

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03366

研究課題名(和文) 活性化リンパ球における生理活性脂質リゾホスファチジルセリンの産生経路の解明

研究課題名(英文) Identification of synthetic pathway for lysophosphatidylserine in activated lymphocytes.

研究代表者

青木 淳賢 (Aoki, Junken)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：20250219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：今年度、マウス担がんモデルを用いて、抗腫瘍免疫におけるLPS1の機能解析を行なった。マウスの両脇腹へマウス大腸癌由来細胞MC38を皮下投与し、経時的な腫瘍成長をモニターした。野生型マウスと比較してLPS1欠損マウスでは、担がん10日後から16日後にかけて、腫瘍体積の顕著な増大が観察された。また、LPS1作動薬投与群では溶媒投与群と比較して、腫瘍増大が有意に抑制された。また、M1投与群の腫瘍組織ではCD45+免疫細胞の数が有意に増加していた。以上の結果から、内在的なLPS1シグナルが抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。今後、LPS1シグナルが抗腫瘍効果を発揮するメカニズム解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫を高める、免疫チェックポイント療法が期待されている。本研究の成果は、従来の免疫チェックポイント療法の標的とは全く異なるGPCRを標的とした抗がん剤開発が可能であることを強く示唆する。今後、化合物、抗体等を用い、LPS1/GPR34を標的とした抗がん剤開発が加速されることが期待される。

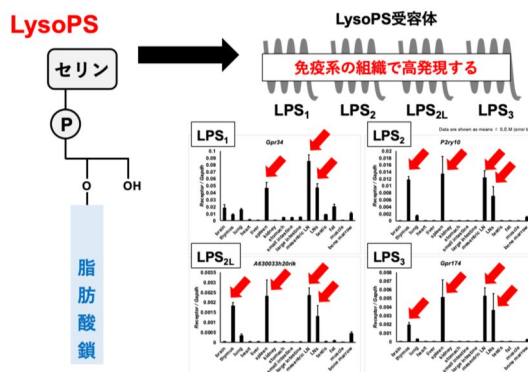
研究成果の概要(英文)：This year, the function of LPS1 in anti-tumour immunity was analysed in a murine basal carcinoma model. Mouse colon cancer-derived cells MC38 were subcutaneously injected into the flanks of mice and tumour growth was monitored over time. A significant increase in tumour volume was observed from 10 to 16 days after carcinoma carriage in LPS1-deficient mice compared to wild-type mice. Tumour growth was significantly suppressed in the LPS1 agonist group compared to the solvent group. The number of CD45+ immune cells was also significantly increased in the tumour tissue of the M1-treated group. These results indicate that intrinsic LPS1 signalling exhibits anti-tumour activity. Further mechanistic analysis of the anti-tumour effect of LPS1 signalling will be carried out in the future.

研究分野：免疫、がん免疫

キーワード：リゾリン脂質 免疫 がん免疫 GPCR

1. 研究開始当初の背景

リン脂質の1種であるホスファチジルセリン(PS)はPS特異的ホスホリパーゼ(PS-PLA₁)によって脂肪酸を1本しか持たないLysoPSへと代謝される。これまでに同定されたLysoPS受容体群は脾臓、リンパ節などの免疫系組織に高く発現し(図1)、免疫応答の制御に関与することが明らかとなりつつある。また、LysoPSのGPCR型受容体(LPS₁, LPS₂, LPS₃)が3種類同定され、いずれもが免疫系組織に高発現している。これらの知見より、LysoPSはPS-PLA₁により産生され、3種類GPCRを介し機能することが予測される。



【図1】 LysoPS受容体は免疫系組織に高発現する

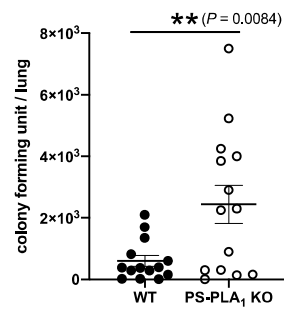
2. 研究の目的

最近、興味深いことに、COVID-19患者で血清中のPS-PLA₁、LysoPSレベルが上昇することが見出されており(Shimura et al., *Cell Mol Immunol.*, 2021; Kurano et al., *Clin Transl Med.*, 2022)、感染症免疫におけるPS-PLA₁-LysoPS軸の機能が想定される。これらを踏まえ我々は、肺炎球菌感染症をモデルとして、感染症免疫におけるPS-PLA₁-LysoPS-LysoPS受容体軸の機能解明を試みた。

