

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293010

研究課題名(和文)新規脂質メディエーター、リゾホスファチジルセリンの免疫抑制機構の解明と創薬研究

研究課題名(英文)Immunosuppressive role of lysophosphatidylserine and its evaluation as drug targets

研究代表者

青木 淳賢 (Aoki, Junken)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20250219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はリゾホスファチジルセリン(以下LysoPS)特異的に反応する2種の新規GPCR(P2Y10, GPR174)を同定した。本研究では、LysoPS受容体のKOマウスを利用し、LysoPSの免疫抑制作用の分子機構の全容を明らかにするとともに、LysoPS受容体を標的とした創薬研究を展開する。まず、P2Y10、GPR174 KOマウスがリンパ腫の症状を示すことを見出し、LysoPSがP2Y10、GPR174を介し、免疫抑制作用を発揮することを明らかにした。また、LysoPSの構造類似体を合成し、それぞれに特異的かつLysoPSに比べ1,000倍高活性な作動薬を創製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Previously we isolated two GPCR, P2Y10 and GPR174, as specific receptor for lysophospholipid mediator, lysophosphatidylserine (LysoPS). In this study, by analyzing knockout mice of P2Y10 and GPR174, we tried to identify the pathophysiological roles of LysoPS through these receptors. In addition, we tried to create specific agonist as drug candidates. First we found that both P2Y10 and GPR174 KO mice showed enlarged lymphonodes and spleen with enhanced proliferation of T and B lymphocytes. By chemically modifying each chemical group of LysoPS, we succeeded in identifying specific agonists for each receptor, which showed 1,000 times more activity than LysoPS.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾホスファチジルセリン GPCR 作動薬 免疫抑制

### 1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジルセリン(以下 LysoPS)は極性頭部にセリンを有するリゾリン脂質の一種であり、これまで、マスト細胞の脱顆粒に關与することが知られていた。申請者は LysoPS の機能解明を目的とし、LysoPS 応答性の GPCR を探索し、従来の GPR34 に加え、二つの GPCR が LysoPS に応答することを明らかにし、これら受容体を LPA1 (GPR34), LPS2 (P2Y10), LPS3 (GPR174)と呼ぶことを提唱している。これら受容体はリゾリン脂質メディエーターとして既に市民権を得ているリゾホスファチジン酸(LPA)に対する受容体 LPA<sub>4</sub>, LPA<sub>5</sub>, LPA<sub>6</sub>と高い相同性を示す。よって、LysoPS が LPA やスフィンゴシン1リン酸(S1P)と同様に、リゾリン脂質メディエーターとして機能することが想定された。予備的な解析から LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 はリンパ球に特異的に発現し、またその発現レベルがリンパ球の活性化に伴って上昇することから、活性化リンパ球上で何らかの機能を持つものと想定された。

### 2. 研究の目的

本研究では、LysoPS 関連分子(LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174)の遺伝子改変動物を利用し、新規リゾリン脂質性メディエーターLysoPS の免疫抑制作用の分子機構の全容を明らかにするとともに、LysoPS 関連分子を標的とした創薬研究を展開することを目的とした。また、これまで、報告されている LysoPS のマスト細胞脱顆粒促進活性が、LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 を介するのかが否かを明らかにする。また、これまで、LysoPS の検出系がないため、内在性の LysoPS を捉えることは困難であった。そこで、LC-MS/MS の手法を用い、LysoPS 検出系を完成させる。

### 3. 研究の方法

LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 のノックアウトマウスは情報に従って作製した。両ノックアウトマウスは致死性ではなく、メンデルの法則に従って誕生した。LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 の発現は RT-PCR で行った。リンパ節、脾臓を単離し、FACS にて細胞種、細胞数を計測した。マウス腹腔よりマスト細胞を単離し、LysoPS 存在下、IgE-抗原依存的なマスト細胞の脱顆粒反応が、ノックアウトマウスで影響されているかについて解析した。臨床サンプル、マウスモデルでの LysoPS の検出系を LC-MS/MS の手法で開発した。

