

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18867

研究課題名(和文)新規生理活性脂質受容体の生理的及び病態生理的役割の解明

研究課題名(英文)Physiological and pathophysiological roles of an orphan G protein-coupled receptor

研究代表者

谷川 尚(TANIKAWA, TAKASHI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：00609985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GPR55は、ヒトでは319個のアミノ酸からなるGタンパク質共役型受容体であり、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルイノシトール(LPI)に対する特異的な受容体である。GPR55は、免疫系組織に高く発現しており、B及びT細胞のGPR55の発現は、成熟過程が進むにつれて高くなることが観察された。また、細胞の活性化によりGPR55の発現が変化することがわかった。細胞にLPIを作用させると、細胞増殖が促進された。これらのことから、免疫系の細胞に発現しているGPR55とその内在性リガンドであるLPIは、生体内でリンパ球の増殖促進・分化、そして免疫応答の調節に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：GPR55 is an orphan G protein-coupled receptor and a putative novel type of cannabinoid receptor. Lysophosphatidylinositol (LPI) is an endogenous ligand for GPR55. It has been reported that GPR55 mRNA expresses in immune system. This study revealed that GPR55 mRNA expression was increased with the progression of maturation of T cells in thymus and was high in T cells in spleen compared to thymus. The level of GPR55 mRNA in B cells derived from bone marrow was higher than those from spleen. The level of GPR55 mRNA changed when the cells were activated. LPI promoted the cell proliferation. It seems that GPR55 and LPI of its endogenous ligand modulate the cell proliferation, cell differentiation and immune response in immune system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂質生化学 リゾリン脂質 Gタンパク質共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

マリファナの主要活性成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) などのカンナビノイドは、特異的な受容体(カンナビノイド受容体)を介して作用することが知られている。カンナビノイド受容体としては、CB1 受容体及び CB2 受容体の二つの受容体が同定されている。1992年に内在性リガンドの候補として N-アラキドノイルエタノールアミン(アナンダミド)がブタの脳から単離されたが、その後、アラキドン酸含有のモノアシルグリセロールである 2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)が、もう一つの内在性カンナビノイド受容体リガンドであるということが明らかにされた。構造活性相関を調べた結果、カンナビノイド受容体(CB1受容体、CB2受容体)の真の内在性リガンドは、アナンダミドではなく 2-AG であるということが明らかになっている。

内在性リガンドの発見や、ノックアウトの開発によって、カンナビノイド受容体に関する研究は、大きく進展した。しかしながら、それらの結果から、CB1受容体やCB2受容体とは異なる受容体の存在が示唆されるようになった。2000年代の半ばには、Gタンパク質共役型のオーファン受容体の一つである GPR55 が、CB1受容体、CB2受容体に次ぐ第3のカンナビノイド受容体であるという報告がなされた。GPR55は、ヒトの場合、319個のアミノ酸からなっており、G_{12/13}と共役していると考えられている。GPR55の内在性リガンドの探索を開始し、リゾホスファチジルイノシトール(LPI)にアゴニストとして強い活性があることを明らかにした。一方、LPI以外のリゾリン脂質には、GPR55に対する活性は全く認められなかった。これらの結果は、LPIがGPR55の内在性リガンドであることを明確に示すものであった。GPR55を発現させた細胞において、LPIがERK(p42/44MAPキナーゼ)のリン酸化を引き起こすことを明らかにした。GPR55は、免疫系の組織である脾臓及びリンパ節、消化器系組織である小腸及び大腸などで比較的高い発現していることを明らかにしてきた。

このように GPR55 の内在性リガンドがリゾリン脂質である LPI であるということが明らかになったわけであるが、GPR55 に関する研究はまだ始まったばかりであり、これらの受容体の役割や、生理的あるいは病態生理的意義等に関しては、まだ多くの事柄が不明のままである。

2. 研究の目的

カンナビノイド受容体の分布は細胞や組織によって大きく異なることが知られている。CB1受容体は脳に多く発現しており、中枢神経系の機能調節に関わっている。一方、CB2受容体は末梢組織に存在するカンナビ

ノイド受容体であり、特に免疫細胞に多く発現している。GPR55は、免疫系の組織での発現が高く、CB2受容体と似た発現分布をしている。したがって、GPR55はCB2受容体と同様に免疫系の組織において重要な役割を担っていることが考えられる。今回の研究では、免疫細胞での GPR55 の発現及び発現の変化を詳細に調べた。また、GPR55とその内在性リガンドであるリゾホスファチジルイノシトール(LPI)の生理的役割はまだよく解明されていない。今回の研究では、GPR55が発現している細胞に及ぼすLPIの影響について調べ、生理的・病態生理的意義を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) GPR55 の発現及び発現の変化

