

令和元年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05085

研究課題名(和文) 脂質メディエーター、リゾホスファチジルセリンのリンパ球における新規機能の解明

研究課題名(英文) A novel immunomodulatory role of a lysophospholipid mediator, lysophosphatidylserine, in lymphocytes.

研究代表者

青木 淳賢 (AOKI, JUNKEN)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：20250219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が同定したリゾホスファチジルセリン(LysoPS)受容体を介するLysoPSの機能解析をLysoPS受容体KOマウスを用い行った。特に、LysoPS受容体はT、B細胞をはじめとする免疫系の細胞に特異的に発現するため、本研究では抗原免疫応答に対するLysoPS受容体の機能解明を行った。抗原免疫モデルにおいて、KOマウスでは顕著なT細胞、B細胞数の増加を認めたことから、LysoPSシグナルは免疫抑制作用を発揮することが判明した。また、リンパ球が活性化する状況でLysoPSが顕著に増加することを見出した。今後、LysoPSの産生機構を明らかにする上で重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRは創薬の標的として有望である。本研究では、これまで未解明だった生理活性脂質リゾホスファチジルセリン(LysoPS)のGPCRを介する機能を世界に先駆けて明らかにすることができた。ホスファチジルセリン(PS)が免疫系に深く関与することは示唆されていたが、PSの一部はLysoPSに変換され機能することが想定される。本知見は、新規生理活性脂質の生体内機能を明らかにしたという、基礎的な貢献だけでなく、新規免疫抑制剤開発のための新たな分子標的を提供したという点においても、新規創薬を促進する極めて有用な情報となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the phenotypic analyses of KO mice of LysoPS receptors which was identified in our laboratory. Since LysoPS receptors are specifically expressed in immune cells such as T and B cells, we examined the antigen immune responses in the LysoPS receptor KO mice. In the antigen-immunized model, significant increase in the numbers of T cells and B cells was observed in KO mice, which revealed that LysoPS signal exerts an immunosuppressive function. In addition, we found that LysoPS was significantly increased in the situation where lymphocytes were activated. The information will help to understand the synthetic pathway of LysoPS in the future study.

研究分野：生理活性脂質

キーワード：リゾリン脂質 生理活性脂質 GPCR 抗原免疫 B細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質がエイコサノイドやステロイドなどに次ぐ第2世代の脂質メディエーターとして注目されている。このようなリゾリン脂質にリゾホスファチジン酸 (LPA)、スフィンゴシン1リン酸 (S1P) がある。これら LPA、S1P は、作用機構 (受容体・下流シグナル)、産生機構 (産生酵素) が明らかにされ、個体レベルでの機能解析が進んでいる。申請者はこれまで、LPA の受容体や産生酵素を複数同定し、ノックアウト (KO) マウス、ヒト遺伝病の解析を通じ数々の LPA の生体内機能解明を行ってきた。一方、本研究でとりあげるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) は極性頭部にセリンを有するリゾリン脂質であり、マスト細胞活性化などの薬理作用が知られていた。しかし、生体内での存在、産生・作用機構が不明であったため、LysoPS がリゾリン脂質メディエーターとして生体内でどのような機能を持つかについては全く不明であった。

申請者は、毛包上皮細胞において LPA₆ 受容体の下流で EGF 受容体リガンドの一種である TGF が細胞膜から切り出される現象をヒントに GPCR の活性化を検出する新規手法 (TGF 切断アッセイ) を開発した。申請者は本法と約 80 種類のオーファン GPCR cDNA を用い、

LysoPS に応答する GPCR を探索し、P2Y10 と GPR174 が LysoPS に特異的に応答すること、げっ歯類にのみ存在する LPS₂/P2Y10 の近縁受容体にも LysoPS が反応することを見出した。また 4 つの LysoPS 受容体を LPS1, LPS2, LPS_{2L}, LPS3 と呼ぶことを提唱し、現在、この名称が広く受け入れられている。この様な状況のもと、本研究は、新規リゾリン脂質メディエーターリゾホスファチジルセリン (LysoPS) の生体内の機能解明を目的としてスタートした。

2. 研究の目的

本研究では、同定した LysoPS 受容体のノックアウト (KO) マウスを用いることで、新規リゾリン脂質メディエーター LysoPS の生体内機能を解明することを目的とした。特に、予備的知見では、LysoPS 受容体はリンパ組織の T, B 細胞に発現が高いことが判明していたため、リンパ球の機能に着目した KO マウスの表現型解析を行うことが目的である。本研究ではさらに、病態との関連を明らかにし、最終的に LysoPS 受容体を標的とした創薬シーズ探索を行うことを目標とした。

