

論文の内容の要旨

論文題目 生理活性脂質スフィンゴシン 1-リン酸受容体の同定と
その機能解析

指導教官 重松宏 助教授

東京大学大学院医学系研究科
平成9年4月入学
医学博士課程 外科学専攻

氏名 岡本 宏之

はじめに

リン脂質は細胞膜の構成成分あるいはその代謝産物としてだけでなく、様々な生理活性をもつ重要な脂質メディエーターとしての役割が知られている。血液中に存在する生理活性脂質スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、リゾホスファチジン酸 (LPA) とともにリゾリン脂質として立体構造上の類似性を持ち、生体内では血小板が主な産生貯蔵場所とされている。1990年代初め、S1Pが細胞内カルシウム動員と細胞増殖促進作用という生理活性を有することが報告され、これらの作用は当初、S1Pの細胞内作用であると考えられた。その後、培地に添加したS1Pが種々の癌細胞や平滑筋細胞の運動を抑制することが報告され、この現象がビーズに固相化したS1Pでも引き起こされること、さらにはS1Pによる細胞応答の多くが百日咳毒素(PTX)感受性であることがなどが明かになり、S1Pの作用の多くは細胞膜上の受容体を介していると考えられるようになってきた。一方、私達の研究室では1993年にラット大動脈平滑筋細胞から新規のGタンパク共役型受容体AGR16をクローニングしていたが、そのリガンドは不明であった。遺伝子データベースのホモロジー検索の結果、AGR16は唯一EDG1(endothelial differentiation gene-1)との間にアミノ酸レベルで高いホモロジー(51%)を持つことが見いだされた。EDG1は、ヒト臍帯静脈内皮細胞をホルボールエステルで刺激することで発現誘導されるGタンパク共役型受容体遺伝子として1990年に発見されたが、AGR16と同様にそのリガンドは同定されていなかった。マトリックセル内の三次元培養下でホルボールエステルは血管内皮の管腔形成を促進することより、この受容体遺伝子は血管内皮の分化誘導に関わっているのではないかと考えからEDG1と命名された。その後、EDG1、AGR16に高いホモロジーを示す受容体遺伝子が次々とクローニングされ、これらは血管内皮に発現するか否かに関わらず、EDG2~8と命名された。この命名法ではAGR16はEDG5と呼ばれている。

1996年になり、EDG2がLPAに対する受容体である可能性が報告された。私達はこの報告を契機に、その他のEDG受容体もLPAあるいはS1Pを含む類縁脂質の受容体として機能する可能性について検討を開始した。本研究ではまず、EDG1、EDG3、EDG5/AGR16がいずれも高い特異性と親和性をもつS1P受容体であり、それぞれが特徴的な情報伝達能をもつことを示した。また細胞膜上の受容体が同定された後も、S1Pの細胞運動に対する影響については不明な点が多く、受容体を介する細胞外からの作用なのかそれとも細胞内メッセンジャーとしての作用なのかは議論の多いところであった。そこで本研究の後半では、S1Pが各EDG受容体サブタイプを介して細胞運動に対して異なる作用を及ぼすこととその細胞内機構を明かにした。すなわち、S1Pの場合には、一つのリガンドが異なる受容体を介して細胞遊走の増進と抑制という相反する作用を及ぼすきわめてユニークな性質をもっていることを初めて明かにした。

