

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 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770102

研究課題名（和文）

新規炎症メディエーターリゾホスファチジルセリンの炎症・免疫反応における機能解析

研究課題名（英文）

Function of lysophosphatidylserine in immune response

研究代表者

巻出 久美子（MAKIDE KUMIKO）

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：30519773

研究成果の概要（和文）：

リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)は、細胞レベルで様々な活性を有することが報告されていたが、LysoPSの生体内での存在、および産生・作用機構、さらにその個体レベルでの機能については不明な点が多く残されていた。本研究により、様々な炎症状態において生体内でLysoPSが産生されること、およびその産生には産生酵素PS-PLA₁が関与していることを明らかにした。また、LysoPSがCon A誘発性肝炎モデルマウスの発症を抑制することを見出し、*in vivo*で炎症抑制効果を示すことがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Although it is reported that lysophosphatidylserine (LysoPS) has various cellular activities *in vitro*, very little is known about its presence, synthetic enzyme, receptor and patho-physiological roles. In this study, we showed that LysoPS is produced at inflamed sites in mice and PS-PLA₁ is involved in its production. LysoPS was also found to suppress concanavalin A-induced hepatic injury in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	196,350	58,905	255,255
2010年度	1,603,650	481,095	2,084,745
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：

キーワード：リゾリン脂質、炎症、GPCR、産生酵素

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)は、マスト細胞の脱顆粒促進、細胞遊走、T細胞の増殖抑制活性を有することが報告されている。我々はこれまでに、LysoPS産生酵素としてホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A₁(PS-PLA₁)を

同定し、本酵素が炎症時に発現誘導されることを明らかにしていた。また、LysoPS受容体については既知のGPR34に加えて、オーファンGPCRのスクリーニングにより、LysoPS応答性を示す受容体として新たにP2Y₁₀およびGPR174を同定し、免疫細胞において高発現していることを見出した。これらの結果から、

LysoPS は炎症時に産生されて、免疫担当細胞において作用を發揮していると考えられたが、LysoPS の生体内での存在、および産生・作用機構、さらにその個体レベルでの機能については不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、「生体内での存在」「産生酵素」「受容体」「生体内機能」の各側面から、炎症反応におけるメディエーターとしての LysoPS の機能を解明することを目的とする。

まず、生体内における LysoPS を検出するために、LC-MS/MS を用いた LysoPS 高感度検出系を構築し、炎症時におけるメディエーター本体を捉える。また、LysoPS 産生酵素 PS-PLA₁ および LysoPS 受容体 GPR34, P2Y10, GPR174 のノックアウトマウスの表現型解析を通して、細胞・個体レベルで LysoPS の生理活性脂質としての役割を明らかにする。さらに、炎症モデルマウスに LysoPS を投与することにより、LysoPS および関連分子の創薬ターゲットとしての可能性を探る。

3. 研究の方法

3-1. LC-MS/MS を用いた LysoPS の測定

マウス血清からリン脂質画分をエタノール抽出し、液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用い、LysoPS の測定を行った。

3-2. Con A 誘発性肝炎モデル

マウス (BALB/c マウス、8~12 週令、♂) にコンカナバリン A (Con A) 20mg/kg を尾静脈投与し、一定時間後に採血および肝臓切片の作製、HE 染色を行った。血中サイトカイン量の測定には ELISA を用いた。LysoPS 処理の場合は、Con A と同時に 2.5mg/kg を尾静注した。

3-3. マウス脾細胞を用いた解析

マウス (BALB/c マウス、8~12 週令、♂) の脾臓から細胞を調整し、リンパ球マイトジェンである Con A で刺激、一定時間後に細胞を回収し、RT-PCR 法により LysoPS 関連分子の発現解析を行った。

凝集アッセイでは、脾細胞を Con A 1 μg/ml で処理後、顕微鏡下で細胞塊の形成を観察した。

4. 研究成果

4-1. 生体内における LysoPS の検出

LysoPS のメディエーターとしての機能を明らかにするには、生体内における LysoPS の検出が不可欠である。LysoPS は生体内における存在量が少ないため、高感度検出系の構築が必要であった。今回、液体クロマトグラ