以下が、研究開始当初の課題であった。

- ・ LysoPS 受容体 KO マウスを用い、リンパ球機能における LysoPS 受容体の関与を明らかにする。
- ・ 疾患と LysoPS の関係を明らかにするため、ヒト臨床検体中の LysoPS のレベルを測定する。
- ・ LPS₂, LPS₃ アゴニスト・アンタゴニスト活性を有する低分子化合物をスクリーニングし、新規自己免疫疾患治療薬・抗がん薬のシーズ探索を行う。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いて、LPS₁, LPS₂, LPS₃, LPS_{2L} のダブル、トリプル KO マウスを作製する。特に、機能の重複が予想される、LPS₂・LPS₃・LPS_{2L} の TKO マウス、LPS₂・LPS_{2L} の DKO マウスの作製を行う。LPS₂, LPS₃, LPS_{2L} は T, B リンパ球での発現が高いため、免疫モデルを作製し、免疫応答を調べる。

表現型が見られた場合は、単離した B, T 細胞を用い、LysoPS シグナルがどのような細胞機能を調節するかについて検討する。

東京大学大学院薬学系研究科大和田智彦教授との共同研究において作製された LysoPS 構造アナログを TGF 切断アッセイで評価することにより、高活性の LysoPS 受容体の作動薬の創製を行う。

ヒト臨床検体 (血漿、血清、尿等) 中の LysoPS のレベルを LC-MS/MS を用いて定量した。また、LysoPS の産生酵素と考えられるホスファチジルセリン (PS) 特異的ホスホリパーゼ A₁ (PS-PLA₁) のレベルをサンドイッチ ELISA 法に基づき測定した。

4. 研究成果

(1) LysoPS 受容体 KO マウスを用いた LysoPS の免疫応答における役割

リゾリン脂質メディエーターの一種であるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) は、古くからマスト細胞の脱顆粒促進作用等、多様な生理活性を示す。近年、LysoPS 特異的に応答する 4 つの G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) が相次いで同定され、その生体内における機能の解明が期待される。この内、新規 LysoPS 受容体である LPS₂, LPS_{2L}, LPS₃ (以下 LPS_{2/2L/3}) は免疫系組織に限局した発現パターンを示し、T 細胞や B 細胞といったリンパ球に高発現することから、リンパ球上で何らかの機能を有していることが想定されたが、その機能は不明であった。本研究では、各 LysoPS 受容体 KO マウスや選択的アゴニストを用いて、細胞・個体レベルでリンパ球における新規 LysoPS 受容体の機能解析を行った。

まず、T 細胞の機能として、サイトカイン産生に着目して解析した。マウス脾臓細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激した際の各サイトカイン (IL-2, 4, 17A, 10, IFN-) 量に対する LysoPS の効果を検討した結果、LysoPS は IL-2 量を顕著に減少させた。また、LPS₃ 選択的アゴニストは

LysoPS と同等な IL-2 産生抑制効果を示し、LPS₃ KO マウス由来の脾臓細胞では LysoPS の IL-2 抑制効果が消失した。このことから、LysoPS/LPS₃ signal が活性化 T 細胞の IL-2 産生を抑制する機能を有することが明らかとなった (文献(4))。

次に、B 細胞における新規 LysoPS 受容体の機能解析を行った。新規 LysoPS 受容体は共通して G₁₃ に強く共役する。最近、B 細胞特異的 G₁₃ KO マウスが作製され、B 細胞上の G₁₃ signal は抗体産生に重要な胚中心 B 細胞 (GC B cell) の数を負に制御することが示された。そこで、B 細胞に高発現し、G₁₃ に強く共役する新規 LysoPS 受容体の機能として、GC B cell 数の制御に着目し、解析を行った。まず、抗原投与後の所属リンパ節における発現パターンを調べると LPS_{2/2L/3} は Outer Follicle に存在し、GC B cell の前駆細胞として考えられる Non-GC B cell に高発現することが明らかとなった。次に、各 LysoPS 受容体 KO マウスに抗原投与し、各 B 細胞の数を調べると、LPS_{2/2L} DKO マウスで両細胞とも顕著な増加が認められた。また、LPS_{2/2L} DKO マウスでは、Outer Follicle で GC B cell の前駆細胞と考えられる GL7+細胞が多い様子が観察された。このことから、LPS_{2/2L} が Non-GCB から GC B cell の前駆細胞への分化・あるいはその数を負に制御する機能を有していることが示された。LPS_{2/2L} の作用メカニズムを調べるため、マウスから単離した B 細胞を用いて解析を行った。その結果、LPS_{2/2L} が G₁₃ signal 依存的に活性化 B 細胞の接着を抑制することが明らかとなった。Outer Follicle において、Non-GC B cell は CD4 T cell と接着・相互作用し、増殖後、GC B cell へと分化することが知られている。細胞レベルの解析から、B 細胞上で LPS_{2/2L} は CD4 T cell との接着・相互作用を抑制し、その増殖や胚中心 B 細胞への分化を抑制することが示唆された。