様々な T 細胞、B 細胞を各種組織から抽出し、FACS Aria を用いて目的の細胞を単離した。また、GPR55 mRNA の発現変化は、刺激剤で細胞を刺激した。GPR55 mRNA は、トータル RNA から cDNA を合成し、これを鋳型として、リアルタイム PCR 法により調べた。検出法としては、SYBR Green I を用いたインターカレーター法を用いた。

(2) 細胞増殖に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールの影響

ヒトリンパ芽球系細胞株 IM-9 細胞またはマウスから抽出した細胞を用いて実験を行なった。細胞に LPI を加え、37°C で一定時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を回収し、細胞数を血球計算盤を用いて計数した。

4. 研究成果

(1) 各種 T 細胞における GPR55 の発現

GPR55は、免疫系の組織で比較的高く発現していることを明らかにした。また、免疫細胞について GPR55 の発現を調べた結果、B 細胞及び T 細胞に比較的高い発現が観察されたことを報告してきた。今回は、まず GPR55 が発現している T 細胞を用いて成熟過程での GPR55 の発現変化を調べた。その結果、T 細胞が成熟するにつれて GPR55 mRNA の発現が高くなった。脾臓から単離した T 細胞は、胸腺から単離した T 細胞よりも GPR55 mRNA の発現が高いことが観察された(図1)。

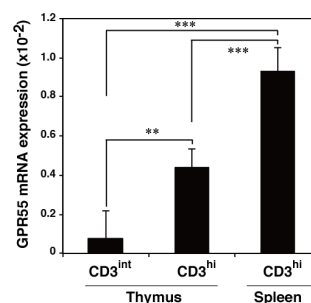


図1 様々な T 細胞の GPR55 mRNA の発現

以前の結果から、B 細胞に GPR55 が発現していることから、次に、B 細胞の成熟過程における発現を調べた。その結果、B 細胞も T 細胞と同様に成熟過程が進むにつれて GPR55 mRNA の高い発現が観察された (図 2)。

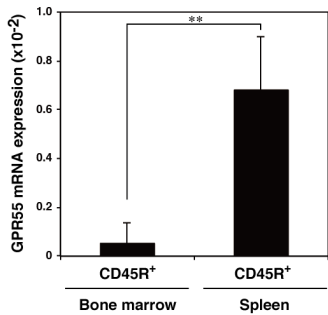


図 2 各種 B 細胞における GPR55 mRNA の発現

成熟過程が進むにつれて T 細胞での GPR55 mRNA の発現が高くなることが観察されたことから、成熟した T 細胞について調べた。脾臓から単離した T 細胞を CD4 と CD8 にわけ、GPR55 mRNA の発現を調べた結果、CD8⁺ T 細胞は CD4⁺ T 細胞と比較して GPR55 mRNA の高い発現が見られた (図 3)。

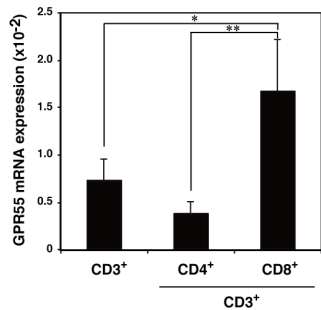


図 3 各種 T 細胞における GPR55 の発現

成熟過程が進むにつれて B 細胞での GPR55 mRNA の発現が高くなることが観察されたことから、様々な B 細胞について調べた。脾臓から単離した B 細胞を濾胞 B 細胞と辺縁帯 B 細胞に FACS Aria を用いてわけ、GPR55 mRNA の発現を調べた。その結果、辺縁帯 B 細胞は濾胞 B 細胞と比較して GPR55 mRNA の高い発現が見られた (図 4)。

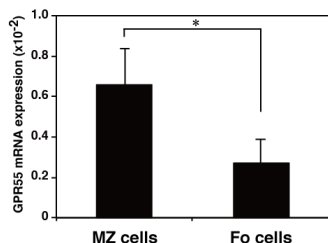


図 4 様々な B 細胞における GPR55 mRNA の発現

次に活性化状態における GPR55 mRNA の

発現変化について調べた。IM-9 細胞に刺激剤で活性化すると、GPR55 mRNA の発現が高くなった (図 5)。

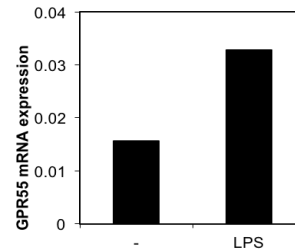


図 5 活性化における GPR55 mRNA の発現

これらの結果から、B 及び T 細胞の GPR55 の発現は、成熟過程が進むにつれて高くなることが観察された。また、細胞の活性化により GPR55 の発現が変化することがわかった。成熟したリンパ球において GPR55 の発現が高いことから、免疫応答の調節において何らかの役割を担っているものである可能性がある。

