

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460960

研究課題名(和文) Th2型の炎症性腸疾患におけるリゾホスファチジン酸受容体の役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of lysophosphatidic acid receptors in Th2 type inflammatory bowel disease

研究代表者

赤星 軌征 (AKAHOSHI, NORIYUKI)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70534551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多様な生理活性を持つリゾホスファチジン酸(LPA)の受容体の一つであるLPA5は腸管免疫系やマスト細胞で高発現が示されている。LPA5欠損マウスに各種炎症性腸炎モデルを試験した結果、Th2応答優位のオキサゾロン誘導性腸炎モデルで感受性が高いことを見出した。Th2応答に関連し、マスト細胞の関与する全身性受動アナフィラキシー応答でも増悪化が見られた。腹腔洗浄液のFACS解析では、LPA5欠損のマスト細胞の数に異常はなかったが、細胞密度を示すSSCが高く、Fc RI₁が高発現していた。またマクロファージ数が減少し、B細胞が増加しており、LPA5欠損マウスではTh2優位に偏っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：One of the receptors for lysophosphatidic acid (LPA) having various bioactivities, LPA5 is widely expressed in the peripheral immune cells, including intestinal immune cells and mast cells. We induced various colitis models to LPA5 deficient mice, and as a result, the Th2 response predominant oxazolone colitis model worsened in LPA5 deficient mice. In association with Th2 response, exacerbations were observed in systemic passive anaphylaxis responses involving mast cells in LPA5 deficient mice. FACS analysis of peritoneal lavage fluid revealed that the number of connective tissue type mast cells was comparable between LPA5 deficient mice and wild type, but the mast cells of LPA5 deficient mice had high SSCs indicating cell density, and Fc RI₁ was highly expressed. In the peritoneal lavage fluid, the number of macrophages decreased and B-2 cells increased. These results suggested that LPA5 deficient mice may be biased towards Th2 dominance.

研究分野：免疫学

キーワード：リゾホスファチジン酸 炎症性腸炎 LPA5 マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

生理活性リン脂質であるリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid: LPA) は *in vitro* で強い細胞走化性や細胞形態変化、細胞増殖、サイトカイン産生調節をもたらすことから、LPA の病態生理学的意義には、現在多くの研究者の注目が集まっている。LPA は 2 つの合成経路が知られており、一つはオートタキシン(ATX)のリゾホスホリパーゼ D 活性による合成経路と、もう一つはホスファチジン酸特異的ホスホリパーゼ $A_1\alpha$ (PA-PLA $_1\alpha$) による合成経路である。LPA は主に血液中で作られ、生理的条件下で数百 nM 存在すると報告されている (*Ann Clin Biochem. Hosogaya et al. 2008*)。

LPA は G タンパク共役型受容体 (GPCR) を介して作用し、現在までに LPA $_1$ ~LPA $_6$ の 6 種類が知られている。1996 年に Chun らによって最初の LPA 受容体 LPA $_1$ が同定され、その一次配列との相同性から第 2、第 3 の受容体が同定された。これらはスフィンゴシン-1-リン酸受容体とともに Endothelial differentiation gene (Edg) ファミリーを構成し、LPA $_1$ ~LPA $_3$ は Edg 型 LPA 受容体と総称される。これらの受容体の研究から炎症性サイトカインの制御、免疫細胞の遊走など免疫系での役割も解明が進んできた。一方、当研究室の石井らは 2003 年に LPA の第 4 受容体 (LPA $_4$) を同定した (*J Biol Chem. Noguchi et al. 2003*)。この受容体は、従来から知られていた 3 種類の Edg 型 LPA 受容体と比較して、一次配列の相同性が低く、別系統で進化してきた受容体であろうと考えられており、後述の LPA $_5$ 、LPA $_6$ とともに非 Edg 型 LPA 受容体と区別されている。LPA $_4$ はマウス胚性線維芽細胞 (MEF) において LPA $_1$ -G $_i$ -Rac 経路を介する細胞移動促進に対し、LPA $_4$ -G $_{12/13}$ -Rho 経路が LPA $_1$ シグナルを抑制する機構が判明している (*Mol Biol Cell. Lee et al. 2008*)。また骨分化でも同様に LPA $_1$ の分化促進作用を抑制する作用があり (*J Cellular Biochem. Liu et al. 2010*)、非 Edg 型 LPA 受容体によるシグナルがこれまで知られている LPA $_1$ ~LPA $_3$ シグナルの調節因子として作用することがわかってきた。一方、Kotarsky らは 2006 年に LPA $_4$ と相同性の高いリガンドが未同定の GPCR を LPA 第 5 受容体 (LPA $_5$) と同定した (*J Pharmacol Exp Ther. Kotarsky et al. 2006*)。この受容体は G $_q$ 、G $_{12/13}$ と共役し、Ca $^{2+}$ 応答、Rho 経路を活性化させる。また 2009 年に石井らにより LPA $_4$ および LPA $_5$ と相同性の高いリガンド未同定の GPCR が、G $_{12/13}$ -Rho 経路を選択的に活性化させる LPA 第 6 受容体 (LPA $_6$) であることが同定された (*J Biol Chem. Yanagida et al. 2009*)。これらの非 Edg 型 LPA 受容体、特に LPA $_5$ と LPA $_6$ に関してはいまだ不明点が多い。