フィー-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用い、LC の移動相、分析カラムおよび MS の測定条件の検討を行った。その結果、分子種ごとの良好なピークの分離が可能、かつ検出限界が 100fmol という高感度測定系の確立に成功した。その系を用いて、様々な病態モデルマウスを検討したところ、炎症滲出液に LysoPS が高濃度で存在することを見出した。具体的には、創傷モデルマウスにおいて傷口の滲出液中の LysoPS が顕著に増加した。また、PS-PLA₁ KO マウスではその LysoPS 産生が顕著に抑制されていた。これらの結果から、LysoPS が実際に生体内に産生され、PS-PLA₁ がその産生に重要な役割を担うことが明らかとなった。

4-2. 炎症モデルマウスにおける LysoPS の機能解析

ヒト自己免疫性肝炎のモデルである Con A 誘導性肝炎モデルでは、Con A 投与によりリンパ球をはじめとする様々な免疫細胞が活性化され、肝実質細胞の障害が引き起こされる。マウスに Con A と同時に LysoPS を処理すると、血中の肝障害マーカー ALT 値の上昇、肝臓ネクロシスおよび TNF-α などの血中の炎症性サイトカインのレベルが顕著に抑制された。これは、LysoPS が生体内において炎症抑制作用を示す初めての知見である。

また、LysoPS 受容体 KO マウスに Con A 肝炎を誘発したところ、P2Y10 KO マウスにおいて野生型に比べて症状が悪化することを見出した。このことから、Con A 肝炎においては少なくとも P2Y10 が関与することが明らかとなった。

4-3. マウス脾細胞を用いた解析

LysoPS の作用機構を解析するため、マウス脾細胞を用いた解析を行った。Con A 刺激したマウス脾細胞における LysoPS 関連分子の発現を解析した結果、24 時間後に PS-PLA₁、120 時間後をピークに P2Y10、GPR174 の発現上昇が認められた。また、Con A 刺激脾細胞は細胞凝集塊を形成するのに対し、LysoPS を添加すると凝集塊の形成が抑制されることを見出した。さらに、LysoPS による凝集抑制効果は P2Y10 KO マウス由来の脾細胞では認められないことがわかった。この細胞凝集においてはリンパ球の主要なインテグリン LFA-1 が関与することが知られており、LysoPS は P2Y10 を介して細胞接着の抑制に関与することが示唆された。

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 6 件)

1. GPR34 is a receptor for lysophosphatidylserine with a fatty acid at the sn-2 position.
Kitamura H, Makide K, Shuto A, Ikubo M, Inoue A, Suzuki K, Sato Y, Nakamura S, Otani Y, Ohwada T, Aoki J.
J Biochem. 2012 May;151(5):511-8. Epub 2012 Feb 16. (査読有り)
2. Surface loops of extracellular phospholipase A(1) determine both substrate specificity and preference for lysophospholipids.
Arima N, Inoue A, Makide K, Nonaka T, Aoki J.
J Lipid Res. 2012 Mar;53(3):513-21. (査読有り)
3. Expression of phosphatidylserine-specific phospholipase A(1) mRNA in human THP-1-derived macrophages.
Hosono H, Homma M, Ogasawara Y, Makide K, Aoki J, Niwata H, Watanabe M, Inoue K, Ohkohchi N, Kohda Y.
Cell Transplant. 2010;19(6):759-64. Epub 2010 Jun 23. (査読有り)
4. Synthesis and evaluation of lysophosphatidylserine analogues as inducers of mast cell degranulation. Potent activities of lysophosphatidylthreonine and its 2-deoxy derivative.
Iwashita M, Makide K, Nonomura T, Misumi Y, Otani Y, Ishida M, Taguchi R, Tsujimoto M, Aoki J, Arai H, Ohwada T.
J Med Chem. 2009 Oct 8;52(19):5837-63. (査読有り)
5. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol.
Makide K, Kitamura H, Sato Y, Okutani M, Aoki J.
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2009 Sep;89(3-4):135-9. Epub 2009 May 7. Review. (査読有り)
6. Lysophospholipid mediators.