(2) LysoPS 受容体作動薬の開発

東京大学大学院薬学系研究科大和田知彦教授の研究室で合成された LysoPS 構造類似体の 3 種類の LysoPS 受容体に対する活性を TGF 切断アッセイで評価した。さらに、各受容体への親和性、選択性が増加した LysoPS 類似体の構造を組み合わせる事により、LysoPS と比較し、100-1,000 の親和性を持つ、各 LysoPS 受容体に選択的作動薬の創製に成功した(文献(3), (5))。

(3) ヒト臨床サンプルにおける LysoPS・PS-PLA₁ の発現

様々な臨床検体中の LysoPS・PS-PLA₁ のレベルを測定した。心筋梗塞患者の血漿中で有意な LysoPS の上昇を認めた (文献(9))。また、全身性エリテマトーデス (SLE) の患者血清で PS-PLA₁ のこの現地の上昇を見いだした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- (1) Sayo A, Konishi H, Kobayashi M, Kano K, Kobayashi H, Hibi H, Aoki J, Kiyama H, GPR34 in spinal microglia exacerbates neuropathic pain in mice. *J. Neuroinflamm.* 16: 1458-1468 (2019) <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1458-8> 査読有
- (2) Kurano M, Miyagaki T, Miyagawa T, Igarashi K, Shimamoto S, Ikeda H, Aoki J, Sato S, Yatomi, Association between serum autotaxin or phosphatidylserine-specific phospholipase A1 levels and melanoma. *J. Dermatol.* 45: 571-579 (2018) doi: 10.1111/1346-8138.14278. 査読有
- (3) Yatomi Y, Kurano M, Ikeda H, Igarashi K, Kano K, Aoki J, Lysophospholipids in laboratory medicine., *Proceedings of the Japan Academy, Series B.* 94: 373-389 (2018) doi: 10.2183/pjab.94.025. 査読有
- (4) Shinjo Y, Makide K, Satoh K, Fukami F, Inoue A, Kano K, Otani Y, Ohwada T, Aoki J, Lysophosphatidylserine suppresses IL-2 production in CD4 T cells through LPS3/GPR174. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Dec 9;494(1-2):332-338. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.028. 査読有
- (5) Sayama M, Inoue A, Nakamura S, Jung S, Ikubo M, Otani Y, Uwamizu A, Kishi T, Makide K, Aoki J, Hirokawa T, Ohwada T., Probing the Hydrophobic Binding Pocket of G-Protein-Coupled Lysophosphatidylserine Receptor GPR34/LPS1 by Docking-Aided Structure-Activity Analysis. *J Med Chem.* 2017 Jul 27;60(14):6384-6399. doi: 10.1021/acs.jmedchem. 査読有
- (6) Tokizane K, Konishi H, Makide K, Kawana H, Nakamuta S, Kaibuchi K, Ohwada T, Aoki J, Kiyama H. Phospholipid localization implies microglial morphology and function via Cdc42 in vitro. *Glia.* 2017 May;65(5):740-755. doi:10.1002/glia.23123. 査読有
- (7) Emoto S, Kurano M, Kano K, Matsusaki K, Yamashita H, Nishikawa M, Igarashi K, Ikeda H, Aoki J, Kitayama J, Yatomi Y., Analysis of glycerol-lysophospholipids in gastric cancerous ascites. *J Lipid Res.* 2017, 58(4):763-771. doi: 10.1194/jlr.P072090. 査読有
- (8) Kurano M, Kano K, Dohi T, Matsumoto H, Igarashi K, Nishikawa M, Ohkawa R, Ikeda H, Miyauchi K, Daida H, Aoki J, Yatomi Y., Different origins of lysophospholipid mediators between coronary and peripheral arteries in acute coronary syndrome. *J Lipid Res.* 2017, 58:433-442. doi: 10.1194/jlr.P071803. 査読有