免疫細胞系に関する大規模な遺伝子発現解析である Immgen プロジェクトによると LPA $_5$ はマクロファージや B 細胞、NKT 細胞

でも発現し、LPA $_6$ は末梢免疫細胞に幅広く発現している。腸管免疫系での LPA $_5$ と LPA $_6$ の mRNA 発現レベルは、LPA $_1$ と並んで高く、特に LPA $_5$ は粘膜固有層、パイエル板、腸間膜リンパ節といった免疫組織での発現が高く、細胞レベルでは CD4 および CD8 陽性 T 細胞に発現がみられる (前述の Kotarsky *et al.*)。またマスト細胞でもヒトでは LPA $_5$ と LPA $_6$ が特に高発現している。

腸管内においては消化物の中にも LPA の前駆体 (食物や腸内共生細菌、さらにアポトーシスした自己の腸上皮細胞中に豊富に含まれるリン脂質) と各種ホスホリパーゼ (ATX とは別の、消化酵素に含有される分子や腸上皮細胞膜上に発現される分子が複数種知られている) が同時に存在することから、腸管粘膜面は血中および腸管内腔由来の LPA により、腸管腔・基底膜両面から作用を受けると考えられる。実際に LPA 腸管投与によりコレラ毒素による下痢症状が緩和されるが、この作用は、LPA $_2$ 経路で腸管上皮細胞の管腔側に発現する Cl $^-$ チャンネルの活性が抑制されることや、腸管刷子縁に発現する LPA $_5$ 経路で Na $^+$ /H $^+$ 交換体が刺激されることで、水分吸収が促進されることによる (*Am J Physiol Cell Physiol. Yoo et al. 2011*)。また絨毛頂端部に多く発現する LPA $_6$ は腸管上皮の細胞接着への関与示めされており (*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Lee et al. 2009*)、管腔側から作用する LPA は粘膜保護や創傷治癒作用を持つ。こうした炎症応答に関係して、腸管において LPA $_5$ と LPA $_6$ が何らかの作用を持つことが予想される。

2. 研究の目的

代表的な炎症性腸疾患であるクローン病および潰瘍性大腸炎患者では炎症部位の血管内腔において ATX の発現上昇が見られ、マウスではデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎や重症複合免疫不全症 (SCID) マウスへの T 細胞移入による腸炎と同様に炎症部における ATX が亢進しており、炎症性腸炎でも血管内 LPA 上昇によるリンパ球ホーミングの促進が示唆されている (Hozumi *et al. 2013*)。一方トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘導性腸炎では LPA 直腸投与による腸管内腔からの作用により病態が軽減することが示されている (*Digestion. Sturm et al. 2000*)。炎症性腸炎における LPA は炎症性・抗炎症性両面の働きを持つと考えられるが、LPA 受容体との直接的な関わりはこれまで示されていない。本研究の目的は腸管免疫系に高発現する非 Edg 型 LPA 受容体欠損マウスに炎症性腸炎を励起することで、その病態形成機序の一端をあきらかにすることである。これまでに我々は炎症性腸炎モデルとして自然免疫応答優位の DSS 経口投与、Th1 応答優位の TNBS 直腸投与、Th2 応答優位のオキサゾロン直腸投与を試験しており、このうちオキサゾロン誘導性腸炎モデルにおいて LPA $_5$ 欠損マウスの感受性が高いことを見出

