

# 生体中のリゾホスファチジルセリンの測定およびリゾホスファチジルセリン受容体の機能解析

著者	奥平 倫世
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17730号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00121757">http://hdl.handle.net/10097/00121757</a>

博士論文

生体中のリゾホスファチジルセリンの測定および  
リゾホスファチジルセリン受容体の機能解析

平成 29 年度

東北大学大学院薬学研究科  
医療薬学専攻  
奥平 倫世

## 目次

### 略語一覧

1. 研究背景
2. 生体内における LysoPS および LysoPT の検出
  - 2.1 研究の背景と目的
  - 2.2 方法
  - 2.3 結果と考察
  - 2.4 まとめと今後の展望
3. LysoPS 受容体の機能解析
  - 3.1 研究の背景と目的
  - 3.2 方法
  - 3.3 結果と考察
  - 3.4 まとめと今後の展望
4. 総括
5. 引用文献
6. 発表論文
7. 謝辞

## 略語一覧

- ALPS : Autoimmune lymphoproliferative syndrome
- Con A : Concanavalin A
- DKO : Double knockout
- DNT cell : Double negative T cell
- GPCR : G-protein coupled receptor
- IL-2 : Interleukin-2
- IS : Internal standard
- KO : Knockout
- LC : Liquid-chromatography
- LPA : Lysophosphatidic acid
- LysoPS : Lysophosphatidylserine
- LysoPT : Lysophosphatidylthreonine
- MS : Mass spectrometry
- PLA : Phospholipase A
- PS : Phosphatidylserine
- PS-PLA<sub>1</sub> : Phosphatidylserine-specific phospholipase A<sub>1</sub>
- SRM : Selected reaction monitoring
- S1P : Sphingosine 1-phosphate
- TCR : T cell receptor
- WT : Wild type

## 1. 研究背景

リゾリン脂質はグリセロール骨格また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 (Lysophosphatidic acid : LPA) やスフィンゴシン-1-リン酸 (Sphingosine-1-phosphate : S1P) が生理的・病理的にきわめて重要な役割を担っていることが明らかになってきており、プロスタグラニンやロイコトリエンに次ぐ第二世代の脂質メディエーターとして注目されている。

リゾホスファチジルセリン (Lysophosphatidylserine : LysoPS) はリン酸基にアミノ酸の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作用 (Ref. 1-4)、神経細胞の突起伸長作用 (Ref. 5)、T 細胞の増殖抑制作用 (Ref. 6)、線維芽細胞の遊走促進作用 (Ref. 7) など複数の作用を有することが報告されている (**Fig. 1**)。しかし、LysoPS は①生体内での存在や②産生機構、③特異的な受容体が全く不明であったため、LPA や S1P のようにメディエーターとして着目されるには至っていなかった。当研究室ではこれまでに②産生機構、③特異的な受容体に関わる分子を複数同定し、解析を進めてきた。

## リゾホスファチジルセリン(LysoPS)

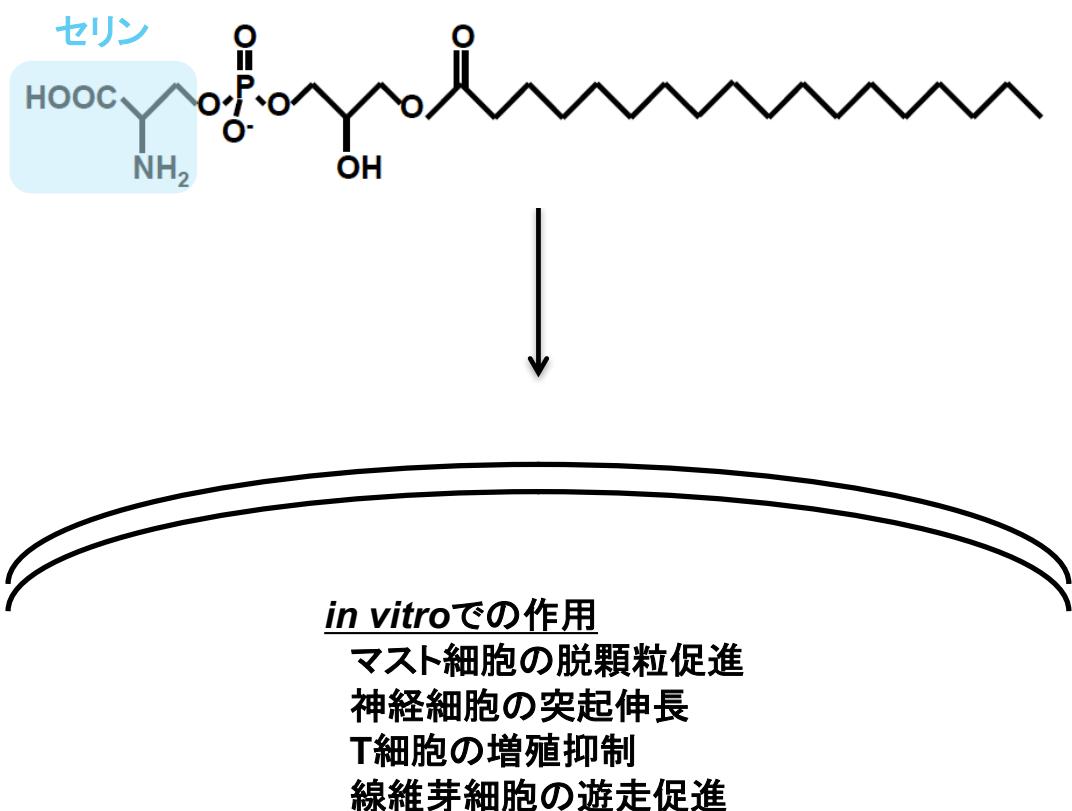


Fig. 1 リゾホスファチジルセリン(LysoPS)

LysoPS は極性頭部にアミノ酸のセリンを有するリゾリン脂質であり、*in vitro*において、マスト細胞の脱顆粒促進、T 細胞の増殖抑制などの作用を有することが知られている。

**LysoPS** は脂肪酸を 2 本有するリン脂質であるホスファチジルセリン (Phosphatidylserine : PS) からホスホリパーゼ A<sub>1</sub> (Phospholipase A<sub>1</sub> : PLA<sub>1</sub>) または PLA<sub>2</sub> によって脂肪酸が 1 本切断されることにより産生されると考えられている (**Fig. 2**)。

1995 年に cDNA クローニングがなされた PS 特異的 PLA<sub>1</sub> (Phosphatidylserine-specific phospholipase A<sub>1</sub>:PS-PLA<sub>1</sub>) は PS および LysoPS の *sn-1* 位の脂肪酸を特異的に加水分解する酵素である (**Fig. 2**) (Ref. 8-12)。PS-PLA<sub>1</sub> は他のリン脂質には反応せず、セリン残基を有する PS 及び LysoPS 特異的に作用するという非常にユニークな性質を有していることから、PS-PLA<sub>1</sub> は (1) PS の消去、(2) *sn-2* 位に脂肪酸を有する 2-acyl LysoPS の産生、(3) 1-acyl LysoPS の消去を介して PS または LysoPS の機能を調節しているものと考えられる。PS-PLA<sub>1</sub> に関してはサンドイッチ ELISA 法による発現解析およびノックアウト (knockout : KO) マウスの解析が進められている。まず発現解析においては、敗血症や腹膜炎などいくつかの炎症刺激により PS-PLA<sub>1</sub> の発現が上昇することが分かっている。また、KO マウスの解析においては、即時型アレルギー反応が KO マウスで顕著に減弱することが明らかになっている (Ref. 13)。LysoPS がマスト細胞の脱顆粒を促進する作用を有することから、PS-PLA<sub>1</sub> が LysoPS を産生し、マスト細胞の活性化を制御していることが示唆されるが、PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスにおける LysoPS 量の測定やマスト細胞上の LysoPS 受容体の同定・解析は行われていないため証明には至っていない。

