



## 論文内容要旨

【背景・目的】リン脂質が持つ2本のアシル基のうち1本が除かれた分子をリゾリン脂質という。スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) やリゾホスファチジン酸 (LPA) などのリゾリン脂質はそれぞれに特異的なGタンパク質共役型受容体(GPCR)を介して様々な作用を発揮することからリゾリン脂質メディエーターと位置づけられている。リゾホスファチジルセリン (LysoPS) は極性頭部にアミノ酸のひとつであるセリンを有するリゾリン脂質であり、マスト細胞の脱顆粒促進活性、細胞遊走、T細胞の増殖抑制活性、神経細胞の突起伸展作用など様々な作用を有することからS1PやLPAに続く第三のリゾリン脂質メディエーターとして注目されている。LysoPSの受容体は長い間不明であったが、2006年にオーファンGPCRであったGPR34がCHO細胞においてLysoPSの刺激によりcAMPレベルを増加させると最初に報告された。しかし、最近COS-7細胞に発現させたヒトおよびマウスGPR34はLysoPS応答性を示さないと報告され、GPR34がLysoPS応答性の受容体であるかは議論の余地がある。また、修士課程において私はオーファンGPCRであったP2Y10がLysoPS応答性を示すことを見出していた。本研究ではGPR34とP2Y10がLysoPS受容体であるかを検討し、さらにP2Y10の細胞・個体レベルでの機能解明を行った。

### 【方法・結果】

#### (i) GPR34は2-アシル型LysoPSに選択性を示す受容体である

まず、ヒト、マウスあるいはラットGPR34とGq/i1キメラGタンパク質をHEK293細胞に一過的に発現させて、GPR34のLysoPS応答性を細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加( $\Delta[Ca^{2+}]_i$ )を指標に解析を行った。いずれのGPR34を発現させたHEK293細胞においてもLysoPSの濃度依存的に $\Delta[Ca^{2+}]_i$ が認められた。また、S1PやLPAを含む他のリゾリン脂質に対するGPR34の応答性を調べると、いずれのリゾリン脂質で刺激した場合でもGPR34発現依存的な $\Delta[Ca^{2+}]_i$ は見られなかった。さらに、LysoPSのセリン残基を修飾した様々なLysoPS誘導体を用いて同様にGPR34のリガンド応答性を調べた結果、D-serine LysoPS、リゾホスファチジルスレオニン(LPT)、リゾホスファチジリエタノールアミン(LPE)いずれの化合物においてもGPR34に対する応答性は見られなかった。同様の反応性は最近当研究室で開発された新規GPCR活性測定系(TGF $\alpha$ 切断アッセイ)を用いても観察された。また、TGF $\alpha$ 切断アッセイにおいてLysoPSの代わりに*in vitro*でPSを加水分解しLysoPSを産生することが知られているホスファチジルセリン(PS)特異的ホスホリパーゼA<sub>1</sub>(PS-PLA<sub>1</sub>)を作用させた場合にもGPR34のLysoPS反応性は確認された。さらに、PS-PLA<sub>1</sub>の産物である2-アシル型LysoPSのアナログである2-アシル型deoxy LysoPSは1-アシル型deoxy LysoPSより強いアゴニスト活性を示した(図1)。以上の結果より、GPR34は2-アシル型LysoPSに対する受容体であることが分かった。

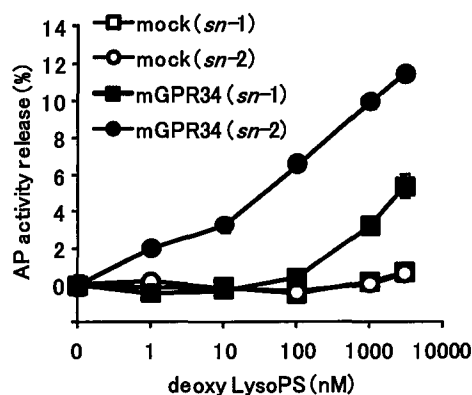


図1. GPR34は2-アシル型LysoPSに反応性が高い

## (ii) LysoPS は P2Y10 を介してリンパ球接着因子 LFA1 の機能を抑制する

私は修士課程においてオーファン GPCR である P2Y10 の安定発現細胞が LysoPS の刺激依存的に細胞の形態変化を引き起こすこと、この応答が ROCK 阻害剤 Y27632 で抑制されることより P2Y10 が  $G\alpha_{12/13}$  に共役する新規 LysoPS である可能性を示唆した。本研究ではまず、上述の TGF $\alpha$  切断アッセイを用い、P2Y10 が LysoPS に特異的に反応することを確認した。