(2) 細胞増殖に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールの影響

各免疫細胞における GPR55 mRNA の発現を調べた結果、B 細胞に高い発現が観察された。このことから、GPR55 及び LPI は B 細胞における生理的役割に関わっている可能性が考えられる。そこで、GPR55 及び LPI の B 細胞に対する役割を解明するために、GPR55 を発現しているヒト B リンパ芽球系細胞株である IM-9 細胞を用いて、細胞増殖に及ぼす LPI の影響を詳細について調べた。IM-9 細胞に LPI を作用させると、LPI は IM-9 細胞の細胞増殖を促進させた (図 6)。

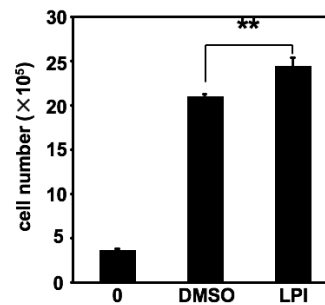


図 6 IM-9 細胞の LPI 刺激による細胞増殖促進効果

LPI による IM-9 細胞の細胞増殖促進効果が観察されたことから、次に LPI 以外のリゾリン脂質に IM-9 細胞の細胞増殖促進効果がみられるかどうかを調べた。その他のリゾリン脂質として今回の研究では、LPA、LPC、LPE について調べた。その結果、LPI 以外には LPI で確認された IM-9 細胞の細胞増殖促進効果は認められなかった (図 7)。

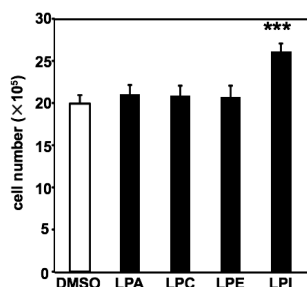


図7 リゾリン脂質による細胞増殖促進効果

最後にマウスから単離したリンパ節細胞におけるLPIによる細胞増殖促進効果を調べた。その結果、LPIによりリンパ節細胞の細胞増殖が促進した(図8)。

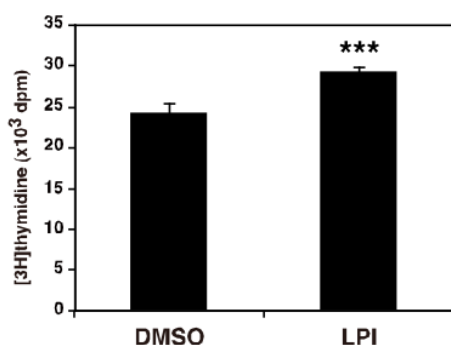


図8 マウスリンパ節細胞のLPIによる細胞増殖促進効果

以上のことから、LPIは、GPR55を発現している免疫担当細胞に作用して、細胞増殖の調節等に関与している可能性がある。

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 3 件)

Yamashita, A., Hayashi, Y., Matsumoto, N., Nemoto-Sasaki, Y., Koizumi, T., Inagaki, Y., Oka, S., Tanikawa, T., Sugiura, T. Coenzyme-A-Independent Transacylation System; Possible Involvement of Phospholipase A2 in Transacylation. *Biology (Basel)* **6**, (2017) doi: 10.3390/biology6020023 査読有

Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Matsumoto, N., Tanikawa, T., Oka, S., Tanaka, Y., Arai, S., Wada, I., Sugiura, T., Yamashita, A. Carboxyl-terminal Tail-mediated Homodimerizations of Sphingomyelin Synthases Are Responsible for Efficient Export from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem.* **292**, 1122-1141. (2017) doi: 10.1074/jbc.M116.746602. 査読有

Peng, D., Tanikawa, T., Li, W., Zhao,

L., Vatan, L., Szeliga, W., Wan, S., Wei, S., Wang, Y., Liu, Y., Staroslawska, E., Szubstarski, F., Rolinski, J., Grywalska, E., Stanislawek, A., Polkowski, W., Kurylcio, A., Kleer, C., Chang, A.E., Wicha, M., Sabel, M., Zou, W., Kryczek, I. Myeloid-Derived Suppressor Cells Endow Stem-like Qualities to Breast Cancer Cells through IL6/STAT3 and NO/NOTCH Cross-talk Signaling. *Cancer Res.* **76**, 3156-3165. (2016) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2528. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

谷川 尚 他 マウスリンパ球におけるGタンパク質共役型受容体GPR55の機能 第89回日本生化学会大会 2016年9月27日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

谷川 尚 他 Gタンパク質共役型受容体GPR55のマウス免疫系細胞における発現及び機能について 日本薬学会 第136年会 2016年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

谷川 尚 他 マウスT細胞及びB細胞におけるGタンパク質共役型受容体GPR55の発現 第88回日本生化学会大会 2015年12月2日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

Takashi Tanikawa, Saori Oka, Takayuki Sugiura. GPR55 and its endogenous ligand. Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference. 2015 May 25-28, Lucca (Italy)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷川 尚 (TANIKAWA TAKASHI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：00609985

(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

()