3. 研究の方法と研究成果

3.1 リポテイコ酸の経鼻投与により、肺胞内にPS-PLA₁が誘導されLysoPS量が顕著に増加する

細菌の構成成分であるリポテイコ酸(LTA)をマウスに経鼻投与することで、細菌感染により生じる免疫応答を模倣することができる。LTA投与6時間後をピークとして肺胞内にPS-PLA₁が発現誘導されること、またこの時PS-PLA₁依存的にLysoPSが産生されることを、それぞれELISA、LC-MS/MSを用い確認した。



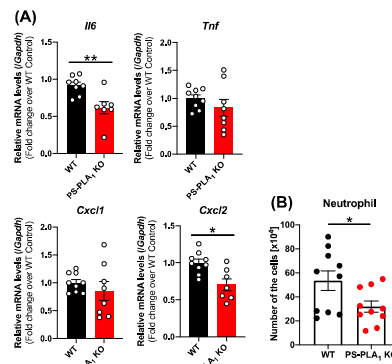
【図2】 接種24時間後の肺に残存する菌数がPS-PLA₁ KOで有意に増加する

3.2 PS-PLA₁ KO マウスでは細菌クリアランス能が顕著に低下する

PS-PLA₁-LysoPS軸の感染免疫応答における機能を明らかにするため、私はPS-PLA₁ KOマウスに肺炎球菌感染モデルを適用した。図2に示すように、PS-PLA₁ KOマウスでは接種24時間後の肺に残存する菌数が野生型と比較して有意に増加していた。したがって、PS-PLA₁-LysoPS軸は宿主の細菌クリアランス能を増強する機能を有することが示唆された。その機序を解明するため、以下に示す解析を実施した。

3.3 PS-PLA₁ KO マウスでは炎症時におけるサイトカイン発現が減弱し、浸潤する好中球の数が減少する

LTA投与により感染免疫応答を惹起する系において、免疫応答初期のサイトカイン発現を定量PCRにより解析したところ、PS-PLA₁ KOマウスでは炎症性サイトカイン(*Il6*, *Tnf*)および好中球誘導因子(*Cxcl1*, *Cxcl2*)の発現が減弱する

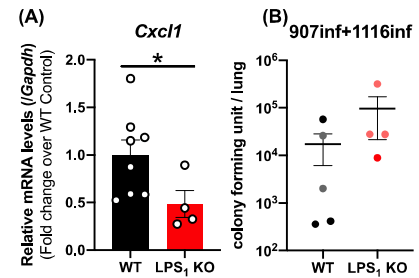


【図3】 PS-PLA₁ KOではサイトカイン発現、好中球の浸潤が低下する

ことが見出された(図 3A)。さらに、肺腔内に存在する細胞の Flow cytometry 解析により PS-PLA₁ KO マウスでは肺胞内に浸潤する好中球数が減少することを見出した(図 3B)。

3.4 LPS₁ KO マウスは PS-PLA₁ KO マウスと同様の表現型を示す

LysoPS 受容体の欠損マウスについても前項と同様の解析を実施したところ、LysoPS 受容体の 1 つである LPS₁ の欠損マウスでは感染免疫応答初期の *Cxcl1* の発現が减弱し(図 4A)、肺炎球菌クリアランス能が减弱する(図 4B)という PS-PLA₁ KO マウスと同様の表現型が見出された。この結果より、PS-PLA₁ が産生した LysoPS は LPS₁ に作用することで宿主の感染免疫応答を活性化する可能性が示唆された。



【図4】 LPS₁ KOはPS-PLA₁ KOと同様の表現型を示す

3.5 LPS₁ は肺に常在するマクロファージに高発現する

肺において LPS₁ を高発現する細胞を同定するため、NCBI GEO データベースに公開されている single cell RNA-seq のデータ(出典: Strunz et al., *Nat Commun.*, 2020)を再解析した。図 5 に示すように、LPS₁ は肺の間質領域に常在するマクロファージ(Interstitial Macrophage)に高発現することが見出された。そこでマクロファージのサイトカイン産生応答における LPS₁ シグナルの意義を解析した。野生型あるいは LPS₁ KO マウスの骨髄由来マクロファージを Lipopolysaccharide により刺激したところ、LPS₁ KO ではサイトカインの発現が减弱することが見出され、前項に示す *in vivo* の結果とあわせて LPS₁ シグナルがマクロファージのサイトカイン産生を促進する可能性が示唆された。

