

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 脂質メディエーターのdual receptor系と神経機能

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者： 清水 孝雄 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

主たる研究参加者： 和泉 孝志 (群馬大学医学部 教授)

島田 厚良 (愛知県心身障害者コロニー 室長)

3. 研究内容及び成果：

これまで、多数の新規分子を発見してきた。しかし、脂質メディエーターには多数の orphan receptors が存在するにも拘わらず、そのリガンドを同定するのは困難であった。今回、その一つ P2y9 のリガンドを発見した。この成功の原因は探索手法における工夫で、まず、受容体の N 末にタグ（蛍光色素）を付し、細胞膜に受容体が発現した細胞のみを回収し、さらに、リガンドとの結合により、活性化する 2nd messenger タイプと無関係にその活性を検出できる手法を用いた。その結果、LPA をリガンドとする P2y9 を見いだした。この受容体は脳や生殖器系に多く発現し、これまで知られている3種の LPA 受容体とはアミノ酸配列の相同性が見られなかった。

脂質メディエーター分子の脳内分布、細胞内分布、輸送に関して、cPLA2 $\alpha$ の動態を解析した。cPLA2 $\alpha$  は静止時には細胞質に存在するが、Ca<sup>2+</sup>刺激により、核膜、小胞体に蓄積する。cPLA2 に GFP を融合し、神経細胞に transfection させると、静止時には細胞体、樹状突起の細胞質に様に分布する。しかし、グルタミン酸で刺激すると、数分後には、cPLA2 は一定の間隔をもってパッチ状分布を示す。このような分布の変化は GFP 分子のみでは見られない。この cPLA2 $\alpha$  分布の変化は、スパインの分布と関連するのではないかと推測しているが、その詳細は、現在、検討中である。in vivo の小脳組織標本では、cPLA2 $\alpha$  は皮質に分布し、特に、Purkinje 細胞 (PC) に強い発現が見られ、この発現は樹状突起の発達と共に増強する。その細胞内発現が刺激により、どのように変化するかを今後、検討する予定である。分子の in vivo の局在に関しては、ロイコトリエン C4 の生成酵素が視床下部、脳下垂体後葉に特異的に存在することが観察された。この機能的意義の解析を検討中である。

個体レベルでの脂質メディエーターの機能はノックアウト動物を用いて解析した。Lis-1 遺伝子の欠損は脳形成の異常を示すが、Lis-1 は血小板活性化因子の分解酵素 (アセチルヒドラーゼ  $\beta$  ; PAF-AH $\beta$ ) の遺伝子と同一である。そこで、PAF receptor 欠損マウスを作製すると、小脳原基の発達の遅延が見られた。この時、胎生期の小脳顆粒層での細胞移動速度の低下が示唆された。in vitro においても、顆粒細胞の移動速度は PAF receptor<sup>-/-</sup> において低下し、また、野生型でもその速度は PAF receptor blocker の投与により低下した。したがって、PAF 受容体からのシグナルは Lis-1 を介して、神経細胞移動に関与していることが示唆される。

cPLA2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>では虚血性再還流の病態モデルでの変化が著明で、神経可塑性にも変化が見られ、睡眠異常も観察された。虚血性再還流によって見られる脳梗塞の程度は cPLA2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>において軽減し、正常動物におけるこの効果は cPLA2 $\alpha$  inhibitor の投与によってブロックされた。また、oligodendrocytes 由来のオリゴ糖タンパク (MOG) の反復注入によって作製した多発性硬化症モデルでは発症あるいは症状は cPLA2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>において明らかな軽減が見られた。この時、炎症性細胞の産生、集合の程度の低下が見られ、また、microglia の産生、凝集の程度も低下していた。microglia は脱髄の原因と考えられる。この過程において、ロイコトリエン D4 が microglia の活性化に参与し、また、PAF は microglia の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を上昇させる結果も得られた。cPLA2 $\alpha$  はこれらの炎症性因子の産生に関与すると考えられる。

c P L A 2  $\alpha$ <sup>-/-</sup>では、海馬C1領域のLTD が消失あるいは低下する。この機構は不明であるが、ノックアウト動物のLTD低下はアラキドン酸の投与によって回復するから、LTDにアラキドン酸あるいはその代謝物の関与が示唆される。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

多数の脂質メディエーター及びそのレセプター分子の発見とその機構解析の productivity は極めて印象的である。研究は注意深い計画に基づいて着実に進められており、脂質メディエーター分子の生理学的、病態生理学的意義を明らかにしただけでなく、神経疾患との関連を体系的に解析して顕著な成果を挙げている点も高く評価できる。評価委員全員の意見が、本研究の結果は国内外の類似研究の成果と水準と比較して、非常に高いレベルにあり、十分に満足できる展開を示した業績であるという点で一致した。

研究代表者のグループの高いレベルの研究活動と比較して、サブグループの寄与に関しては複数の委員から批判が寄せられた。その批判として、次の3点が指摘された。(1) 脳形態グループは分子の細胞内分布の詳細を明確にするために、電子顕微鏡レベルの研究を積極的に導入すべきである。(2) 成果報告で記載された電気生理学的解析は不十分な印象を免れず、行動解析と共にレベルアップの努力が必要である(ちなみに、電気生理の解析が単純すぎるという点は、2003年1月17日の総括訪問の記録にも記載されている)。(3) ショウジョウバエのホスホリパーゼD (PLD) の強制発現による感覚器発生過程の異常に関しては、メカニズムについての解析が全く試みられていない。これらの状況について、他の一評価委員は、「サブグループとの連携による研究の進展は見られず、むしろ、代表者グループだけで十分な成果を挙げている」と記載している。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究は脂質メディエーターの脳における機能の解析という新規な発想に基づいている。この研究目標に沿って、順調に多大な成果を挙げ、5年間の研究において、レベルの

高い英文論文、60編以上を発表した。これらの研究では、多数の主要な脂質産生酵素、受容体分子をクローニングし、そのノックアウト動物の解析により、機能の推測を試みている。その分子の種類により、個々の提案課題は多岐に亘っているが、いずれの課題も綿密な計画に基づいたものであり、今後の有用な情報が期待される。さらに、リガンドの知られていないGタンパク共役型受容体（孤児受容体； orphan receptors)を対象として、その脂質リガンドの探索を実施している。これらのアプローチはすべて、独創的であり、グループ全体としての activity も高く評価される。

#### 4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

清水 孝雄： Ernst Schering Award（ドイツ科学賞） 2000年  
日本医師会医学賞 2000年  
持田記念学術賞 2001年  
武田医学賞 2003年  
横溝 岳彦： 日本生化学会奨励賞 2001年