した。オキサゾロンはTh2優位の応答による液性免疫や好酸球の活性化をともなう炎症反応を引き起こすとされ、この応答の惹起にはNKT細胞からのTh2サイトカイン産生の関与が示されている(Immunity, Heller *et al.* 2002)。そこで本研究ではTh2応答へのLPA₅シグナル欠損の影響を中心に解析を進める。

3. 研究の方法

炎症性腸炎の惹起とサイトカイン発現解析

C57BL/6n 背景または Balb/c 背景の各遺伝子欠損型マウスとその同腹仔野生型マウスに対し、TNBS またはオキサゾロンで経皮感作したのち、7日後に同じハプテンを直腸内に投与することにより腸炎を誘導した。誘導4日後に個体から大腸を摘出し、大腸全体の解剖学的所見はWallace法によるスコアおよび大腸全長により評価した。結腸及び直腸の病理学的所見はHE染色標本を作製し、Ameho法によるスコアで評価した。DSSは飲水中に含有させ連続1週間の経口投与で腸炎誘導し、4日後に同様の手順で腸炎を評価した。またT細胞およびB細胞が消失した免疫不全であるRAG-1欠損マウスに正常なCD4⁺CD45RB^{high}細胞(ナイーブTh細胞)を導入し、制御性T細胞の不在による腸炎を引き起こすモデルとして、各欠損マウス脾臓由来のCD4⁺CD45RB^{high}細胞を磁気細胞分離とフローサイトメトリーにより分取し、RAG-1欠損マウスに尾静脈注射により移植し腸炎を惹起し、5週間後に同様の手順で腸炎を評価した。腸炎時の腸管組織からmRNAを抽出し、定量的RT-PCR法でTh2応答関連のサイトカインや免疫グロブリンであるIL-4、IL-5、IL-13、IL-25、IgG1、IgEに加えTNF- α 、IFN- γ 、TGF- β 、IL-12 α および β 、IL-6、IL-1 β 、IL-2、IL-10、IL-17 α 、IL23 α といったT細胞分化に関与する炎症性・抗炎症性サイトカインレベルを比較した。

腹腔洗浄液中の免疫細胞のFACS解析

マウス腹腔にリン酸緩衝生理食塩水を注射し、回収した腹腔洗浄液について、c-Kit⁺Fc ϵ RI α ⁺腹腔マスト細胞、F4/80⁺マクロファージ、 $\gamma\delta$ TCR⁺ $\gamma\delta$ T細胞、B220⁺CD5⁺B-1細胞、B220⁺CD5⁺B-2細胞の構成比をフローサイトメーターで解析した。

受動全身アナフィラキシー(PSA)と受動皮膚アナフィラキシー(PCA)応答

PSAは抗DNP IgEを尾静脈投与し、翌日DNP-BSAとエバンスブルー(EB)を尾静脈注射後に経時的に直腸体温を測定する。EBを入れない同様の実験も行い、体温が最も低下する投与後30分で血清、腹腔洗浄液、耳介、小腸を採取した。血清ヒスタミンの液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、各種プロテアーゼ活性量の生化学アッセイで脱顆粒応答を測定した。腹腔洗浄液、耳介、小腸について透過型電子顕微鏡観察を行い、腹腔・皮膚・腸管マスト細胞について、顆粒の形態や数量、PSA時の脱顆粒の程度を組織形

態学的に観察した。

PCAは片耳の耳介皮下に抗DNP IgE、もう片方に比較用にPBSを注射し、翌日DNP-BSAとEBを尾静脈注射し、30分後に耳介の厚みを計測し、浮腫の有無を確認後、耳介を採取し、EBを抽出して血管透過性の亢進を確認した。EBを入れずに同様の実験を行い、耳介の組織切片を作製し、トルイジンブルー染色で脱顆粒した細胞数を計測した。また電子顕微鏡観察で形態を観察する。また耳介中の各種プロテアーゼ活性量を生化学アッセイで計測した。

