

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860054

研究課題名(和文) リゾホスファチジルイノシトールとその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 lysophosphatidylinositol

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、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は免疫系の臓器や消化器系組織に比較的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、抗体分泌を促進させた。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、免疫応答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 and the digestive organs such as small intestine and large intestine. The expression of GPR55 mRNA in the immune cells was next examined. High levels of GPR55 mRNA expression were observed in T and B cells. LPI enhanced the IgG secretion from B cell lines 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：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

カンナビノイド受容体 (CB1 受容体及び CB2 受容体) は、1990 年代の始めに、マリファナの主要活性成分である  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール ( $\Delta^9$ -THC) に対する受容体として同定されたものである。1992 年に内在性リガンドの候補として N-アラキドニルエタノールアミン (アナンドアミド) 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-アラキドニルグリセロール (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、アナンドアミドではなく 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 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 p38 MAPK 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 が発現していることが知られている様々な細胞・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 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

ヒトリンパ芽球系細胞株 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。

## 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 GPR55 mRNA の発現について調べた。その結果、免疫系の臓器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、腎臓等での発現はほとんど見られなかった (図 1)。

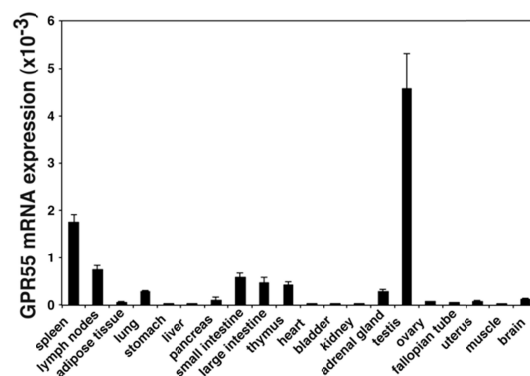


図 1 マウス GPR55 mRNA の発現分布

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。

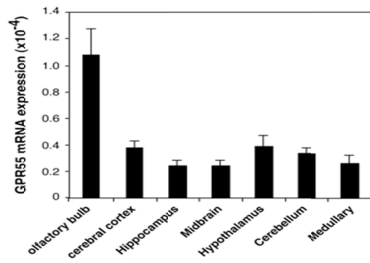


図2 脳の各部位における GPR55 の発現

GPR55 mRNA が比較的高く発現していた小腸について調べた。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)。

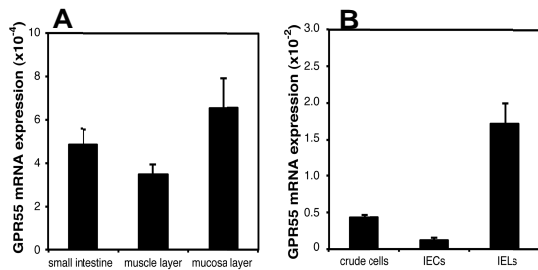


図3 小腸の各部位における GPR55 の発現

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)。

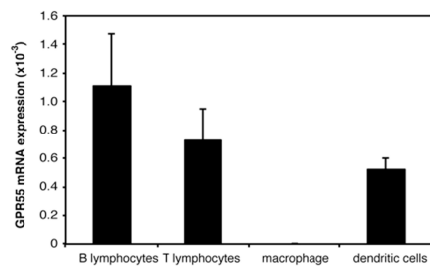


図4 各免疫細胞における GPR55 の発現

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)。

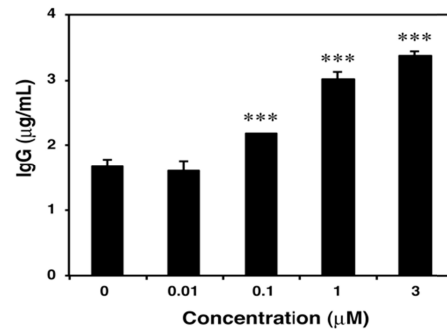


図5 LPI 刺激による IM-9 細胞からの抗体分泌

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)。

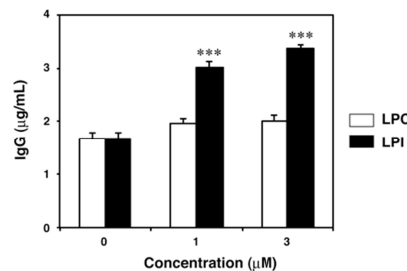


図6 リゾリン脂質による抗体分泌促進効果

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)。

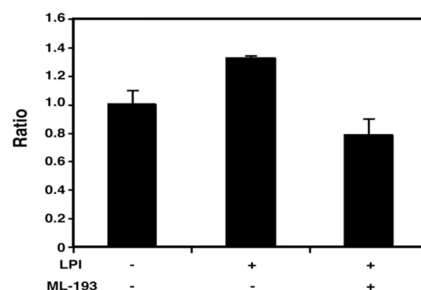


図7 GPR55 アンタゴニストの LPI による抗

## 体分泌促進効果の抑制

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、抗体分泌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 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 6 件)

谷川 尚 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)

谷川 尚 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)

谷川 尚 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)

谷川 尚 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)

谷川 尚 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)

谷川 尚 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

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：