公開

（事後評価・研究者用）

研　究　報　告　書

「生理活性脂質リゾホスファチジルセリンによる全身性エリテマトーデス疾患発症抑制メカニズムの解析」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成23年10月～平成27年7月
研　究　者：　巻出　久美子

1．　研究のねらい

リゾリン脂質はグリセロール骨格、もしくはスフィンゴシン骨格に、リン酸基と一本の脂肪酸を有する脂質の総称である。近年、リゾホスファチジン酸（LPA）やスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）などのリゾリン脂質が生理的・病理的に重要な役割を担っていることが明らかとなるとともに、S1P 受容体を標的とした薬（Fingolimod）が上市され、創薬ターゲットとしてもリゾリン脂質メディエーターが注目されている。

我々は、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン（LysoPS）の産生酵素であるホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A_1（PS-PLA_1）が全身性エリテマトーデス（SLE）患者で特異的に上昇することを見出した。SLE は自己抗原に対する多彩な自己抗体産生を特徴とし、全身性の炎症を伴う難治性の自己免疫疾患である。これまでに、LysoPS はマスト細胞の脱顆粒促進活性など様々な細胞応答を引き起こすことが知られていたが、生体内でどのような役割を担っているかについてはほとんどわかっていなかった。我々は、既知の LysoPS 受容体 GPR34/LPS_1 に加え、新規 LysoPS 受容体として P2Y10/LPS_2、GPR174/LPS_3 を同定した。そこで、本研究では LysoPS 産生酵素 PS-PLA1 および LysoPS 受容体の KO マウスを用い、LysoPS シグナルの SLE 病態、さらには慢性炎症疾患への関与について解析することを目的とした。

2．　研究成果

（1）概要

今回我々は、SLE モデルマウスとして汎用されている MRL/MpJ-*Fas*$^{lpr/lpr}$ マウス（以下、MRL/lpr マウス）を用いた。MRL/lpr マウスはアポトーシス誘導因子である Fas が欠損しており、自己反応性のリンパ球が除去されない結果、自己抗体産生やそれに伴う腎炎など多彩な自己免疫現象を発現することが知られている。C57BL/6 系統の PS-PLA_1、LPS_1、LPS_2、LPS_3 KO マウスをそれぞれ MRL/lpr 系統に約 10 世代かけ戻し、MRL/lpr 系統の LysoPS 関連分子 KO マウスを作出した。各マウスについて、抗 dsDNA 抗体、腎障害マーカーとなる血中クレアチニン量、血中窒素量、腎臓の組織学的解析を行ったが、自己抗体や腎障害に顕著な差が認められる KO マウスはなかった。よって、本モデルマウスを用いてループス腎炎における LysoPS の関与について結論を得ることは出来なかった。

一方、MRL/lpr マウスに認められる異常リンパ球の蓄積において、LysoPS 関連分子 KO マウスで顕著な差が認められた。MRL/lpr マウスは元来、リンパ節腫脹を発症する突然変異マウスとして樹立されたマウスである。3-4 ヶ月齢になると、$CD4^-CD8^-B220^+$T 細胞（DN T 細胞）の異常リンパ球集積によるリンパ節腫脹を示す。MRL/lpr-WT マウスに比べ、MRL/lpr-LPS_2

KO マウスおよび MRL/lpr-LPS_3 KO マウスは脾臓やリンパ節が肥大化することがわかった。細胞ポピュレーションの解析により、この肥大化は DN T 細胞によるものであることが明らかとなった。また、本研究内で創製した LPS_2 アゴニストもしくは LPS_3 アゴニストを MRL/lpr マウスに連続投与することにより、リンパ節腫脹が抑制された。よって、LysoPS は LPS_2、LPS_3 を介して異常なリンパ球の蓄積を抑制していることが明らかとなった。

（2）詳細

1. MRL/lpr 系統 LysoPS 関連分子 KO マウスの表現型

SLE 病態を解析する目的で、MRL/lpr 系統の LysoPS 関連分子 KO マウスを作出した。$PS\text{-}PLA_1$、LPS_1、LPS_2、LPS_3 の全ての KO マウスにおいて、自己抗体産生および腎障害が MRL/lpr-WT マウスと顕著な差を認められるものはなかった。一方、MRL/lpr-WT マウスに比べ、MRL/lpr-LPS_2 KO マウスおよび MRL/lpr-LPS_3 KO マウスは脾臓やリンパ節が肥大化することがわかった。フローサイトメーターによりポピュレーション解析を行った結果、B 細胞、CD4T 細胞、CD8T 細胞は野生型マウスと同様であったが、$CD4^-CD8^-B220^+$T 細胞（DN T 細胞）が KO マウスで顕著に増加していた。

