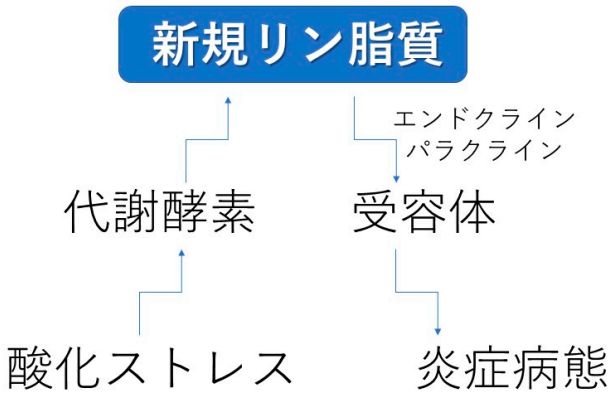
43　新規脂質の医療応用にむけた機能解明	佐々木　雄彦

【目的】我々は、がんや炎症の病態モデルマウスで大きく変動する脂質を、高感度リン脂質測定技術によって探索し、いくつかの新規構造をもつ脂質を発見している。本研究では、新規リン脂質の生成・分解機構、動態、作用点と生理機能の理解を目的とした。

【方法】リン脂質キナーゼ／ホスファターゼの哺乳動物細胞での発現ベクターは常法に従って作製した。培養細胞や血漿から Bligh-Dyer 法で脂質を抽出し、その後陰イオン交換カラムで酸性リン脂質画分を濃縮した。メチル化反応により得た誘導体を、以下の脂質解析に供した。逆相カラムクロマトグラフィー、三連四重極型質量分析計での選択反応モニタリングによって新規脂質を特異的に測定した。新規リン脂質の受容体探索には、TGFα切断アッセイを適用した。

【結果】本新規リン脂質の合成・分解に関与する酵素として、phosphoinositide 3-kinase、SHIP1 などいくつかのリン脂質キナーゼ／ホスファターゼを同定した。また、新規リン脂質は酸化ストレスに応答して上昇し、細胞培養上清中に検出され、動物レベルでは血液中に存在することが明らかとなった。マウスへのエンドトキシン投与による全身性の炎症の惹起に伴い、血中レベルが増加した。肝炎、喘息の病態形成への関与が考えられる G タンパク質連関型受容体に作用することが示唆された。

新規リン脂質の生成、分解、動態、作用点と生理機能



43. 新規脂質の医療応用にむけた機能解明

佐々木　雄彦

秋田大学 大学院医学系研究科 病態制御医学系 微生物学講座

Key words：リン脂質，質量分析，細胞膜受容体，脂質キナーゼ/ホスファターゼ

緒　言

リン脂質は細胞膜の疎水領域を提供するとともに、細胞内外のシグナル伝達物質として機能する。これまでの研究で、がんをはじめとした種々の疾患におけるホスホイノシタイド代謝の異常が明らかにされている［1, 2］。例えば PIP_3（phosphatidylinositol（3,4,5）trisphosphate）は、①がんで活性化型変異・発現上昇が認められる PI3K（phosphoinositide 3-kinase）により産生されること、②がんで機能消失型変異・発現低下が認められる PTEN（phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10）により分解されること、③がんで活性化型変異・発現上昇が認められる PKB（protein kinase B）と結合することなどから、がんの発症・進展に促進性の役割を果たすと考えられている。我々は、遺伝子改変マウスを用いて、PI3K の欠損により PIP_3 生成と PKB 活性化が抑制されること［3］、PTEN の欠損が細胞内 PIP_3 レベルの上昇と PKB の活性化を導くこと［4］などを実証してきた。また最近、質量分析計による高感度リン脂質測定技術を開発し、がんや炎症の病態モデルマウスで大きく変動する脂質を探索し、いくつかの新規構造をもつ脂質を発見している。本研究では、新規リン脂質 A（以下新規リン脂質）の生成・分解機構、動態、作用点と生理機能の理解を目的とした。

