

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590097

研究課題名(和文)新規脂質メディエーター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 a novel lipid mediator receptor

研究代表者

杉浦 隆之(SUGIURA, TAKAYUKI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：40130009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：GPR55は、1999年にクローニングされたGタンパク質共役型の受容体であり、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。今回の研究で、GPR55は免疫系の組織に高い発現が観察された。リンパ球においては、T細胞及びB細胞において高い発現が見られた。また、LPIは、B細胞株の抗体分泌や細胞増殖を促進させた。これらのことからLPIは、GPR55を発現している免疫担当細胞に作用して、免疫の調節等に関与している可能性が示唆された。

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. Its endogenous ligand is lysophosphatidylinositol (LPI). This study revealed that high levels of GPR55 mRNA were observed in the immune organs such as spleen and lymph nodes. The expression of GPR55 mRNA in the immune cells was examined. High levels of GPR55 mRNA expression were observed in T and B cells. LPI enhanced the IgG secretion from B cell lines and prompted the proliferation via a GPR55 dependent manner. It seems possible that GPR55 plays important physiological and/or pathophysiological roles in the function of the immune system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リゾリン脂質 脂質生化学

1. 研究開始当初の背景

1990年代の始めに、マリファナの主要活性成分である⁹-テトラヒドロカンナビノール(⁹-THC)に対する受容体として、カンナビノイド受容体(CB1受容体及びCB2受容体)は同定された。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。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。

ところで、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の内在性リガンドの探索した結果、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は免疫細胞ではヒトBリンパ球由来細胞株であるIM-9細胞に高いレベルで発現しており、LPIで刺激することによりp38MAPKが活性化することが報告されている。Bリンパ球はGPR55を介してLPIにより活性化されることから、GPR55は免疫組織内におけるBリンパ球の機能と関わっている可能性がある。

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の各細胞による発現量や生体内分布については、一部の株化した細胞や患者から採取された組織等の限られた情報しか得られていない。今回の研究では、GPR55の発現分布を様々な臓器及び組織を用いて詳細

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・臓器に及ぼすLPIの影響を調べ、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の発現分布

各種白血球系細胞(Tリンパ球、Bリンパ球、マクロファージ、樹状細胞など)、脳、肺、肝臓、脾臓、小腸、大腸、脂肪組織等の正常状態での各種臓器及び組織に存在するGPR55mRNA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ラー法を用いた。

(2) 抗体分泌に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールの影響

ヒトリンパ球系細胞株IM-9細胞に種々の濃度の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、培養上清を回収し、IM-9細胞から上清中に分泌された抗体量を、ELISA法を行うことにより調べた。

(3) 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

ヒトリンパ系細胞株に種々の濃度の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、細胞数を計数した。

4. 研究成果

(1) GPR55の発現分布

まず、マウスの各種臓器及び組織におけるGPR55mRNAの発現について調べた。その結果、消化器系組織である小腸及び大腸、免疫系の臓器である脾臓及びリンパ節などで比較的高い発現が観察された。脳においても発現が見られた。一方、肝臓、腎臓、心臓等での発現はほとんど見られなかった(図1)。

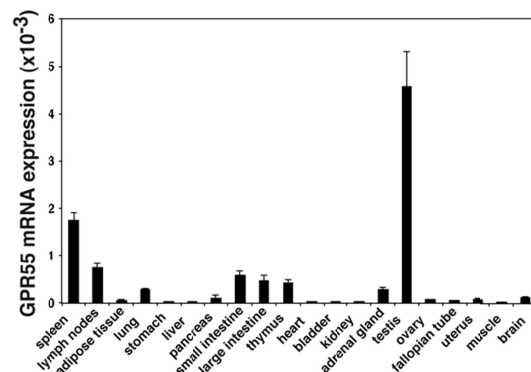


図1 マウス GPR55mRNA の発現分布

マウスの脳に GPR55 が発現していたことから、次に、脳の各部位における発現を調べた。その結果、嗅球において高い発現が観察された(図2)。

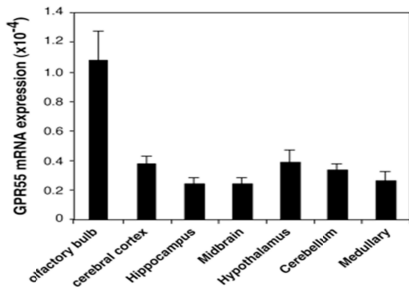


図2 脳の各部位における GPR55 の発現

GPR55 が比較的高く発現していた小腸について詳しく調べた。小腸の部位を粘膜層、筋肉層にわけ、GPR55 mRNA の発現を調べた結果、粘膜層及び筋肉層において GPR55 mRNA の発現が見られた(図3A)。粘膜層を上皮細胞とリンパ球にわけ、GPR55 mRNA の発現を調べたところ、リンパ球に GPR55 mRNA の高い発現が認められた。一方、上皮細胞における GPR55 mRNA の発現は低いものであった(図3B)。