4. 研究成果

LPA₅およびLPA₆について、それぞれの欠損マウスに炎症性腸炎を惹起した。炎症性腸炎モデルとして自然免疫応答優位のDSS経口投与、Th1応答優位のTNBS直腸投与、Th2応答優位のオキサゾロン直腸投与、Treg減損による腸炎を発症するRag1欠損マウスへのCD45RB^{high}細胞の移植実験を試験し、このうちオキサゾロン誘導性腸炎モデルにおいて、LPA₅の欠損マウスで感受性が高かった(図1)。一方LPA₆欠損マウスでは各腸炎モデルにおいて炎症応答の変化は見られなかった。

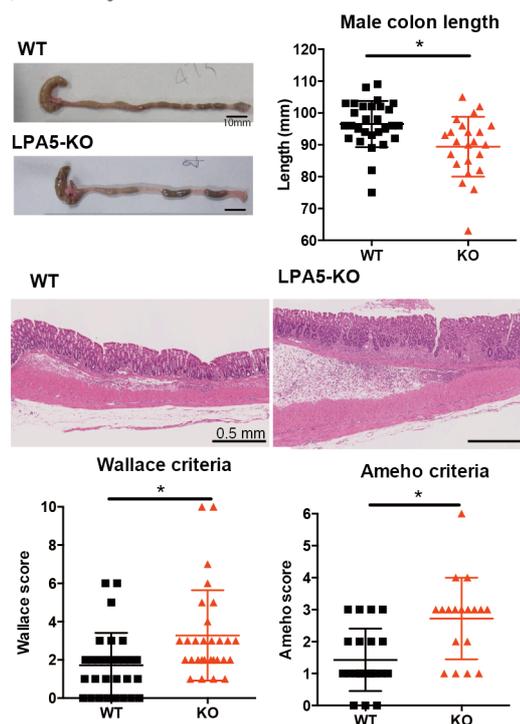


図1 LPA₅のオキサゾロン誘導性腸炎

LPA₅欠損マウスにおける炎症応答やT細胞分化制御へのLPA受容体欠損の影響を調べるため、腸炎時の腸管組織からmRNAを抽出し、定量的RT-PCR法を用いて、特に重視されるTh2応答関連のサイトカインや免疫グロブリンあるIL-4、IL-5、IL-13、IL-25に加え、TNF- α および β 、IL-6、IL-1 β 、IL-2、IL-10、IL-17 α 、IL-23 α といったT細胞分化に関与する炎症性・抗炎症性サイトカインレベルを比

較したところ、IL-4 と IL6 が有為に増加していることが見出された (図 2)。一方で、Th2 優位とされる Balb/c 背景では野生型および LPA5 欠損マウスともにオキサゾロン腸炎の感受性が増加したが、C57BL6 背景で見られた明確な差は見られなかった。

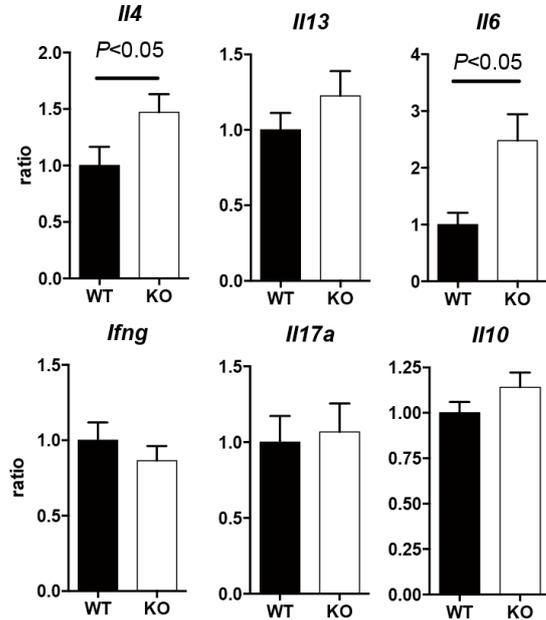


図 2 オキサゾロン腸炎の大腸定量的 PCR

一方 Th2 応答に関連する全身免疫応答として、マスト細胞の関与する全身性受動アナフィラキシー応答を試験したところ、LPA5 欠損マウスでは明確な増悪化が見られ、LPA6 欠損マウスでは見られなかった (図 3)。