方　法

1. 脂質抽出

HEK293T への遺伝子導入はリポフェクション法、または、エレクトロポレーション法で常法に従って行った。細胞内脂質レベルの解析では、培養液を吸引除去した後にリン酸緩衝液でリンスし、回収した細胞から Bligh-Dyer 法で脂質を抽出した。細胞外脂質レベルの測定では、培養液あるいは血漿サンプルにクロロホルムとメタノールを Bligh-Dyer 法の一層状態となる分量で加えて抽出を行った。有機溶媒添加時に、内部標準物質として脂肪酸部分の炭素数が奇数となる phosphatidylinositol と phosphatidylserine を加えた。これらの総脂質画分から、陰イオン交換カラム（DEAE セルロースカラム）により酸性リン脂質を濃縮調製した。

2. 脂質定量

抽出した脂質の安定化と吸着防止のために、TMS ジアゾメタンとの反応でメチル化修飾を行い、この誘導体を測定した。逆相カラム（C8 あるいは C18）による高速液体クロマトグラフィーには、HTC PAL autosampler（CTC Analytics, Zwingen, Switzerland）を備えた UltiMate 3000 LC system（Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いた。三連四重極型質量分析計 TSQ-Vantage（Thermo-Fisher Scientific）を用いて、選択反応モニタリング法で新規脂質を特異的に測定した。

3. マウス血漿の調製

2 ケ月齢、オスの C57BL/6 マウスに 50 mg/kg lipopolysaccharide（LPS）を腹腔内投与した。1 時間、6 時間後に腹部大動脈から採血、ヘパリン処理し、遠心によって血漿サンプルを得た。対照として、生理食塩水を腹腔内投与したマウスから 6 時間後に血漿を得た。100 μl を用いて新規リン脂質を測定した。

4. 新規リン脂質受容体スクリーニング

井上、青木らが開発した TGFα 切断アッセイを適用した［5］。HEK293 細胞に評価する G タンパク質連関型受容体

（GPCR）、アルカリホスファターゼを融合した TGFα前駆体タンパク質（AP-TGFα）をコードする cDNA を導入し、それぞれのタンパク質を発現させた。新規リン脂質に結合する受容体が発現する場合には、膜型プロテアーゼ TACE／ADAM17 が活性化され、AP-TGFαを切断する。AP-TGFαの切断量を受容体の活性化能の指標とし、培養上清中に遊離された AP 活性を p-ニトロフェニルフォスフェートを基質に用いて定量した。

結果および考察

1. 新規リン脂質の代謝に関与する酵素の探索

細胞膜リン脂質を基質とする約 20 のキナーゼと約 30 のホスファターゼが同定されている。これらの酵素が新規リン脂質の合成や分解に関与する可能性を、培養細胞レベルの実験で検証した。図 1 に示すように、PTEN、Pharbin（inositol phosphate phosphatase/INPP 5E）、SHIP1（SH2 domain-containing phosphatase 1）、SYNJ1（synaptojanin 1）の過剰発現によって、新規リン脂質の細胞内レベルが通常の 6 割ほどに低下することを見出した。この知見と符合して、上記ホスファターゼの活性中心に共通したシステイン残基のチオール基を酸化型に導く過酸化水素処理によって、新規リン脂質レベルは上昇した。また、phosphoinositide 3-kinase の過剰発現は、ホスファターゼ過剰発現の場合とは逆に、新規リン脂質を増加させることを見出した。これらのデータは、新規リン脂質の細胞内レベルの調節に上記の酵素が関与することを示している。リン脂質の生成、分解は多段階の酵素反応によることから、これらの酵素が新規リン脂質を直接に生成／分解するのか、あるいは、前駆体のレベルで代謝に影響を及ぼすのかについては、今後検討する必要がある。