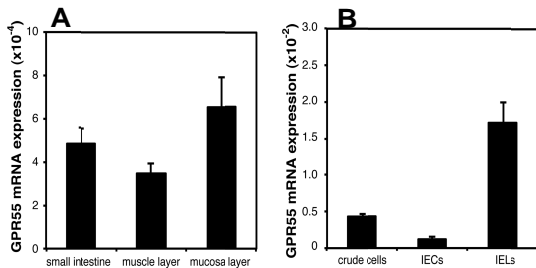


図3 小腸の各部位における GPR55 の発現

GPR55 mRNA の発現が高く見られた免疫組織である脾臓について詳細に調べた。マウスから脾臓を摘出し、Tリンパ球、Bリンパ球、マクロファージ、樹状細胞を FACS Aria を用いて単離した。Tリンパ球、Bリンパ球において高い発現が見られた(図4)。

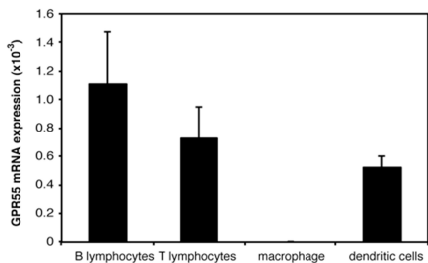


図4 各免疫細胞における GPR55 の発現

これらの結果から、GPR55 mRNA は免疫組織や消化器系組織に発現しており、中でもリ

ンパ球における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) 抗体分泌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リンパ球に高い発現が観察された。このことから、GPR55 及び LPI は Bリンパ球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リンパ球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、抗体分泌に及ぼす 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 細胞の抗体分泌を促進させた。活性は 1 μM 付近から検出され、濃度依存的に増加した(図5)。

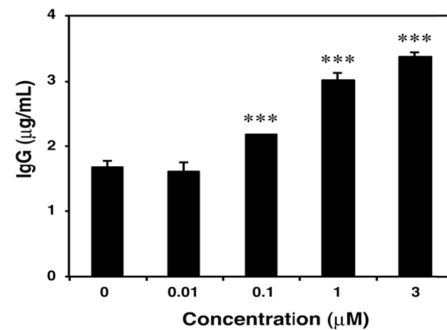


図5 LPI 刺激による IM-9 細胞からの抗体分泌

LPI による IM-9 細胞の抗体分泌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 細胞からの抗体分泌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、LPC について調べた。その結果、LPC には LPI で確認された IM-9 細胞からの抗体分泌促進効果は認められなかった(図6)。

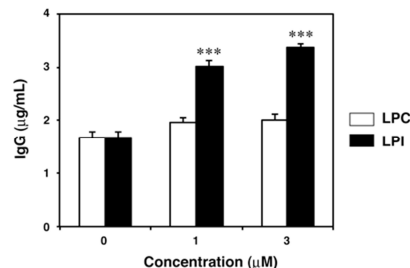


図6 リゾリン脂質による抗体分泌促進効果

最後に IM-9 細胞における LPI による抗体分泌促進効果が、GPR55 を介しているかどうかを調べた。その結果、GPR55 アンタゴニストを処理することにより、LPI による抗体分泌促進効果は抑制された(図7)。

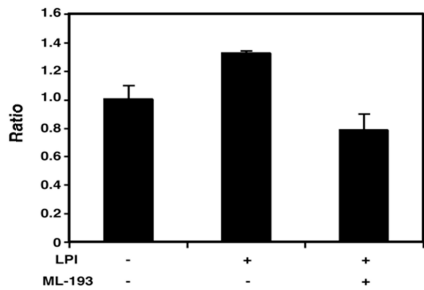


図7 GPR55 アンタゴニストのLPIによる抗体分泌促進効果の抑制

(3) 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

各リンパ系細胞株における GPR55 mRNA の発現を調べた結果、B リンパ球系細胞株である IM-9 や SLVL 細胞に高い発現が観察された (図 8)。

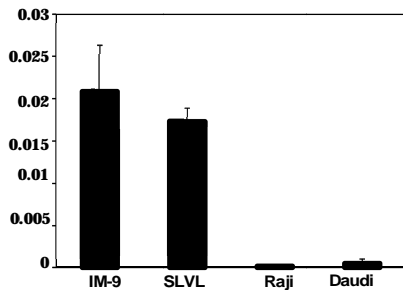


図8 培養リンパ系細胞株のGPR55mRNAの発現

様々な細胞株に LPI を 48 時間反応させると、GPR55mRNA の発現が見られた IM-9 細胞及び SLVL 細胞において、LPI は細胞増殖を促進させた。しかしながら、GPR55mRNA の発現が低い Raji 細胞及び Daudi 細胞には LPI による細胞増殖促進作用はみられなかった (図 9)。