Makide K, Kano K, Kitamura H, Arima N, Aoki J.
Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2009 Jan;54(1):29-39. Review. (査読無し)

〔学会発表〕 (計 18 件)

1. 鈴木健介、北村一、奥谷倫世、首藤啓明、巻出久美子、井上飛鳥、青木淳賢
リゾホスファチジルセリンは自己免疫性肝炎を緩和させる
日本薬学会 第 132 年会
2012 年 3 月 30 日
北海道大学
2. 奥谷倫世、井上飛鳥、巻出久美子、三枝大輔、富岡佳久、青木淳賢
生体内におけるリゾホスファチジルセリンの検出
日本薬学会 第 132 年会
2012 年 3 月 30 日
北海道大学
3. 巻出久美子、北村一、井上飛鳥、青木淳賢
リゾホスファチジルセリンによる免疫抑制作用
新学術領域若手ワークショップ
2012 年 2 月 1 日
東京大学
4. 奥谷倫世、井上飛鳥、巻出久美子、三枝大輔、富岡佳久、青木淳賢
新規 LysoPS 受容体の同定
新学術領域若手ワークショップ
2012 年 2 月 1 日
東京大学
5. Kumiko Makide, Hajime Kitamura, Junken Aoki
Immunosuppressive roles of lysophosphatidylserine in mice
第 40 回日本免疫学会学術集会
2011 年 11 月 28 日
幕張メッセ
6. Hajime Kitamura, Kumiko Makide, Junken Aoki
Effects of lysophosphatidylserine on lymphocytes
第 40 回日本免疫学会学術集会
2011 年 11 月 28 日
幕張メッセ
7. 首藤啓明、井上飛鳥、奥谷倫世、巻出久美子、青木淳賢
2-アシル型リゾリン脂質の検出とその受容体活性化機構の解析
次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム 2011
2011 年 10 月 8 日
東北大学さくらホール
8. 北村一、奥谷倫世、首藤啓明、井上飛鳥、巻出久美子、大和田智彦、青木淳賢
リゾホスファチジルセリンの細胞接着抑制作用

第 84 回日本生化学大会
2011 年 9 月 23 日
国立京都国際会館

9. 奥谷倫世、北村一、巻出久美子、井上飛鳥、梶島健治、青木淳賢
リゾホスファチジルセリンの免疫抑制作用
第 84 回日本生化学大会
2011 年 9 月 23 日
国立京都国際会館

10. 首藤啓明、井上飛鳥、奥谷倫世、巻出久美子、青木淳賢
2-アシル型リゾリン脂質の検出とその受容体活性化機構の解析
第 84 回日本生化学大会
2011 年 9 月 23 日
国立京都国際会館

11. Kumiko Makide, Michiyo Okutani, Asuka Inoue, Junken Aoki
Role of lysophosphatidylserine in inflammation-associated mast cell degranulation
第 33 回内藤コンファレンス
2011 年 6 月 29 日
シャトレーゼガトーキングダムサッポロ

12. 首藤啓明、井上飛鳥、奥谷倫世、北村一、有馬直明、巻出久美子、青木淳賢
ホスホリパーゼ A1 (PLA1) により産生される 2-アシル型リゾリン脂質の分離とその性状解析
第 53 回日本脂質生化学会
2011 年 5 月 12 日
ホテル東京ガーデンパレス

13. 巻出久美子、奥谷倫世、井上飛鳥、青木淳賢
炎症反応のマスト細胞活性化におけるリゾホスファチジルセリンの役割
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会
2010 年 12 月 8 日
神戸ポートアイランド

14. 奥谷倫世、井上飛鳥、巻出久美子、三枝大輔、富岡佳久、青木淳賢
LC-ESI-MS/MS を用いたリゾホスファチジルセリンおよびリゾホスファチジルスレオニンの検出
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会
2010 年 12 月 8 日
神戸ポートアイランド

15. 北村一、巻出久美子、井上飛鳥、青木淳賢
リゾホスファチジルセリンの活性化リンパ球に対する効果
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会
2010 年 12 月 8 日
神戸ポートアイランド

16. 奥谷倫世、井上飛鳥、巻出久美子、三枝大輔、富岡佳久、青木淳賢
LC-ESI-MS/MS を用いたリゾホスファチジルセリンの検出

第 49 回日本薬学会東北支部大会
2010 年 10 月 24 日
奥羽大学

17. 佐藤佑介、巻出久美子、青木淳賢
ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1 の病的機能の解明
第 49 回日本薬学会東北支部大会
2010 年 10 月 24 日
奥羽大学

18. 北村一、巻出久美子、井上飛鳥、青木淳賢
LPS 受容体 P2Y10 の同定と細胞接着における機能
第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010
2010 年 10 月 2 日
京都大学大学院薬学研究科

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

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
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 19 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巻出 久美子 (MAKIDE KUMIKO)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：30519773

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：