

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19390018

研究課題名（和文） 生理活性リゾリン脂質の機能解明

研究課題名（英文） Patho-physiological role of bioactive lysophospholipids

研究代表者 青木 淳賢（AOKI JUNKEN）

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20250219

研究成果の概要：

リゾリン脂質の新規生理機能の解明を行い、リゾホスファチジン酸（LPA）が新たな LPA 受容体を介し内皮細胞の接着を負に制御することを見だし、LPA の内皮細胞制御の新たなメカニズムを提唱した。また、新規リゾホスファチジルセリン（LPS）受容体 GPR34 が未熟マスト細胞に発現し、未熟マスト細胞のカルシウム応答に関与すること、GPR34 発現細胞は LPS に対して走化性を示すことを見いだした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リゾホスファチジン酸、リゾホスファチジルセリン、受容体

1. 研究開始当初の背景

この10年の間に、リゾ体のリン脂質（リゾリン脂質）が生理的に重要な機能を持つことが次々に明らかにされ、第2世代の生理活性脂質として、非常に注目されている。このような生理活性リゾリン脂質に、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1リン酸（S1P）、リゾホスファチジルセリン（LPS）がある（図1）。

この中で、我々は、特に、LPA と LPS の産生機構と作用機構に関する研究を進めている。

リン脂質としては最も単純な構造を持つ LPA は *in vitro* で様々な細胞の増殖・運動性を促進するなど多彩な生理活性有している。また、LPS は極性頭部にアミノ酸の一種であるセリンを持つリゾリン脂質であり、*in vitro* でマスト細胞の活性

化の促進因子であることが示されている。我々はこれまで LPA, LPS の受容体・産生酵素を同定し、これら分子の KO マウスの解析を通じ、リゾリン脂質が生理的或いは病的に非常に重要な生理活性脂質であることを示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果のさらなる発展系として、生理活性リゾリン脂質の生体内機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者らが独自に作製してきた、リゾリン脂質の産生酵素、受容体のノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを解析することにより、生理活性リゾリン脂質の生理・病態機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) LPA の内皮細胞における新規機能

発生期や腫瘍内部等の生理的・病的条件では、既存の血管から新たな血管が作られる血管リモデリングが見られる。その巧妙な機構の一部は、血管内皮細胞間接着の変化に依ることが想定されているものの、その根拠となるべき詳細な分子機構については不明な点が多い。

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、その特異的な G 蛋白質共役型受容体を介して、細胞の増殖など多彩な生理作用を示すことが知られる生理活性脂質である。当研究室では LPA 産生酵素オートタキシン (ATX) の KO マウスが、胎生期に重篤な血管形成異常を示すこと、*in vitro* で LPA が VE-カドヘリンを介して血管内皮細胞の接着抑制効果を示すことが明らかとなった。ATX KO マウスの表現型は既存の LPA 受容体 (LPA1-3) の KO マウスの表現型のいずれとも異なっていることより、血管内皮細胞上に接着抑制効果に関与する新規の LPA 受容体の存在が示唆された。そこで、私はこの接着抑制効果に関与する血管内皮細胞上の LPA 受容体の同定をバイオケミカ

ル的手法によって試みた。

実験には現在までに報告されている 6 つの LPA 受容体 LPA1-6 に対して様々な受容体特異性を示す約 50 種類の LPA アナログを用いた。接着抑制効果は、VE-カドヘリンをコートしたプレートへの血管内皮細胞の結合を評価することによって行った。その結果、(1) LPA3, LPA6 アゴニストである OMPT は、LPA よりも強力に血管内皮細胞の接着を抑制すること、(2) 血管内皮細胞には、主に LPA4, LPA6 が発現していることを見出した。以上の結果により、OMPT の HUVEC に対する接着抑制効果は LPA6 を介することが示された。本研究内容を、KO マウス等を用いて *in vivo* で証明し、血管リモデリング機構における LPA シグナリングの作用機序の全容を解明することが今後の目標である。

(2) LPS 受容体 GPR34 ノックアウトマウスの解析

リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン (LPS) はマスト細胞の脱顆粒促進、神経細胞の突起伸展、T 細胞の増殖抑制などの作用を示す生理活性脂質である。最近オーファン GPCR の一つ GPR34 が LPS 応答性を示すことが報告された。従って LPS が GPR34 を介して生理作用を発揮している可能性がある。そこで私は、GPR34 ノックアウト