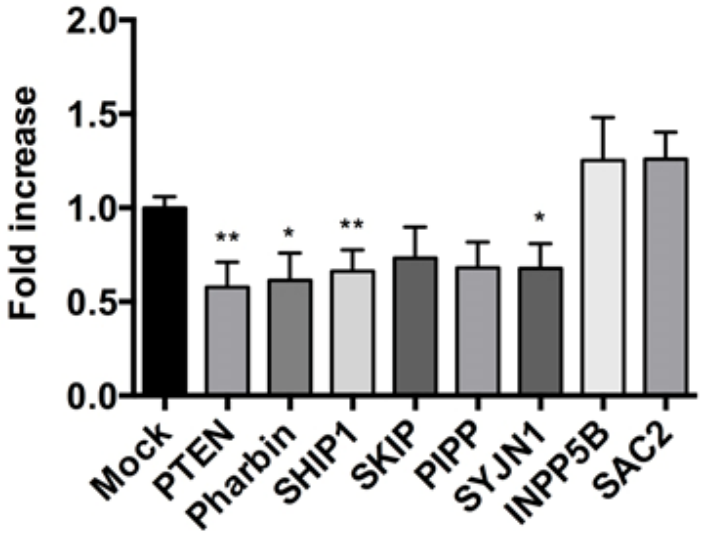


図 1. リン脂質ホスファターゼ過剰発現による新規リン脂質の細胞内レベルの変化
HEK293T 細胞株に標記のホスファターゼ発現ベクターをトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し、新規脂質の細胞内レベルを測定した。縦軸は、各酵素を過剰発現した際の新規リン脂質レベルを、empty vector 導入サンプルを対照として表している。平均値±標準誤差、N = 6、Mann-Whitney U test、$*P < 0.05$, $**P < 0.01$。

2. 血液中の新規リン脂質の変動

1. の実験の過程で、細胞内のみならず細胞外（細胞培養上清）にも新規リン脂質が存在することを見出した。さらに、マウス、ヒトの血液サンプル（血漿）においても、新規リン脂質が検出された。エンドトキシンショックモデルで、血液中新規リン脂質の変動について検討したところ、マウスへの LPS 投与に伴い、新規リン脂質レベルが上昇することを見出した。細胞外に存在する新規リン脂質が炎症病態に促進的あるいは抑制的に関与する可能性が考えられ、新たな検討課題が生じた。

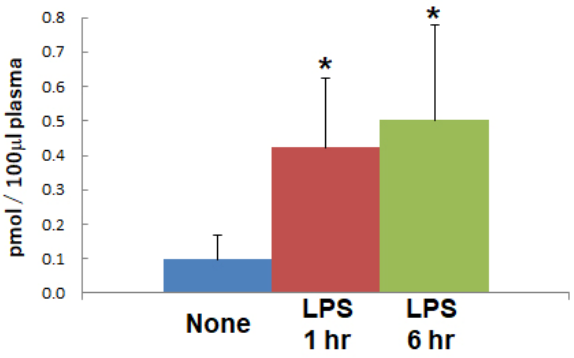


図 2. 炎症に伴う血漿新規リン脂質レベルの上昇

マウスに LPS を腹腔内投与し、1 時間後、6 時間後に採血し、血漿中の新規リン脂質を定量した。生理食塩水を投与した対照群と比較して、新規リン脂質の上昇が認められた。平均値±標準誤差、N＝4、Mann-Whitney U test、*p<0.05。

3. 新規リン脂質作用点としての細胞膜受容体の探索

上述のように新規リン脂質は細胞外に放出される特性をもつことから、細胞膜上の受容体を探索した。これまでに発見されている脂質メディエーターの受容体の多くは GPCR である。そこで、井上、青木らが開発した、GPCR の活性化測定法である TGFα切断アッセイを行った。その結果、図 3 に示すように GPR31、GPR68 を含むいくつかの受容体が、新規リン脂質およびその構造類縁体によって活性化されることが明らかになった。GPR31 が脂質メディエーターの一種 12-hydroxyeicosatetraenoic acid（12-HETE）を介した肝炎の増悪に関与することが報告されている［6］。また、GPR68 はプロトン受容体として気管支喘息に促進性の役割を持つことが報告されている［7］。上述の炎症誘発時における動態を鑑みて、これらの受容体シグナリングに与える新規リン脂質の作用を、今後の研究で明らかにしたい。