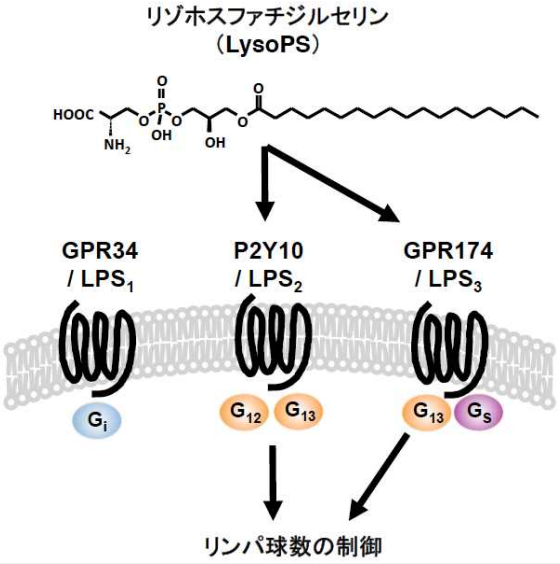
MRL/lpr KO マウスの表現型	LPS_1/GPR34	LPS_2/P2Y10	LPS_2/P2Y10	$PS\text{-}PLA_1$
自己抗体、腎障害	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
異常リンパ球の蓄積	変化なし	KO で増加	KO で増加	KO で減少

2. LysoPS 受容体アゴニストの創製

東京大学大和田先生との共同研究により有機化学的に合成した LysoPS 誘導体の受容体への活性化能を評価することにより、LysoPS 受容体アゴニストの創製を行った。その結果、受容体への選択性および親和性についての構造活性相関、および受容体選択的アゴニストを得ることができた（*J. Biochem.* 2015、*J. Med. Chem.* 2015）。

3. MRL/lpr マウスにおける LysoPS 受容体アゴニストの効果

上記で得られた LPS_2 アゴニスト（deoxy LysoPS）を MRL/lpr マウスに約 9 週間投与し、LysoPS 受容体にシグナルを入れた時の解析を行った。Vehicle 投与群に比べ、アゴニスト投与群では脾腫やリンパ節腫脹が顕著に抑制されていた。ポピュレーション解析の結果、DN T 細胞が顕著に減少していた。また、LPS_3 アゴニストについても同様の結果が得られた。よって、LysoPS は LPS_2 および LPS_3 を介して異常リンパ球の蓄積を抑制することが明らかとなった。



4.　生体内における LysoPS の検出

受容体 KO マウスで表現型が認められたことから、少なくとも MRL/lpr マウスではリガンドである LysoPS が機能しうる量存在していることが示唆される。そこで、我々は液体クロマトグラフィーとマススペクトロメトリーを用いて、LysoPS の各分子種、脂肪酸結合部位（*sn*–1 位、*sn*–2 位）を含め、数 nM レベルの LysoPS を検出できる測定系を確立した（*J. Lipid Res.* 2014）。本測定系を用いて様々なマウスサンプルを解析した結果、LysoPS は通常状態のマウス血漿中にはごく微量しか存在しないのに対し、炎症惹起時に顕著に上昇することが明らかとなった。LysoPS の産生は、SLE モデルや EAE などの慢性炎症モデルよりも創傷モデルや Con A 誘発性肝炎モデルなど急性炎症モデルでより顕著に上昇していた。現在はまだ血液や炎症滲出液、臓器全体などサンプル全体での量しか測定できていないため、今後イメージング MS などを利用して、組織上で LysoPS が産生される局所的な部位、および LysoPS 受容体発現細胞に受け渡される場所をより詳細に解析していきたい。

3.　今後の展開

本研究から、LysoPS/LPS_2・LPS_3 シグナルがリンパ球数の制御に関与することが明らかとなった。*In vitro* の解析から、LysoPS が T 細胞の増殖やサイトカイン産生、細胞遊走を負に制御するという知見を得ており、LysoPS が作用する T 細胞の種類、関与する受容体、関与するシグナルについて明らかにすることが今後の課題である。また、LysoPS がどのような病態・炎症時に産生されるかについて、イメージング MS を用いることでリガンド産生側からも解析を進めていきたい。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

MRL/lpr 系統の産生酵素・受容体 KO マウスはループス腎炎に繋がる病態について顕著な差を示さなかったことから、SLE 病態に対して、LysoPS シグナルがどのような役割を担っているか、という課題に対して一切答えを出すことができなかった。本モデルマウスでも血中 PS–PLA_1 が上昇することは確認していたが、研究当初に認められていた MRL/lpr マウスにおける LysoPS の病態（ループス腎炎）抑制効果の再現性が得られず、結果的にはモデルマウスの選定という段階に問題があった。ただし、思いがけずリンパ球数の制御に LysoPS シグナルが関与するという結果を得ることができた。また、LysoPS 受容体選択的なアゴニストが得られ、これらが異常リンパ球を抑制する創薬のリード化合物となるものと期待される。また、LysoPS の高感度測定系を確立したことにより、今後 LysoPS の測定を通じて LysoPS が関与する疾患の探索に繋げていきたい。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