(KO) マウスを用いて GPR34 を介した LPS の生体内機能を調べることにした。KO マウスは翻訳領域全てを含むエクソン 3 をネオマイシン耐性遺伝子に置換して作製された。まず、KO マウスはメンデルの法則に従って生まれてくることを確認したが、目立った表現型は認められなかった。一方、定量 PCR による発現解析から未成熟な骨髓由来培養マスト細胞 (BMMC) で GPR34 の発現が高いことが明らかとなった。この結果を基に GPR34 のマスト細胞における機能に着目して解析を行った。

まず野生型 (WT) マウスと KO マウス由来の BMMC の LPS 反応性を比較し、WT マウス由来 BMMC で LPS により誘導される Ca²⁺応答が KO マウス由来の BMMC で消失していることを確認した。また、マスト細胞数・形態 (組織切片のトルイジンブルー染色で評価)、マスト細胞の LPS による脱顆粒の促進効果を検討したが WT と KO マウスで大きな差は見られなかった。最近、LPS 産生酵素の PS-PLA1 の発現量が炎症時に上昇することが分かってきた。今後は病理学的側面から GPR34 の機能解析を行っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Makide K, Kano K, Kitamura H, Arima N, Aoki J. Lysophospholipid mediators. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 54, 29-39. (2009) (査読無)

2. Nakamura, K., K. Igarashi, K. Ide, R. Ohkawa, S. Okubo, H. Yokota, A. Masuda, N. Oshima, T. Takeuchi, M. Nangaku, S. Okudaira, H. Arai, H. Ikeda, Aoki J, and Y. Yatomi. Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clin. Chim. Acta*. 388, 51-8 (2008) (査読有)

3. Inoue M, Ma L, Aoki J, Ueda H. Simultaneous stimulation of spinal NK1 and NMDA receptors produces LPC which undergoes ATX-mediated conversion to LPA, an initiator of neuropathic pain. *J Neurochem*. 107, 1556-1565. (2008) (査読有)

4. Ohuchi H, Hamada A, Matsuda H, Takagi A, Tanaka M, Aoki J, Arai H, Noji S. Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during

mouse early development.

Dev Dyn. 237, 3280-3294. (2008) (査読有)

5. Nakasaki T, Tanaka T, Okudaira S, Hirose M, Umemoto E, Otani K, Jin S, Bai Z, Hayasaka H, Fukui Y, Aozasa K, Fujita N, Tsuruo T, Ozono K, Aoki J and Miyasaka M. Involvement of the Lysophosphatidic Acid-Generating Enzyme Autotaxin in Lymphocyte-Endothelial Cell Interactions *Am. J. Pathol*. 237, 3280-3294 (2008) (査読有)

6. Kano K, Arima N, Ohgami M, and Aoki J LPA and its analogs-attractive tools for elucidation of LPA biology and drug development (review).

Curr. Med. Chem. 15, 2122-2131 (2008) (査読有)

7. Masuda A, Nakamura K, Izutsu K, Igarashi K, Ohkawa R, Jona M, Higashi K, Yokota H, Okudaira S, Kishimoto T, Watanabe T, Koike Y, Ikeda H, Kozai Y, Kurokawa M, Aoki J, Yatomi Y. Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma.

Br J Haematol. 143, 60-70 (2008) (査読有)

8. Aoki J, Inoue A, and Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production (review).

Biochim. Biophys. Acta. 1781, 513-518 (2008)

(査読有)

9. Kanamori T, Inoue T, Sakamoto T, Gengyo-Ando K, Tsujimoto M, Mitani S, Sawa H, Aoki J, and Arai H.

Beta-catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions.

EMBO J. 27, 1647-1657 (2008) (査読有)

10. Inoue M, Ma L, Aoki J, Chun J, Ueda H. Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain.

Mol Pain. 4, 6-6 (2008) (査読有)

11. Nakamura K, Nangaku M, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y. Analysis of serum and urinary lysophospholipase D/autotaxin in nephrotic syndrome.

Clin Chem Lab Med. 46, 150-151 (2008) (査読有)

12. Nakamura K, Igarashi K, Ide K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Masuda A, Oshima N, Takeuchi T, Nangaku M, Okudaira S, Arai H, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y.

Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation.

Clin Chim Acta. 388, 51-58 (2008) (査読有)

13. Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H.

Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo.