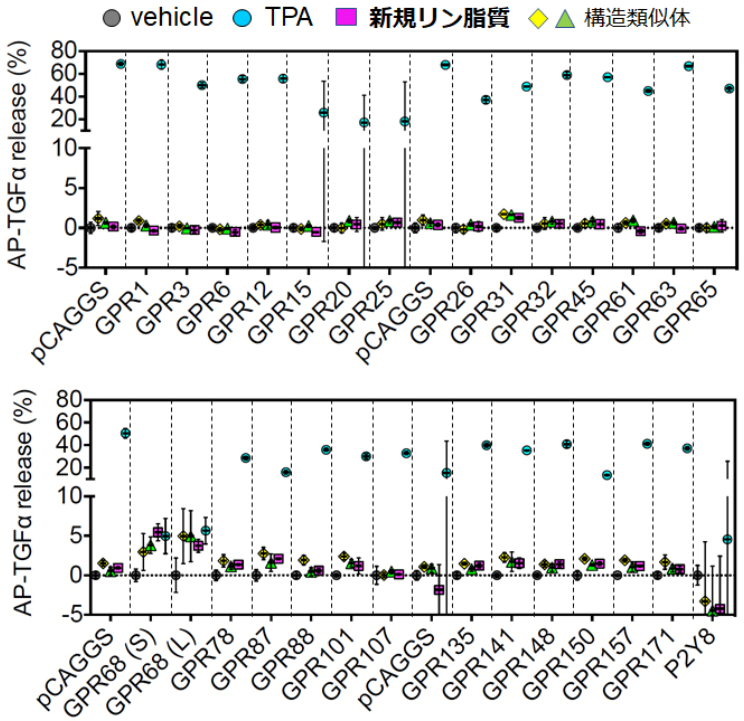


図 3. 新規リン脂質に応答する GPCR の探索

標記の受容体発現細胞での TGFα切断アッセイ。新規リン脂質（50 nM）ならびに構造類縁体（75 nM）で細胞を刺激した。pCAGGS は受容体 cDNA を含まないベクター。TPA（12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセテート）処理はポジティブコントロールとして行った。平均値±標準誤差、n＝3。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、受容体スクリーニングのご指導をいただきました、東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野の青木淳賢教授、井上飛鳥准教授、学振特別研究員岸貴之氏に感謝いたします。

文　献

1) Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M, Suzuki A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. Prog Lipid Res. 2009 Nov;48(6):307-43. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.001. Epub 2009 Jul 4. Review. PMID: 19580826

2) Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T. INPP4B Is a PtdIns(3,4,5)P3 Phosphatase That Can Act as a Tumor Suppressor. Cancer Discov. 2015 Jul;5(7):730-9. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1329. Epub 2015 Apr 16. PMID: 25883023

3) Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kγ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. Science. 2000 Feb 11;287(5455):1040-6. PMID: 10669416

4) Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell. 1998 Oct 2;95(1):29-39. PMID: 9778245

5) 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 Oct;9(10):1021-9. doi: 10.1038/nmeth.2172. Epub 2012 Sep 16. PMID: 22983457

6) Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, Fang J, Wang X, Wang W, Liu ZY, Shen LJ, Zhang P, Wang PX, Liao R, Ji YX, Wang JY, Tian S, Zhu XY, Zhang Y, Tian RF, Wang L, Ma XL, Huang Z, She ZG, Li H. An ALOX12-12-HETE-GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia-reperfusion injury. Nat Med. 2018 Jan;24(1):73-83. doi: 10.1038/nm.4451. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29227475

7) Aoki H, Mogi C, Hisada T, Nakakura T, Kamide Y, Ichimonji I, Tomura H, Tobo M, Sato K, Tsurumaki H, Dobashi K, Mori T, Harada A, Yamada M, Mori M, Ishizuka T, Okajima F. Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model. PLoS One. 2013 Nov 11;8(11):e79985. doi: 10.1371/journal.pone.0079985. eCollection 2013.PMID: 24244587