方法

- 1) **遺伝子導入**：発現プラスミドの遺伝子導入にはLipofectAMINEを使用し、安定形質発現株の選択にはG418を用いた。アデノウイルスベクターは、moi 100で1時間感染させ、99%以上の細胞に遺伝子導入できることを確認した。
- 2) **細胞内カルシウム濃度**は蛍光色素 fura-2 を用いて測定した。イノシトールリン酸産生の測定では、細胞を myo-[2-³H]inositol でラベルし、全イノシトールリン酸画分を抽出しその放射活性を測定した。サイクリックAMP(cAMP)の測定は、細胞を 0.2mM 3-isobutyl-1-methylxanthine 存在下で刺激し、ヤマサのcAMPアッセイキットで行なった。
- 3) **Mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性測定**：Myc-MAPK発現ベクターを導入した細胞の溶解液から抗Myc抗体でMyc-MAPKを免疫沈降し、[γ -³²P]ATP存在下でミエリン塩基性蛋白質のリン酸化を測定した。
- 4) [³²P]S1P結合実験：非標識のS1Pあるいは類縁脂質の存在下および非存在下で、³²P]S1Pを含むメEDIUMで25°C30分インキュベートし、細胞に付着した放射活性を測定した。特異的結合は、10 μ M S1P存在下で結合した非特異的結合分を差し引いて計算した。
- 5) **細胞遊走**：細胞遊走はフィブロネクチンコートした8 μ mポアのポリカーボネイトフィルターを用いBoydenチェンバー法で測定した。
- 6) **Rho、Rac、Cdc42の活性測定**：GST-rhotekin(for Rho)、GST-PAK(for Rac and Cdc42)を使ったプルダウン法によって活性型(GTP型)のRho、Rac、Cdc42の量を各々に特異的な抗体によりウエスタンブロットティングで評価した。
- 7) **ホスファチジルイノシトール(PI) 3-キナーゼ活性の測定**：細胞溶解液から抗リン酸化チロシン抗体でPI 3-キナーゼを免疫沈降し、PIを基質にリン酸化を測定した。PI-3Pの分離はシリカゲルプレートを用いた薄層クロマトグラフィーで行なった。

8) GAP(GTPase 促進因子)、GEF(グアニンヌクレオチド交換因子)活性の測定： $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{GTP}$ (for GAP) あるいは $[\text{H}^3]\text{GDP}$ (for GEF) を結合させた組換え Rac1 蛋白質を細胞溶解液と反応させ、経時的にサンプリングしてニトロセルロースフィルターで濾過し放射活性を測定した。

9) 蛍光顕微鏡：細胞を 3.7%ホルムアルデヒドで固定し 0.25%Triton X-100 で透過処理をした。F-アクチンは TRITC でラベルしたファロイジンで染色し、落射蛍光顕微鏡で観察した。

結果

I. S1P 受容体の同定と情報伝達

S1P に対する細胞応答の非常に弱い CHO(Chinese hamster ovary)細胞に EDG1 を一過性に発現させると、親細胞には認められない S1P による細胞内カルシウム上昇と MAPK の活性化が観察された。また S1P のみならず類縁脂質の LPA にも反応を示さない HEL(human erythroleukemia)細胞で樹立した EDG1 の安定発現株(HEL-EDG1)においても、S1P は濃度依存的にカルシウム上昇反応を引き起こし、EC50 は 10^{-9}M であった。S1P の他には SPC が EC50= 10^{-7}M の弱いアゴニストであることがわかった。その他の類縁脂質は 10^{-6}M までの濃度でカルシウム上昇を引き起こさなかった。 ^{32}P で標識した S1P を使って EDG1 に対する結合を調べると、HEL 親細胞では特異的結合はほとんどみられないのに対し、HEL-EDG1 細胞では有意な特異的結合が観察された。HEL-EDG1 細胞への $[\text{H}^3]\text{S1P}$ 結合は非標識の S1P により濃度依存的に抑制された。その IC50 は $5 \times 10^{-8}\text{M}$ であった。また他の類縁脂質の中では SPC のみが $[\text{H}^3]\text{S1P}$ の結合に競合した。私達は同様の方法を用いて、EDG3、EDG5 も S1P の受容体として機能し、いずれも S1P の他には SPC のみが弱いアゴニストとして作用することを確認した。各受容体を発現させた CHO 細胞 (EDG1 細胞、EDG3 細胞、EDG5 細胞) を用いて各々の情報伝達能を検討した。EDG1、EDG3、EDG5 はいずれもホスホリパーゼ C/カルシウム動員に共役するが、EDG1 は百日咳毒素 (PTX) 感受性の Gi を介して、EDG3 と EDG5 は主として PTX 非感受性 G タンパク質おそらくは Gq/11 を介して共役した。また 3 種の受容体とも PTX 感受性の Gi を介して MAPK を活性化した。しかしその共役の効率を受容体ごとに異なっており、EDG1 と EDG3 の MAPK 活性化に対する EC50 値は EDG5 のそれより 10 倍低値であった。また EDG1 と EDG3 は cAMP 産生を PTX 感受性 Gi を介して抑制した。これとは対照的に、EDG5 は cAMP 産生を促進した。