J. Biol. Chem. 283, 1628-1636 (2008) (査読有)

14. Inoue, A., and Aoki J. Phospholipase A1 - structure, distribution and function -. *Future Lipidology.* 1, 699-700. (2007) (査読有)

15. Hama, K., Aoki J., A. Inoue, T. Endo, T. Amano, R. Motoki, M. Kanai, X. Ye, J. Chun, N. Matsuki, H. Suzuki, M. Shibasaki, and H. Arai. Embryo Spacing and Implantation Timing Are Differentially Regulated by LPA3-Mediated Lysophosphatidic Acid Signaling in Mice. *Biol. Reprod.* 77, 954-959 (2007) (査読有)

16. Aoki J., A. Inoue, K. Makide, N. Saiki, and H. Arai. 2007. Structure and function of extracellular phospholipase A(1) belonging to the pancreatic lipase gene

family. *Biochimie.* 89, 197-204 (2007) (査読有)

17. Mori, K., J. Kitayama, Aoki J., Y. Kishi, D. Shida, H. Yamashita, H. Arai, and H. Nagawa. Submucosal connective tissue-type mast cells contribute to the production of lysophosphatidic acid (LPA) in the gastrointestinal tract through the secretion of autotaxin (ATX)/lysophospholipase D (lysoPLD). *Virchows Arch.* 451:47-56. (2007) (査読有)

18. Morikawa, R., M. Tsujimoto, H. Arai, and Aoki J. Phospholipase A(1) assays using a radiolabeled substrate and mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 434, 1-13 (2007) (査読有)

19. Ohuchi, H., Y. Hayashibaral, H. Matsuda, M. Onoi, M. Mitsumori, M. Tanaka, Aoki J, H. Arai, and S. Noji. Diversified expression patterns of autotaxin, a gene for phospholipid-generating enzyme during mouse and chicken development. *Dev. Dyn.* 236, 1134-1143 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 中永景太、田中将之、望月直樹、金井求、柴崎正勝、新井洋由、青木淳賢「VE-カドヘリンの接着抑制に関わる内皮細胞上のLPA受容体の解析」BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008.12.9-12、神戸、神戸ポートアイランド)

2. 巻出久美子、佐藤侑介、北村一、秋山るみ、青木淳賢「リゾホスファチジルセリン受容体 GPR34 の解析」BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008.12/9-12、神戸、神戸ポートアイランド)

3. 青木淳賢「生理活性リゾリン脂質の生体内機能 リゾリン脂質メディエーターの生理・

病態機能」第 30 回東北薬学セミナー 特別講演 (2008. 12. 5、仙台、江陽グランドホテル)

4. 可野邦行、遠藤智子、池下和樹、長谷川英之、金井浩、Jerold Chun、青木淳賢「リゾホスファチジン酸受容体 LPA3 の降圧メカニズムの解析」ファーマ・バイオフォーラム 2008 (2008. 11. 29-30、渋谷、日本薬学会長井記念ホール)

5. 有馬直明、井上飛鳥、巻出久美子、青木淳賢「PS-PLA1 と mPA-PLA1a の基質特異性におけるループ構造の関与」第 47 回日本薬学会東北支部大会 (2008. 10. 26、岩手、岩手医科大学薬学部)

6. 青木淳賢「メディエーターとしての生体膜脂質の機能 - リゾリン脂質メディエーターの生理・病態機能」生体パーオキシド研究会特別講演 (2008. 8. 30、仙台、勝山館)

7. 青木淳賢「生理活性リゾリン脂質 -新しいドラッグターゲット」東北大学バイオシンポジウム (2008. 06. 6、東京、サピアタワー)

8. 青木淳賢、奥平真一、新井洋由「リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの初期炎症過程における機能」第 50 回日本脂質生化学会 (2008. 6. 5-6、徳島、徳島県郷土文化会館)

9. 青木淳賢「リゾホスファチジン酸受容体 LPA3 の新規生理機能」第 5 回GPCR研究会シンポジウム (2008. 5. 9-10、東京、日本科学未来館)

10. 青木淳賢「リゾホスファチジン酸の病態・生理機能」BMB2007 (2007/12/11-15、横

浜、パシフィコ横浜)

11. 巻出久美子、新井洋由、青木淳賢「リゾホスファチジルセリンによるマスト細胞活性化機構の解析」BMB2007 (2007. 12/11-15、横浜、パシフィコ横浜)

12. 青木淳賢「生理活性脂質研究の新しい流れ」生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2007/11/26-27、仙台)

13. Junken Aoki 「Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid」The 3rd International conference on phospholipases A2 and lipid mediators (2007/5/9-12, Sorrento, Italy)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 淳賢 (AOKI JUNKEN)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20250219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし