

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390015

研究課題名（和文） 生理活性リゾリン脂質生体内機能の包括的理解

研究課題名（英文） Comprehensive analyses 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（和文）：

リゾホスファチジン酸（LPA）は第2世代の脂質メディエーターとして着目されている。LPAは血液中でオートタキシン（ATX）の作用で常に産生されているが、その機能は不明であった。本研究において、血中LPAは迷走神経（副交感神経）の活性を制御する新規因子であることがわかった。また、その作用は3番目のLPA受容体であるLPA₃を介することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Lysophosphatidic acid (LPA) is one of the most attractive lipid mediators. LPA is constitutively produced in blood stream. However, role of the plasma LPA remains elusive. In this study we focused on the physiological function of plasma LPA and found that it has a critical factor regulating the activity of vagal nerve, possibly through the third LPA receptor, LPA₃.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：脂質生物学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：リゾリン脂質、リゾホスファチジン酸、Gタンパク質共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質が第2世代の脂質メディエーターとして着目しはじめられていた。これらには、スフィンゴシン1-リン酸（S1P）、リゾホスファチジン酸（LPA）がある。申請者は、LPAに関して、産生酵素（オートタキシン）を、受容体としてLPA₃を世界に先駆けて同定し、そのノックアウト（KO）マウスの解析や、特異的アゴニストの作製に成功していた。

2. 研究の目的

KOマウス、特異的アゴニストを利用し、LPA₃受容体の生理的機能を見いだす。

3. 研究の方法

（1）マウスの各種パラメータ解析手法

LPA₃ agonist 投与後のマウスの血圧、心拍数、呼吸パラメータは以下の方法で解析した。マウスをウレタン麻酔し、気管用チューブを挿管したのち、左頸動脈にヘパリン含有生理食塩水を満たしたカニューレを挿入した。

頸動脈圧を血圧アンブ及び power lab を用いて解析し、その波形パターンから心拍数を算出した。一方、マウスの呼吸パラメータは小動物用パルスオキシメータを用いて解析を行った。いずれの場合においても、各種薬液は左大腿静脈にカニューレションした静脈カテーテルより投与した。

(2) 摘出組織標本を用いた解析手法

血管は胸部大動脈を用いた。大動脈を単離後、螺旋標本を作製してマグヌス管に懸垂し、その張力を測定して血管収縮力とした。心臓は、心房標本を作製し、同様にして張力と拍動数を計測した。

(3) 迷走神経関連の解析手法

マウス迷走神経を頸部または横隔膜直下において切断した。頸部迷走神経切除の場合は、マウスにウレタン麻酔を施し、頸部迷走神経を両側性に切断した。15分程待ったのち、マウスの血圧・呼吸パターンが安定したのを確認して次の実験を行った。横隔膜直下での切断では、マウスをペントバルビタール麻酔し、食道脇の迷走神経を肝枝付近で切断した。その後マウスを回復させ、5日間程度通常飼育したのちに実験に用いた。

迷走神経の求心性線維の除神経は、TRPV1 agonist であるカプサイシンを用いた。ペントバルビタール麻酔下のマウス頸部迷走神経に2%カプサイシンを直接塗布した。その後マウスを回復させ、5日間程度通常飼育したのちに実験に用いた。

(4) 圧反射能の解析

圧反射を解析する場合は、自由行動・覚醒下における血圧測定系を用いた。マウス大腿動脈、静脈にそれぞれカニューレションし、それをフリームービングシステムに接続した。手術後、24時間以上の回復期間を与えた。圧反射能は、マウスにフェニレフリンを投与し、その昇圧作用に対する徐脈作用の比を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) LPA₃ の構造類似体であり、強力かつ選択的な LPA₃ agonist である T13 をマウスに静脈内投与し、その薬理作用を解析することで LPA₃ 受容体の新規生理機能の発見を試みた。T13 を静注すると顕著な降圧作用が誘導され、類似のタイムコースで心拍数が一過的に減少した。これらの作用は LPA₃ KO マウスでは全く認められないことから、LPA₃ を介した作用であることが確認された。また、この他に T13 投与によって呼吸回数及び血中酸素濃度低下といった呼吸抑制作用も認められることがわかった。以上の LPA₃ agonist を用いた解析から、LPA₃ の降圧、徐脈及び呼吸抑制作用という新規生理作用が示唆された。

(2) T13 の薬理作用において降圧、徐脈

作用に着目し、そのメカニズムの解明を試みた。まず単離血管及び心房標本に対する T13 の作用を解析したが、いずれにおいても T13 は明確な作用を示さなかった。一方でマウス個体に対して自律神経遮断薬を前投与すると T13 の作用が抑制されたことから、LPA₃ の活性化に伴い、迷走神経が興奮している可能性が示唆された。そこで頸部迷走神経を外科的に切断したマウスに対して T13 を投与したところ、降圧・徐脈をはじめとする T13 の全ての薬理作用が消失又は顕著に抑制された。それに対して腹腔迷走神経の切断では T13 の降圧・徐脈作用は残存していた。次に、迷走神経の求心性線維を刺激するカプサイシンを頸部の迷走神経に局所的に塗布し、求心性線維を選択的に除神経させたところ、このカプサイシン処置マウスも迷走神経切断マウス同様に T13 の降圧・徐脈作用が減弱した。以上の結果は、T13 刺激によって何らかの末梢組織を支配する迷走神経末端に発現している LPA₃ が活性化し、迷走神経を求心性に興奮させている可能性を示唆している。迷走神経における求心性線維の細胞体は nodose ganglion(NG)に局在しており、NG における LPA₃ の発現は定量 PCR によって確認された。in situ hybridization によって一部の細胞体に強いシグナルが認められることも明らかとなった。

(3) LPA₃ 活性化に伴う迷走神経興奮作用の生理的意義を明らかにする目的で、迷走神経の重要な機能の一つである圧反射に着目した。一般に、血圧が急激に変動すると、迷走神経末端部分の圧受容器が感知し、求心性神経の興奮を調節することで個体の血圧維持に重要な役割を果たしている。LPA₃ signal がこういった反射反応に与える影響を明らかにするため、まず、それ単独では個体の血圧、心拍数に影響しない低用量の T13 をマウスに前投与し、過剰な LPA₃ signal が入っている状況を模倣した。この T13 投与マウスにフェニレフリンで昇圧作用を誘導すると、反射的に誘導される徐脈作用(圧反射)が亢進することが明らかとなった。同様の結果が、フェニルピグアドを投与した心臓反射においても観察された。そこで次に、内在性の LPA₃ signal の寄与を調べるために、LPA_{1/3} antagonist である Ki16425 をマウスに前投与した。その結果、Ki16425 投与マウスでは圧反射能が低下していることを見出した。同様の傾向は LPA₃ KO マウスでも認められた。以上の結果より、内在性の LPA₃ signal は求心性迷走神経の興奮感受性を亢進させることで個体の血圧維持に寄与している可能性が新たに示唆された。

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 39 件)

1) Sato A, Kumagai T, Aoki J, Ebina K, Synthetic biotinylated peptide compounds derived from Asp-hemolysin: Novel potent inhibitors of platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol.* (2012) [Epub ahead of print] 10.1016/j.ejphar.2012.04.025 (査読有)

2) Saigusa D, Shiba K, Inoue A, Hama K, Okutani M, Iida N, Saito M, Suzuki K, Kaneko T, Suzuki N, Yamaguchi H, Mano N, Goto J, Hishinuma T, Aoki J, Tomioka Y, Simultaneous quantitation of sphingoid bases and their phosphates in biological samples by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* (2012) [Epub ahead of print] 10.1007/s00216-012-6004-9 (査読有)

3) Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R, Akiyama M, Shimizu H, The β 9 Loop Domain of PA-PLA(1) α Has a Crucial Role in Autosomal Recessive Woolly Hair/Hypotrichosis. *J Invest Dermatol.* (2012) 10.1038/jid.2012.96. (査読有)

4) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N, The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells

regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest.* 122, 1416-1426 (2012) 10.1172/JCI60746. (査読有)

5) Kitamura H, Makide K, Shuto A, Ikubo M, Inoue A, Suzuki K, Sato Y, Nakamura S, Otani Y, Ohwada T, Aoki J, GPR34 is a receptor for lysophosphatidylserine with a fatty acid at the sn-2 position. *J Biochem.* 151, 511-518 (2012) 10.1093/jb/mvs011 (査読有)