次に、P2Y10 の機能解析を行った。まず、マウスの臓器における P2Y10 の発現を定量 RT-PCR 法によって調べると、P2Y10 は胸腺や脾臓など免疫系の組織で高発現していることがわかった。また、マウス脾細胞の T 細胞を anti-CD3 抗体で刺激活性化すると、刺激後 48 時間までに P2Y10 の発現が顕著に上昇することを見出した。そこで、この anti-CD3 抗体で刺激したマウス脾臓由来リンパ球を LysoPS 存在下培養したところ、LysoPS の非存在化では形成される大きなリンパ球の凝集塊が LysoPS の存在下ではほとんど形成されないことを見いだした（図 2 写真；左上、左中）。この凝集塊抑制活性は LysoPS に特異的であり、他のリゾリン脂質ではその効果は観察されなかった。この細胞凝集塊の形成はリンパ球の主要な接着因子である LFA1 に依存的であることが知られている。そこで、LFA1 のリガンドである ICAM1 の可溶化体を固定化したプレート上でリンパ球を培養した結果、細胞の接着性が LysoPS の存在下顕著に阻害されていることがわかった。また、LysoPS はケモカイン（CCL19/21）で誘導される活性化リンパ球の細胞遊走を顕著に抑制した。従って、LysoPS は活性化リンパ球の LFA1 による細胞接着能を抑制し、リンパ球の細胞遊走やターゲット細胞との接着を negative に調節していると考えられる。

次に LysoPS による LFA の機能抑制作用が P2Y10 を介しているかを調べるために、P2Y10 ノックアウト (KO) マウスの脾臓由来リンパ球を用いて解析を行った。その結果、LysoPS 処理により活性化リンパ球の凝集形成が抑制された野生型 (WT) マウス由来のリンパ球に対し、P2Y10 KO マウス由来のリンパ球では LysoPS で処理した場合でも活性化リンパ球の凝集形成は抑制されなかった（図 2 写真；上段、中段）。一方、anti-LFA1 抗体で処理した場合には WT および KO マウスいずれの脾細胞においてもリンパ球の凝集形成は阻害された（図 2 写真；下段）。以上の結果より、LysoPS は P2Y10 を介し LFA1 の接着機能を抑制することが分かった。

最後に、P2Y10 の *in vivo* における機能を明らかにするためにコンカナバリン A (ConA) 誘発性肝炎モデルを検討した。このモデルではマウスに植物レクチンである ConA を投与することで T リンパ球を T 細胞受容体非依存的に活性化させ肝障害を引き起こされることから自己免疫性の肝炎モデルと位置づけられている。また、LFA1 KO マウスでは ConA で誘発される肝炎が軽減されると報告されている。そ

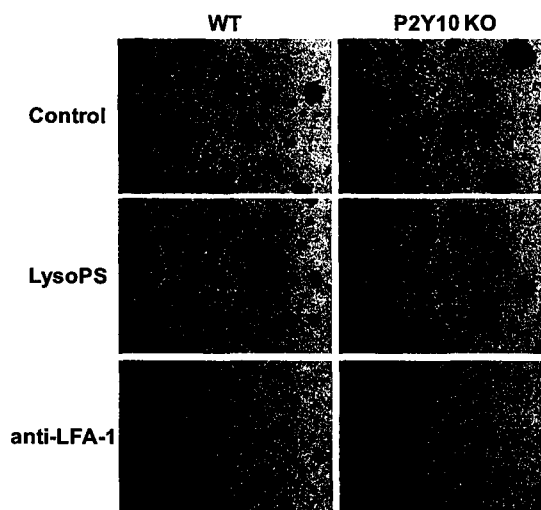


図 2. LysoPS は P2Y10 を介して活性化リンパ球の凝集を抑制する

ここで、WT および P2Y10 KO マウスに ConA を投与し、肝臓の切片および肝障害のマーカーである血中のアラニントランスアミナーゼ (ALT) 活性を指標に本モデルにおける P2Y10 の機能を解析した。その結果、ConA 投与から 72 時間後の肝臓の切片を作製し観察すると P2Y10 KO マウスでは WT マウスと比較して顕著にネクロシス面積が拡大していた (図 3)。また、血中 ALT 活性も WT マウスと比較して P2Y10 KO マウスで有意に高かった。さらに、WT マウスに ConA を投与し、経時的に肝臓の単核球 (MNC) を単離し P2Y10 の発現を定量 RT-PCR 法によって調べると、ConA 投与後 2-4 時間で P2Y10 の発現が顕著に上昇することを明らかにした (図 4)。

【考察】これまで LysoPS は様々な作用を有することが報告されてきたが、LysoPS の受容体やその機能はほとんど明らかにされていなかった。本研究では、GPR34 と P2Y10 が LysoPS 応答性の受容体であることを明らかにした。また、P2Y10 が活性化リンパ球において LFA1 の機能を抑制することでリンパ球の細胞遊走、細胞接着を negative に制御することを見出した。さらに、ConA 誘導性肝炎モデルの解析では P2Y10 KO マウスにおいて肝障害の悪化が見られた。これまで、リンパ球を活性化する機能に関しては多くの知見が蓄積されているが、リンパ球機能を抑制する機構の解析は少ない。本研究から LysoPS-P2Y10 システムは免疫系の新規抑制機構であると提唱したい。P2Y10 の発現が活性化リンパ球で誘導されることもこのことを指示している。また、リンパ球の活性化時には LysoPS が産生されているはずであり、今後、LysoPS の産生系も含め LysoPS-P2Y10 システムの免疫調節における役割の全容が明らかになるものと期待される。