リゾホスファチジルセリン（LysoPS）産生酵素であるPS–PLA1が全身性エリテマトーデス（SLE）患者で選択的に上昇することを見いだし、SLEのモデルマウスとして汎用されている

MRL/lprマウスにLysoPSを投与すると脾臓及びリンパ節の肥大が顕著に抑制されることなどから、LysoPSシグナルのSLE病態、さらには慢性炎症疾患への関与について解析することを課題とした。LysoPS関連分子である、PS-PLA1、受容体のLPS1、LPS2、LPS3のそれぞれを欠失したノックアウト(KO)マウスを作出し、それとMRL/lprマウスを10世代戻し交配し、各系統マウスのSLE様症状に関する解析を行った。その結果は野生型MRL/lprマウスとの間に有意な差が認められず、ループス腎炎におけるLysoPSの関与に関し、結論できていない。しかし、LPS2-KOとLPS3-KOではMRL/lprマウスで見られる脾臓やリンパ節の腫脹がさらに亢進し、lpr細胞の増加が見られた。そこで、LPS2やLPS3受容体に対する選択的アゴニストを創製し、MRL/lprマウスに投与したところ、脾腫やリンパ節腫脹の抑制とlpr細胞の減少が認められた。研究期間中には、数nMレベルのLysoPSを検出できる測定系を確立し、急性炎症モデルにおいてマウス血中LysoPSが上昇することを見いだしている。

以上、研究課題として目指したSLE病態におけるLysoPSとその関連分子の役割についての十分な回答は得られなかったが、LysoPSがlpr細胞のような異常リンパ球の増殖制御に係っていることを明らかにしたこと、また研究の過程でLysoPS受容体選択的アゴニストの創製、微量LysoPS測定系を確立して発表していることは評価したい。それらは今後のLysoPS関連研究に応用、発展させることができる成果と考える。諸般の事情により研究期間を4ヶ月延長し、最善を尽くしたものと評価する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. TGFα shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods* (2012) 9, 1021-1029
2. Kitamura H, Makide K, Shuto A, Ikubo M, Inoue A, Suzuki K, Sato Y, Nakamura S, Otani Y, Ohwada T, Aoki J GPR34 is a receptor for lysophosphatidylserine with a fatty acid at the sn-2 position. *J. Biochem.* (2012) 151, 511-518
3. Okudaira M, Inoue A, Shuto A, Nakanaga K, Kano K, Makide K, Saigusa D, Tomioka Y, Aoki J. Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. *J. Lipid Res.* (2014) 55, 2178-2192
4. Uwamizu A, Inoue A, Suzuki K, Okudaira M, Shuto A, Shinjo Y, Ishiguro J, Makide K, Ikubo M, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Ohwada T, Aoki J. Lysophosphatidylserine analogues differentially activate three LysoPS receptors. *J Biochem.* (2015) 157, 151-160
5. Ikuno M, Inoue A, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Uwamizu A, Suzuki K, Kishi T, Shuto A, Oshiguro J, Okudaira M, Kano K, Makide K, Aoki J, Ohwada T. Structure-activity relationships of lysophosphatidylserine analogs as agonists of G-protein-coupled receptors GPR34, P2Y10, and GPR174. *J. Med. Chem.* (2015) 58, 4204-4219

（2）特許出願

研究期間累積件数：1 件

1.

発　明　者：大和田智彦、尾谷優子、井久保仁也、中村翔、ジョンセジン、青木淳賢、巻出久美子、井上飛鳥

発明の名称：リゾホスファチジルセリン受容体機能調節活性を有する化合物

出　願　人：東京大学、東北大学

出　願　日：2013/1/31

出 願 番 号：特願 2013-17817

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表

日本免疫学会学術集会、内藤コンファレンス、日本脂質生化学会、日本生化学会、International Conference on Phospholipase A_2 and Lipid Mediators

著作物

1. Kumiko Makide, Junken Aoki
   GPR34 as a lysophosphatidylserine receptor (review)
   J. Biochem. 153, 327-329 (2013)

2. 雪浦弘志、奥平真一、巻出久美子、青木淳賢
   リゾリン脂質の産生経路
   最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用-　24: 154-（2014）　メディカルドゥ

3. Kumiko Makide, *et al.*
   Novel lysophopholipid receptors: their structure and function (review)
   J. Lipid Res. 55, 1986-1995 (2014)

4. 巻出久美子、青木淳賢
   リゾリン脂質と免疫制御-基礎から応用へ-②リゾホスファチジルセリン
   炎症と免疫　23(2): 177-181 (2015)　先端医学社

5. Kuniyuki Kano, Kumiko Makide *et al.*
   Lysophospholipid Meditors: Their receptors and synthetic pathways
   Bioactive Lipid Mediators　pp 109-126 (2015)　Springer Japan