6) Nishimasu H, Ishitani R, Aoki J, Nureki O, A 3D view of autotaxin. *Trends Pharmacol Sci.* 33, 138-145 (2012) 10.1016/j.tips.2011.12.004 (査読有)

7) Arima N, Inoue A, Makide K, Nonaka T, Aoki J. Surface loops of extracellular phospholipase A(1) determine both substrate specificity and preference for lysophospholipids. *J Lipid Res.* 53, 513-521 (2012) 10.1194/jlr.M022400 (査読有)

8) Uyama T, Ichi I, Kono N, Inoue A, Tsuboi K, Jin XH, Araki N, Aoki J, Arai H, Ueda N. Regulation of peroxisomal lipid metabolism by catalytic activity of tumor suppressor H-rev107. *J Biol Chem.* 287, 2706-2718 (2012) 10.1074/jbc.M111.267575 (査読有)

9) Hashimoto T, Okudaira S, Igarashi K, Hama K, Yatomi Y, Aoki J, Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATX δ , with a four-amino acid deletion. *J Biochem.* 151,

- 89-97 (2012) 10.1093/jb/mvr126 (査読有)
- 10) Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, Okudaira S, Arima N, Inoue A, Hashimoto T, Arai H, Kawahara A, Nishina H, Aoki J, Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J Biol Chem.* 286, 43972-43983 (2011) 10.1074/jbc.M111.301093 (査読有)
- 11) Inoue A, Arima N, Ishiguro J, Prestwich GD, Arai H, Aoki J, LPA-producing enzyme PA-PLA₁ α regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J.* 30, 4248-4260 (2011) 10.1038/emboj.2011.296. (査読有)
- 12) Masuda A, Fujii T, Iwasawa Y, Nakamura K, Ohkawa R, Igarashi K, Okudaira S, Ikeda H, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Serum autotaxin measurements in pregnant women: application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Clin Chim Acta.* 412, 1944-1950 (2011) 10.1016/j.cca.2011.06.039 (査読有)
- 13) Kawaguchi M, Okabe T, Okudaira S, Hanaoka K, Fujikawa Y, Terai T, Komatsu T, Kojima H, Aoki J, Nagano T, Fluorescence probe for lysophospholipase C/NPP6 activity and a potent NPP6 inhibitor. *J Am Chem Soc.* 133, 12021-12030 (2011) 10.1021/ja201028t (査読有)
- 14) Nakai Y, Ikeda H, Nakamura K, Kume Y, Fujishiro M, Sasahira N, Hirano K, Isayama H, Tada M, Kawabe T, Komatsu Y, Omata M, Aoki J, Koike K, Yatomi Y, Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. *Clin Biochem.* 44, 576-581 (2011) 10.1016/j.clinbiochem.2011.03.128 (査読有)
- 15) Nakagawa H, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Watanabe N, Tejima K, Kume Y, Iwai T, Suzuki A, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Omata M, Igarashi K, Aoki J, Koike K, Yatomi Y, Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 412, 1201-1206 (2011) 10.1016/j.cca.2011.03.014 (査読有)
- 16) Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, Mihara E, Dohmae N, Inoue A, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O, Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol.* 18, 205-212. (2011) 10.1038/nsmb.1998 (査読有)
- 17) Kazama S, Kitayama J, Aoki J, Mori K, Nagawa H., Immunohistochemical detection of autotaxin (ATX)/lysophospholipase D (lysoPLD) in submucosal invasive colorectal cancer. *J Gastrointest Cancer.* 42, 204-211 (2011) (査読有)
- 18) Nagai J, Uchida H, Matsushita Y, Yano R, Ueda M, Niwa M, Aoki J, Chun J, Ueda H, Autotaxin and lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and