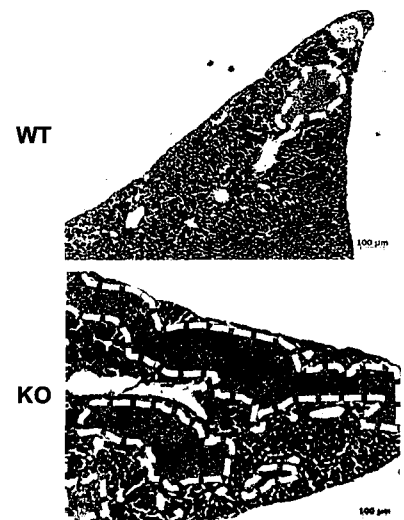


図 3. P2Y10 KO マウスは ConA の投与により肝障害が悪化する

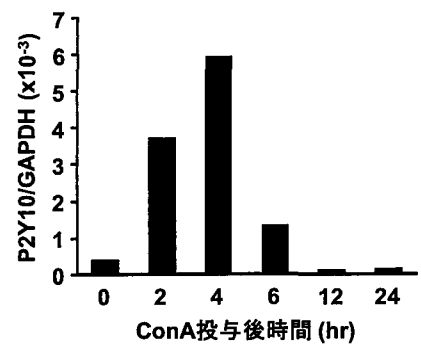


図 4. ConA 投により肝 MNC で P2Y10 の発現が上昇する

## 審査結果の要旨

リゾホスファチジルセリン (LysoPS) はマスト細胞の脱顆粒促進活性をはじめ様々な作用を有することが知られているが、その作用メカニズムはほとんど明らかにされていなかった。2006年にオーファンGPCRであるGPR34がLysoPS応答性を示すことが報告されていた。しかし、この報告と相反する報告もあり、GPR34のLysoPS応答性は再吟味する必要性があった。一方、北村は修士課程でオーファン受容体であったP2Y10がLysoPS応答性を有することを示唆していた。そこで本研究ではGPR34、P2Y10がLysoPS受容体であるかを検討し、さらにP2Y10に関しては細胞・個体レベルでの機能解明を行った。

まず、GPR34とP2Y10のLysoPS応答性を検証した。GPR34はGq/i1キメラGタンパク質を共発現させたHEK293細胞においてLysoPSやLysoPS誘導体、LysoPS産生酵素の反応物に反応して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を誘導した。また、GPR34はsn-2位に脂肪酸を有するLysoPSに親和性が高い受容体であることを明らかにした。一方、P2Y10発現細胞はLysoPSに反応してTGfαの切断や細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇、ストレスファイバーの形成が誘導されることを示した。また、これらの細胞応答性はすべてLysoPSに特異的であることを示し、GPR34、P2Y10が共にLysoPS特異的受容体であることを示した。

次に、P2Y10の機能解析を行った。P2Y10は脾臓や胸腺などの免疫系の組織に発現していた。また、マウス脾細胞をT細胞マイトジェンやanti-CD3抗体で刺激活性化すると細胞凝集塊がみられるが、この時P2Y10の発現の顕著な上昇が観察された。また、脾細胞をLysoPSで処理すると凝集形成が著しく抑制され、この作用はP2Y10ノックアウト(KO)マウス由来の脾細胞では消失した。さらに、LysoPSはケモカインCCL21刺激によるT細胞の運動能や遊走能を抑制することから、P2Y10がリンパ球の接着や運動能の制御に関わることが強く示唆された。また、LysoPSはT細胞のアクチン骨格の再構成を阻害することでリンパ球の接着や運動能を制御することが示された。

最後に、P2Y10の個体レベルでの機能解析を行った。P2Y10 KOマウスではコンカナバリンA(ConA)で誘導される肝炎が劇的に悪化することが示された。さらに本モデルでは肝臓の単核球においてはP2Y10の発現が上昇し、LysoPS産生酵素PS-PLA<sub>1</sub>とその産物であるLysoPSも著しく増加することが示された。よって、ConA肝炎モデルにおいてP2Y10はLysoPSの刺激を受けてリンパ球の肝障害を抑制していることが強く示唆された。

本研究はリンパ球の接着や運動性に対するLysoPSの新規作用を示しただけ無く、LysoPS受容体の同定、個体レベルでの機能を通じ、LysoPSが新規リゾリン脂質メディエーターであることを明確に示した。さらに、本研究は新規免疫抑制薬の開発につながる意義のある研究であると考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。