### 4. 研究成果

LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 ノックアウトマウスから単離したマスト細胞は依然として LysoPS に応答して IgE-抗原依存的な脱顆粒反応を起こした。また、マスト細胞の脱顆粒反応を強力に誘導する LysoPS 構造類似

体リゾホスファチジルスレオニン(LysoPT)は TGF 切断アッセイにおいて、LPS2/P2Y10, GPR174 には反応性を示さないことがわかった。よって、マスト細胞の脱顆粒に關与する LysoPS 受容体は LPS2/P2Y10やLPS3/GPR174ではないことがわかった。マスト細胞上には新規の LysoPS 受容体が存在することが強く示唆された。

LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 ノックアウトマウスは見かけ上正常であり、また、メンデルの法則にしたがって、誕生した。一方、30週齢を過ぎた一部の LPS2/P2Y10 ノックアウトマウスではリンパや脾臓が大きくなることが確認され、リンパ腫の症状を示すことを見出した。LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 とともに、B, T 細胞に発現し、特に、コンカナバリン A やリポポリサッカライドにより、それぞれ T 細胞、B 細胞を活性化すると両受容体の発現が顕著に上昇した。後述するように、興味深いことに、コンカナバリン A をマウスの投与したコンカナバリン A 誘導肝炎においては、血液中や肝臓組織に高濃度の LysoPS が検出された。したがって、LysoPS が LPS2/P2Y10, LPS3/GPR174 を介し、免疫抑制作用を発揮することわかった。

LysoPS はホスホセリン、グルセロール、脂肪酸の各パーツからなる。それぞれのパーツに対し構造を修飾した LysoPS 構造類似体を有機化学的に合成し、受容体活性化能を TGF 切断アッセイを用い調べた。その結果、各受容体の特異性、活性化能を上げるそれぞれのパーツを見出すことができた。さらに、それぞれのパーツを組み合わせた LysoPS 構造類似体を合成することで、特異的かつ LysoPS に比べ 1,000 倍高活性な作動薬を創製することに成功した。

これまで不可能だった LysoPS 検出系の確立を試みた。カラムクロマトグラフィーとして逆層系のクロマトグラフィーが分離に有効であった。質量分析系として Thermo Fisher TSQ Quantam Ultra, Thermo Fisher TSQ Quantiva を検討し、Thermo Fisher TSQ Quantiva を用いることで、0.1 nM の LysoPS を検出することに成功した。この技術を用い、マウス、ラット、ヒト血漿中の LysoPS の検出を試み、正常の血漿の LysoPS レベルは数 nM であることを見出した。一方、腹膜炎、肝炎を誘導したマウスモデルにおいて、LysoPS レベルが数十 nM にまで上昇することがわかった。LysoPS は炎症反応において産生されることが判明し、今後、炎症反応における LysoPS の機能解明が期待される。

### 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 7 件)

(1) Ikubo M, Inoue A, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Uwamizu A, Suzuki K, Kishi, T, Shuto A, Ishiguro J, Okudaira M, Kano K, Makide K, Aoki J, Ohwada T Structure-Activity Relationships of Lysophosphatidylserine Analogs as Agonists of G-Protein-Coupled Receptors GPR34, LPS2 and LPS3/GPR174. *J. Med. Chem.* 58, 4204-4219 (2015), 査読有, doi: 10.1021/jm5020082.

(2) Phosphatidylserine-specific Phospholipase A1 (PS-PLA1) Expression in Colorectal Cancer Correlates with Tumor Invasion and Hematogenous Metastasis. Iida Y, Sunami E, Yamashita H, Hiyoshi M, Ishihara S, Yamaguchi H, Inoue A, Makide K, Tsuno NH, Aoki J, Kitayama J, Watanabe T. *Anticancer Res.* 35, 1459-1464 (2015), 査読有

(3) Lysophosphatidylserine has Bilateral Effects on Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Nishikawa M, Kurano M, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y. *J Atheroscler Thromb* 35, 463-470 (2015), 査読有, doi: 10.1016/j.bbaci.2015.08.003.