- (9) Nagura Y, Tsuno NH, Kano K, Inoue A, Aoki J, Hirowatari Y, Kaneko M, Kurano M, Matsushashi M, Ohkawa R, Tozuka M, Yatomi Y, Okazaki H. Regulation of the lysophosphatidylserine and sphingosine 1-phosphate levels in autologous whole blood by the pre-storage leukocyte reduction. *Transfus Med.* 26: 365-372 (2016) doi: 10.1111/tme.12326. 査読有
- (10) Kishi T, Kawana H, Sayama M, Makide K, Inoue A, Otani Y, Ohwada T, Aoki J. Identification of lysophosphatidylthreonine with an aromatic fatty acid surrogate as a potent inducer of mast cell degranulation. *Biochem Biophys Rep.* 8: 346-351 (2016). doi: 10.1016/j.bbrep. 査読有
- (11) Jung S, Inoue A, Nakamura S, Kishi T, Uwamizu A, Sayama M, Ikubo M, Otani Y, Kano K, Makide K, Aoki J, Ohwada T. Conformational Constraint of the Glycerol Moiety of Lysophosphatidylserine Affords Compounds with Receptor Subtype Selectivity. *J Med Chem.* 59: 3750-3776 (2016) doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01925. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 青木淳賢、新規脂質メディエーターリゾホスファチジルセリン -機能と作動薬開発-、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日、石川県金沢市、口頭、国内
- (2) 佐山美紗、井上飛鳥、青木淳賢、広川貴次、関嶋政和、尾谷優子、大和田智彦 脂質リガンドの GPCR への結合機構の解明のための誘導体合成と計算科学の融合研究、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日、石川県金沢市、口頭、国内
- (3) 青木淳賢 免疫応答の負の制御因子としてのリゾホスファチジルセリン、日本生化学会第 91 年会、2018 年 9 月 24-26 日、京都市、口頭(招待講演) 国内
- (4) 佐藤美希、深見郁也、新上雄司、可野邦行、青木淳賢 PS-PLA1 安定発現癌細胞株の作製と腫瘍免疫における PS-PLA1 の役割、日本生化学会第 91 年会、2018 年 9 月 24-26 日、京都市、口頭、国内
- (5) 深見郁也、佐藤慧太、新上雄司、青木淳賢 初代培養 B 細胞を用いたリゾホスファチジルセリン産生酵素の探索、日本生化学会第 91 年会、2018 年 9 月 24-26 日、京都市、口頭、国内
- (6) 辰己茉菜絵、新上雄司、佐藤慧太、深見郁也、可野邦行、上水明治、久下理、青木淳賢 活性化 B 細胞における LysoPS 産生機構の解析、日本生化学会第 91 年会、2018 年 9 月 24-26 日、京都市、口頭、国内
- (7) Junken Aoki, Two glycerolysophospholipid mediators, lysophosphatidic acid and lysophosphatidylserine: structures, receptors, synthetic pathways and biological significance., FASEB Summer Research Conference, Lysophospholipid and Related Mediators - From Bench to Clinic, 2017 年 8 月 20-25 日, New Orleans, United States, 口頭, 国外
- (8) 金藤奨、井上飛鳥、青木淳賢、LysoPS 受容体のリガンド認識機構解明、日本生化学会東北支部第 83 回例会・シンポジウム、2017 年 5 月 27 日、東北大学さくらホール、仙台、国内
- (9) 深見郁也、奥谷倫世、巻出久美子、青木淳賢、自己免疫性リンパ球増殖症における新規 LysoPS 受容体の機能解析、日本生化学会東北支部第 83 回例会・シンポジウム、2017 年 5 月 27 日、東北大学さくらホール、仙台、国内
- (10) 深見郁也、佐藤慧太、根本祥季、巻出久美子、青木淳賢、急性腹膜炎におけるリゾリン脂質メディエーター LysoPS の変動及び機能解析、口頭、日本薬学会第 137 年会、仙台国際会議場、他、2017 年 3 月 24-27 日、国内
- (11) 上水明治、巻出久美子、中村翔、井上飛鳥、尾谷優子、大和田智彦、青木淳賢、リゾホスファチジルセリン受容体 LPS1/GPR34 に対する強力且つ選択的アゴニストの開発とその応用、ポスター、第 89 回日本生化学会、仙台国際会議場、他、2016 年 9 月 25-27 日、国内
- (12) 岸貴之、佐山美紗、巻出久美子、川名裕己、井上飛鳥、尾谷優子、大和田知彦、マスト細胞上の LysoPS 受容体探索ツールの開発、口頭、青木淳賢、第 58 回日本脂質生化学会、秋田市にぎわい交流館 AU、2016 年 6 月 9-10 日、国内

〔その他〕

ホームページ等：URL：<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H28/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大和田 智彦教授

ローマ字氏名：Ohwada Tomohiko

研究協力者氏名：矢富 裕教授

ローマ字氏名：Yatomi Yutaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。