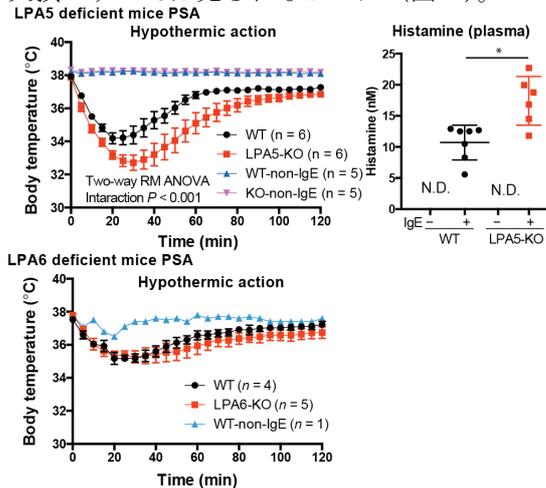


図 3 全身性アナフィラキシー応答

腹腔洗浄液の FACS 解析によりマスト細胞、マクロファージ、B 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞数を比較したところ、結合組織型マスト細胞の数は LPA5 欠損マウスと野生型では同程度だったが、LPA5 欠損マウスのマスト細胞は細胞密度を示す SSC が高く、FcεRIα が高発現していた。マスト細胞が関連する Th2 応答の増強の要因と考えられ、同様の変化が粘膜

マスト細胞でも起きている可能性があることが示唆された。一方、LPA5 欠損マウスの腹腔洗浄液中ではマクロファージ数は減少し、B 細胞数は増加していた (図 4)。このため C57BL/6 背景の LPA5 欠損マウスにおいて Th2 応答優位の粘膜免疫系の腸炎や全身免疫系のアナフィラキシー応答が増悪化する背景には、炎症が惹起される以前に個体レベルで Th2 応答優位に偏っていることが一因にあることが示唆された。

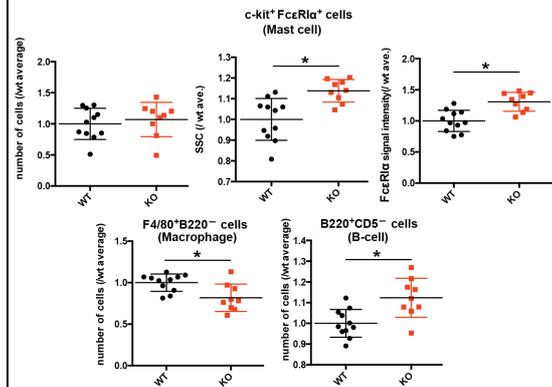


図 4 腹腔洗浄液中の細胞プロファイル

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 3 件)

1. Takeda A, Kobayashi D, Aoi K, Sasaki N, Sugiura Y, Igarashi H, Tohya K, Inoue A, Hata E, Akahoshi N, Hayasaka H, Kikuta J, Scandella E, Ludewig B, Ishii S, Aoki J, Suematsu M, Ishii M, Takeda K, Jalkanen S, Miyasaka M, Umemoto E. Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *Elife*. 5: e10561. 2016
2. Hata E, Sasaki N, Takeda A, Tohya K, Umemoto E, Akahoshi N, Ishii S, Bando K, Abe T, Kano K, Aoki J, Hayasaka H, Miyasaka M. Lysophosphatidic acid receptors LPA4 and LPA6 differentially promote lymphocyte transmigration across high endothelial venules in lymph nodes. *Int Immunol*. (Epub ahead of print) 2015
3. Igarashi H, Akahoshi N, Ohto-Nakanishi T, Yasuda D, Ishii S. The lysophosphatidic acid receptor LPA4 regulates hematopoiesis-supporting activity of bone marrow stromal cells. *Sci Rep*. 5:11410. 2015

[学会発表] (計 2 件)

1. Akahoshi N, Taketomi Y, Murakami M, Ishii S. Exacerbation of passive

anaphylaxis in LPA5 deficient mice.
日本生化学会大会，口頭&ポスター，
9/2016，仙台

2. 赤星軌征，武富芳隆，村上誠，石井聡.
リゾホスファチジン酸第 5 受容体
(LPA5) シグナルによるマスト細胞抑制
機構. 日本脂質生化学会，口頭&ポスター，
6/2016，秋田

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤星 軌征 (AKAHOSHI NORIYUKI)
秋田大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：70534551

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()