(4) Lysophosphatidylserine analogs differentially activate three LysoPS receptors. Uwamizu A, Inoue A, Suzuki K, kudaira M, Shuto A, Shinjo Y, Ishiguro J, Makide K, Ikubo M, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Ohwada T and Aoki J. *J Biochem* 157, 151-160 (2015), 査読有, doi: 10.1093/jb/mvu060.

(5) Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. Okudaira M, Inoue A, Shuto A, Nakanaga K, Kano K, Makide K, Saigusa D, Tomioka Y, Aoki J. *J Lipid Res* 55, 2178-2192 (2014), 査読有, doi: 10.1194/jlr.D048439.

(6) Novel lysophospholipid receptors; their structure and function. Makide K, Uwamizu A, Shinjo Y, Ishiguro J, Okutani M, Inoue A, Aoki J. *J Lipid Res* 55, 1986-1995 (2014), 査読有, doi: 10.1194/jlr.R046920.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) LysoPS 受容体のサブタイプ選択的アゴ

ニストの開発、上水明治、井上飛鳥、井久保仁也、中村翔、ジョン・セジン、佐山美紗、岸貴之、巻出久美子、尾谷優子、大和田智彦、青木淳賢、BMB2015 (神戸) 平成 27 年 12 月 1-4 日

(2) CRISPR/Cas9 システムを用いた LysoPS 受容体 T ノックアウトマウスの作製、新上雄司、井上飛鳥、巻出久美子、青木淳賢、BMB2015 (神戸) 平成 27 年 12 月 1-4 日

(3) ConA 誘発性肝炎におけるリゾホスファチジルセリンの変動解析、佐藤慧太、巻出久美子、青木淳賢、日本薬学会東北支部大会 (平成 27 年 9 月 26 日、岩手県矢巾町)

(4) Novel GPCRs for lysophosphatidylserine; their structure and function, Junken Aoki, PLM2015, (Tokyo, Japan) 2015, Feb. 9-11

(5) LysoPS は LPS3/GPR174 を介して IL-2 産生を抑制する、新上 雄司, 北村 一, 石黒 純, 奥谷 倫世, 井上 飛鳥, 巻出 久美子, 井久保 仁也, 大和田 智彦, 青木 淳賢, 日本生化学会 (京都) 平成 26 年 10 月 15-18 日

(6) リゾホスファチジルセリンは活性化リンパ球の増殖を抑制する、石黒 純, 北村 一, 首藤 啓明, 新上 雄司, 井上 飛鳥, 巻出 久美子, 青木 淳賢, 日本生化学会 (京都) 平成 26 年 10 月 15-18 日

(7) 血中におけるリゾホスファチジルセリンの安定性の解析、奥平 倫世, 飯田 奈紀沙, 井上 飛鳥, 巻出 久美子, 中村 翔, 尾谷 優子, 大和田 智彦, 青木 淳賢, 日本生化学会 (京都) 平成 26 年 10 月 15-18 日

(8) コンカナバリン A 誘導肝炎におけるリゾホスファチジルセリンの機能解析、鈴木 健介, 奥谷 倫世, 井上 飛鳥, 巻出 久美子, 青木 淳賢, 日本生化学会 (京都) 平成 26 年 10 月 15-18 日

(9) リゾホスファチジルセリンの新しい受容体、青木淳賢、プロテイン・アイランド・松山 (P I M) 国際シンポジウム 2014 (松山、愛媛) 平成 26 年 9 月 17 日

(10) Novel Receptors for lysophosphatidylserine; their structure and function, Junken Aoki, FEPS2014, (Butapest, Hungary) 2014, Aug. 27-30

(11) 免疫系を制御する新たな脂質メディエーターリゾホスファチジルセリン、青木淳賢、巻出久美子、井上飛鳥、日本炎症・再生医学会年会 (沖縄) 平成 26 年 7 月 1-4 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H28/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