II. EDG 受容体による細胞遊走制御とそのメカニズム

各 S1P 受容体の細胞遊走に及ぼす作用を検討したところ、EDG1 細胞、EDG3 細胞では、S1P は化学遊走を誘導し、膜ラフリングの形成、Rac の活性化を引き起こした。これらの反応は、別の化学遊走因子であるインシュリン様増殖因子-I (IGF I)によ

っても同様に引き起こされた。S1P、IGF Iによるこれらの反応はRacの dominant negative 変異体の発現やPI 3-キナーゼ阻害剤によって強く抑制された。一方、EDG5細胞ではS1Pは化学遊走を誘導せず、逆にIGF Iによる化学遊走、膜ラフリングの形成、Racの活性化を完全に抑制した。S1PはEDG5細胞において他のEDG細胞と同様にPI 3-キナーゼ活性とその下流に存在するRac-GEF活性を増加させた。しかしRac-GAP活性は、EDG1細胞ではS1Pによって抑制される傾向にあったが、EDG5細胞では逆に増強した。これらの結果は、EDG5細胞におけるS1Pの化学遊走抑制作用にはRac-GEF活性の抑制ではなくRac-GAP活性の増強によるRacの抑制が関与していることを意味している。またS1PはEDG3細胞とEDG5細胞においてRhoを活性化したが、EDG1細胞では活性化しなかった。Cdc42は無刺激の状態である程度活性化されており、S1P刺激による変化はみられなかった。

考察

本研究と他の研究グループからの報告により、EDG受容体ファミリーは今やS1P受容体群(EDG1、EDG3、EDG5、EDG8)とLPA受容体群(EDG2、EDG4、EDG7)の二つのサブグループに分かれることが明らかになった。このように一つのリガンドに対し複数の受容体が存在することは、当然その機能的役割分担に興味をもたれ、私達は本研究において、EDG5が化学遊走を抑制する受容体として働くのに対し、EDG1とEDG3が化学遊走を誘導する受容体として働くことを明かにした。血液中のS1P濃度が数100nMオーダーであることを考えると、S1Pによる受容体を介した細胞運動制御は、実際に生体内での生理的、病的なさまざまな過程に関わっている可能性があると考えられる。活性化された血小板から放出されたS1Pが血管内皮あるいは平滑筋細胞に作用してさまざまな病態に関与している可能性も興味深い。また、近年循環器疾患で研究対象になっている障害血管における内膜肥厚が中膜平滑筋細胞の遊走・増殖がその主たる原因であることを考えると、EDG5を介した細胞遊走の抑制作用は効果的な治療として役立つ可能性がありその応用が期待される。特に各EDG受容体の選択的なアゴニスト、アンタゴニストの開発が、この分野の新しい治療法につながると思われる。またこれらの受容体の遺伝子導入は、血管内膜肥厚や悪性腫瘍に対する新しい遺伝子治療の可能性を示すものと考えられる。

結論

これまでリガンド不明であったGタンパク共役型受容体EDG1、EDG3、EDG5/AGR16がスフィンゴシン1-リン酸受容体であることを示した。これらの受容体は異なる情報伝達能を有し、EDG1、EDG3はGiタンパクを介してRacの活性化を引き起こしS1Pに対する細胞遊走を誘導する。一方、EDG5はRac-GAP活性を増強しRac活性を抑制することによって細胞遊走を抑制する。