4) Kanaoka, Y., Maekawa, A., Penrose, J.F., Austen, K.F., & Lam, B.K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 22608-22613.
- 5) Ago, H., Kanaoka, Y., Irikura, D., Lam, B.K., Shimamura, T., Austen, K.F., & Miyano, M. (2007) *Nature*, 448, 609-612.
- 6) Rinaldo-Matthis, A., Wetterholm, A., Martinez Molina, D., Holm, J., Niegowski, D., Ohlson, E., Nordlund, P., Morgenstern, R., & Haeggström, J.Z. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 40771-40776.
- 7) Saino, H., Ukita, Y., Ago, H., Irikura, D., Nisawa, A., Ueno, G., Yamamoto, M., Kanaoka, Y., Lam, B.K., Austen, K.F., & Miyano, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 16392-16401.
- 8) Lynch, K.R., O'Neill, G.P., Liu, Q., Im, D.S., Sawyer, N., Metters, K.M., Coulombe, N., Abramovitz, M., Figueroa, D.J., Zeng, Z., Connolly, B.M., Bai, C., Austin, C.P., Chateaufneuf, A., Stocco, R., Greig, G.M., Kargman, S., Hooks, S.B., Hosfield, E., Williams, D.L., Jr., Ford-Hutchinson, A.W., Caskey, C.T., & Evans, J.F. (1999) *Nature*, 399, 789-793.
- 9) Heise, C.E., O'Dowd, B.F., Figueroa, D.J., Sawyer, N., Nguyen, T., Im, D.S., Stocco, R., Bellefeuille, J.N., Abramovitz, M., Cheng, R., Williams, D.L., Jr., Zeng, Z., Liu, Q., Ma, L., Clements, M.K., Coulombe, N., Liu, Y., Austin, C.P., George, S.R., O'Neill, G.P., Metters, K.M., Lynch, K.R., & Evans, J.F. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 30531-30536.
- 10) Maekawa, A., Austen, K.F., & Kanaoka, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 20820-20824.
- 11) Beller, T.C., Maekawa, A., Friend, D.S., Austen, K.F., & Kanaoka, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 46129-46134.
- 12) Austen, K.F., Maekawa, A., Kanaoka, Y., & Boyce, J.A. (2009) *J. Allergy Clin. Immunol.*, 124, 406-414.
- 13) Maekawa, A., Kanaoka, Y., Xing, W., & Austen, K.F. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 16695-16700.
- 14) Maekawa, A., Balestrieri, B., Austen, K.F., & Kanaoka, Y. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 11685-11690.
- 15) Benned-Jensen, T. & Rosenkilde, M.M. (2010) *Br. J. Pharmacol.*, 159, 1092-1105.
- 16) Maekawa, A., Xing, W., Austen, K.F., & Kanaoka, Y. (2010) *J. Immunol.*, 185, 1846-1854.
- 17) Barrett, N.A., Maekawa, A., Rahman, O.M., Austen, K.F., & Kanaoka, Y. (2009) *J. Immunol.*, 182, 1119-1128.
- 18) Barrett, N.A., Rahman, O.M., Fernandez, J.M., Parsons, M.W., Xing, W., Austen, K.F., & Kanaoka, Y. (2011) *J. Exp. Med.*, 208, 593-604.