- intrathecal lysophosphatidylcholine. *Mol Pain*. 6, 78 (2010) 10.1186/1744-8069-6-78 (査読有)
- 19) Cavalli S, Houben AJ, Albers HM, van Tilburg EW, de Ru A, Aoki J, van Veelen P, Moolenaar WH, Ovaa H, Development of an activity-based probe for autotaxin. *ChemBiochem*. 11, 2311-2317 (2010) 10.1002/cbic.201000349 (査読有)
- 20) Ohuchi H, Fukui H, Matsuyo A, Tomonari S, Tanaka M, Arai H, Noji S, Aoki J, Autotaxin controls caudal diencephalon-mesencephalon development in the chick. *Dev Dyn*. 239, 2647-2658 (2010) 10.1002/dvdy.22403 (査読有)
- 21) Hosono H, Homma M, Ogasawara Y, Makide K, Aoki J, Niwata H, Watanabe M, Inoue K, Ohkohchi N, Kohda Y, Expression of phosphatidylserine-specific phospholipase A(1) mRNA in human THP-1-derived macrophages. *Cell Transplant*. 19, 759-64 (2010) (査読有)
- 22) Takahashi K, Sasabe N, Ohshima K, Kitazato K, Kato R, Masuda Y, Tsurumaki M, Obama T, Okudaira S, Aoki J, Arai H, Yamaguchi T, Itabe H, Glucagon regulates intracellular distribution of adipose differentiation-related protein during triacylglycerol accumulation in the liver. *J Lipid Res*. 51, 2571-80 (2010) 10.1194/jlr.M004648 (査読有)
- 23) Nakanaga K, Hama K, Aoki J, Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem*. 148, 13-24 (2010) 10.1093/jb/mvq052 (査読有)
- 24) Okudaira S, Yukiura H, Aoki J, Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie*. 92, 698-706. (2010) 10.1016/j.biochi.2010.04.015 (査読有)
- 25) Nakamura K, Igarashi K, Ohkawa R, Saiki N, Nagasaki M, Uno K, Hayashi N, Sawada T, Syukuya K, Yokota H, Arai H, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y, A novel enzyme immunoassay for the determination of phosphatidylserine-specific phospholipase A(1) in human serum samples. *Clin Chim Acta*. 411, 1090-1094 (2010) 10.1016/j.cca.2010.04.006 (査読有)
- 26) David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Grès S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clézardin P, Peyruchaud O, Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS One*. 17, e9741 (2010) 10.1371/journal.pone.0009741 (査読有)
- 27) Hama K, Aoki J, LPA(3), a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res*. 49, 335-342. (2010) 10.1016/j.plipres.2010.03.001 (査読有)
- 28) Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki

J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H, Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis. *Hum Mutat.* 31, 602-10 (2010)
10.1002/humu.21235 (査読有)

29) Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Aoki J, Ueda H, Evidence for de novo synthesis of lysophosphatidic acid in the spinal cord through phospholipase A2 and autotaxin in nerve injury-induced neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 333, 540-546. (2010)
10.1124/jpet.109.164830 (査読有)

30) Otani K, Kitayama J, Yasuda K, Nio Y, Iwabu M, Okudaira S, Aoki J, Yamauchi T, Kadowaki T, Nagawa H, Adiponectin suppresses tumorigenesis in Apc(Min) (+) mice. *Cancer Lett.* 288, 177-82 (2010)
10.1016/j.canlet.2009.06.037 (査読有)

[学会発表] (計3件)

1. Junken Aoki, Autotaxin regulates vascular development via multiple LPA receptors in zebrafish, 2011 FASEB Summer Research Conference, Lucca, Italy, 2011年8月15日

2. Junken Aoki, Autotaxin and LPA Signaling in Cardiovascular Development, Keystone Symposia, Kyoto, Japan, 2010年6月8日

3. Junken Aoki, Pathways for LPA production and their patho-physiological roles, 2009 FASEB Summer Research Conference, Arizona, USA, 2009年6月29日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1. 名称: オートタキシンアイソフォーム特異的抗体および検出方法
発明者: 青木淳賢、五十嵐浩二
権利者: 株式会社東ソー、東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-150054 号
出願年月日: 2011年7月6日
国内外の別: 国内

2. 名称: 自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法
発明者: 青木淳賢、巻出久美子、井上飛鳥、大和田智彦、井久保仁也、尾谷優子
権利者: 東北大学、東京大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-112881
出願年月日: 2011年5月29日
国内外の別: 国内

3. 名称: ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1 測定による全身性エリテマトーデスの検査方法および検査薬
発明者: 沢田哲治、矢富裕、中村和宏、青木淳賢、五十嵐浩二
権利者: 株式会社東ソー、東京大学、東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-172068
出願年月日: 2010年7月30日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H21/index.html>

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