本研究において私は、細菌感染時に誘導される PS-PLA₁ は LysoPS を産生し、LysoPS が肺に常在するマクロファージ上の LPS₁ に作用することで、サイトカイン産生とそれに続く好中球浸潤の増強へとつながり、結果として感染に対して防御的に機能する可能性を明らかにした(図 6)。以上の結果を踏まえると LPS₁ は感染症の新規創薬標的となりえる。今後は LPS₁ 作動薬の抗感染症薬としての可能性を追求するとともに、PS-PLA₁-LysoPS 軸が感染免疫応答を活性化する機序について、特に Interstitial Macrophage に着目した詳細な解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sayama Misa, Uwamizu Akiharu, Otani Yuko, Inoue Asuka, Aoki Junken, Sekijima Masakazu, Ohwada Tomohiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Membrane Phospholipid Analogues as Molecular Rulers to Probe the Position of the Hydrophobic Contact Point of Lysophospholipid Ligands on the Surface of G-Protein-Coupled Receptor during Membrane Approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakawatari Kazuki, Kurano Makoto, Araki Osamu, Nishikawa Masako, Shimamoto Satoshi, Igarashi Koji, Aoki Junken, Murakami Masami, Yatomi Yutaka	4. 巻 503
2. 論文標題 Elevated phosphatidylserine-specific phospholipase A1 level in hyperthyroidism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.01.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Sho, Sayama Misa, Uwamizu Akiharu, Jung Sejin, Ikubo Masaya, Otani Yuko, Kano Kuniyuki, Omi Jumpei, Inoue Asuka, Aoki Junken, Ohwada Tomohiko	4. 巻 63
2. 論文標題 Non-naturally Occurring Regio Isomer of Lysophosphatidylserine Exhibits Potent Agonistic Activity toward G Protein-Coupled Receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 9990 ~ 10029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.0c01126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sayama Misa, Uwamizu Akiharu, Otani Yuko, Inoue Asuka, Aoki Junken, Sekijima Masakazu, Ohwada Tomohiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Membrane Phospholipid Analogues as Molecular Rulers to Probe the Position of the Hydrophobic Contact Point of Lysophospholipid Ligands on the Surface of G-Protein-Coupled Receptor during Membrane Approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakawatari Kazuki, Kurano Makoto, Araki Osamu, Nishikawa Masako, Shimamoto Satoshi, Igarashi Koji, Aoki Junken, Murakami Masami, Yatomi Yutaka	4. 巻 503
2. 論文標題 Elevated phosphatidylserine-specific phospholipase A1 level in hyperthyroidism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.01.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurano Makoto, Kano Kuniyuki, Hara Masumi, Tsukamoto Kazuhisa, Aoki Junken, Yatomi Yutaka	4. 巻 476
2. 論文標題 Regulation of plasma glycerol-lysophospholipid levels by lipoprotein metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3565 ~ 3581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190498	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawada Tetsuji, Kurano Makoto, Shirai Harumi, Iwasaki Yukiko, Tahara Koichiro, Hayashi Haeru, Igarashi Koji, Fujio Keishi, Aoki Junken, Yatomi Yutaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Serum phosphatidylserine specific phospholipase A1 as a novel biomarker for monitoring systemic lupus erythematosus disease activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 2059 ~ 2066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.13689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 上水 明治、北村 大介、青木 淳賢
2. 発表標題 in vitro B細胞培養系を用いたLysoPSIによるB細胞活性化の抑制機構の解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西角駿、深見郁也、近江純平、青木淳賢
2. 発表標題 リンパ節においてリゾホスファチジルセリンはLPS1を介して適応免疫を活性化する
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上水 明治、新上 雄司、井上 飛鳥、北村 大介、青木 淳賢
2. 発表標題 230. リゾホスファチジルセリンによるB細胞の活性化抑制機構と活性化B細胞におけるその分泌様式の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上水明治、新上雄司、井上飛鳥、可野邦行、青木淳賢
2. 発表標題 リゾホスファチジルセリンはオートクライン/パラクライン的に作用し活性化B細胞の凝集塊形成を抑制する
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤美希、近江純平、深見郁也、新上雄司、可野邦行、青木淳賢
2. 発表標題 腫瘍免疫におけるリゾホスファチジルセリンの機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junken Aoki
2. 発表標題 Autocrine lysophosphatidylserine signaling in outer follicles negatively regulates B cell expansion
3. 学会等名 FASEB Summer Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関