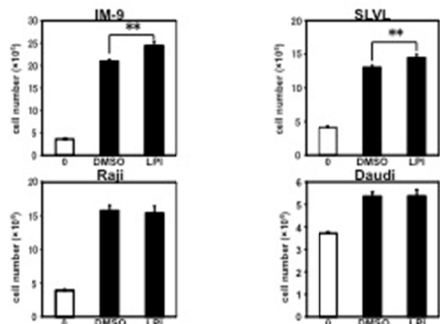


図9 様々な細胞株に対するLPI刺激による細胞増殖に及ぼす影響

LPI の刺激による細胞増殖の促進が観察されたが、この作用が他のリゾリン脂質で見られるのかどうかを調べた。LPA、LPC、LPE のリゾリン脂質を加えて刺激しても LPI で見られる細胞増殖促進効果は観察されなかった (図 10)。

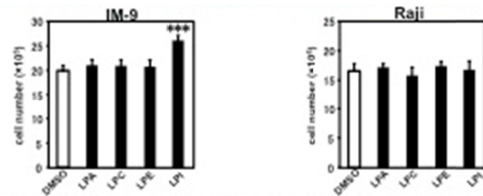


図10 様々なリゾリン脂質に対する細胞増殖に及ぼす影響

この LPI による細胞増殖促進効果が GPR55 を介して影響しているのかどうかを調べた。GPR55 アンタゴニストである ML-193 を加えると LPI 刺激による細胞増殖促進効果が抑制された。この結果から、LPI 刺激による細胞増殖促進効果は、GPR55 を介して行われていることがわかった (図 11)。

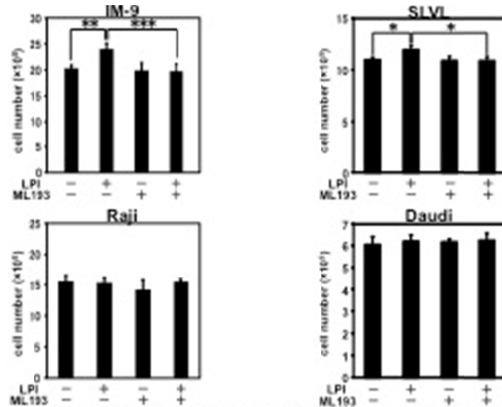


図11 GPR55 アンタゴニストのLPIによる細胞増殖促進効果の抑制

これらの結果から、GPR55 は免疫系の組織及び細胞に発現していることがわかった。GPR55 を発現している免疫担当細胞は、LPI の刺激により、抗体分泌及び細胞増殖の促進効果が観察された。以上のことから、GPR55 は免疫における調節等に関与している可能性が考えられる。

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 4 件)

Yamashita, A., Hayashi, Y., Matsumoto, N., Nemoto-Sasaki, Y., Oka, S., Tanikawa, T., Sugiura, T.

Glycerophosphate/Acylglycerophosphate acyltransferases. *Biology (Basel)*. **3**, 801-830. (2014) 査読有

Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Tanikawa, T., Oka, S., Tsuchiya, K., Zama, K., Mitsutake, S., Sugiura, T., Yamashita, A. Sphingomyelin Synthase 2, but not Sphingomyelin Synthase 1, is Involved in HIV-1 Envelope-mediated Membrane Fusion. *J Biol Chem*. **289**, 30842-30856.

(2014) 査読有

Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K., Sugiura, T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res.* **53**, 18-81. (2014) 査読有

Yamashita, A., Oka, S., Tanikawa, T., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Sugiura, T. The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **107**, 103-116. (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

杉浦隆之 他 ヒト B リンパ芽球系細胞株 IM-9 の抗体分泌に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールの影響 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 28 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)

杉浦隆之 他 G タンパク質共役型受容体 GPR55 リガンドのリンパ芽球様細胞の増殖に及ぼす影響 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 28 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)

杉浦隆之 他 G タンパク質共役型受容体 GPR55 の各種組織における発現分布 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

杉浦隆之 他 培養リンパ芽球様細胞の増殖に及ぼすリゾホスファチジルイノシトール(LPI)の影響 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

杉浦隆之 他 B リンパ芽球系細胞株の抗体分泌に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールの影響 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

杉浦隆之 他 2-アラキドノイルグリセロール：カンナビノイド受容体の内在性リガンド 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)シンポジウム

杉浦隆之 他 G タンパク質共役型受容体 GPR55 のマウス各種組織における発現分布 日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

市)

杉浦隆之 他 ヒトリンパ芽球 IM-9 の増殖に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールの影響 日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

杉浦隆之 他 G タンパク質共役型受容体 GPR55 の免疫系の細胞における発現 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

杉浦隆之 他 G タンパク質共役型受容体 GPR55 の内在性リガンド・リゾホスファチジルイノシトール(LPI)の LC-MS/MS による定量 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

杉浦隆之 他 培養白血病細胞 IM-9 の増殖に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールの影響 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

杉浦隆之 他 免疫細胞における G タンパク質共役型受容体 GPR55 の発現 第 14 回 Pharmaco-Hematology Symposium、2013 年 6 月 1 日、日本薬学会会長井記念ホール(東京都渋谷区)

〔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

杉浦 隆之 (SUGIURA TAKAYUKI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：4013009

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：