## ホスファチジルセリン(PS)

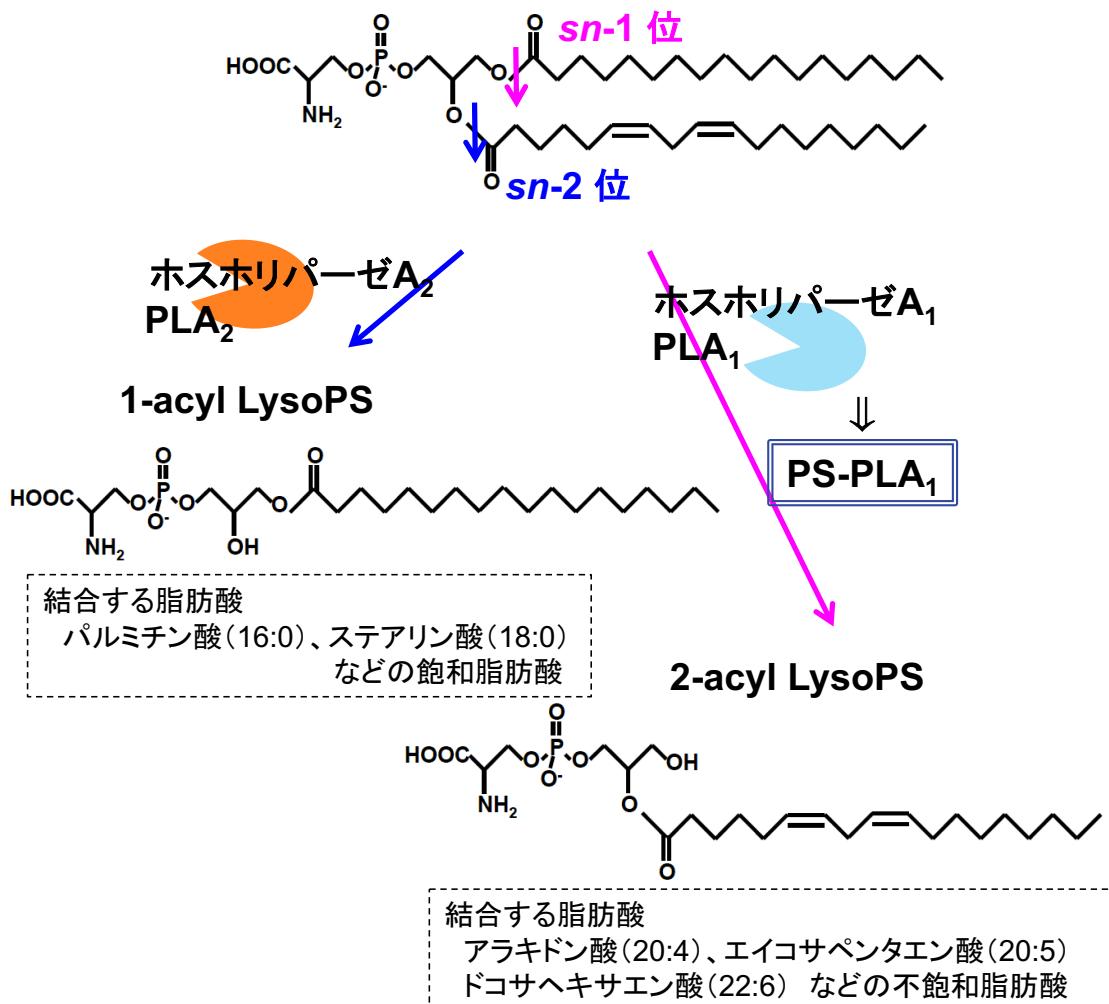


Fig. 2 想定される LysoPS の產生機構とホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA<sub>1</sub>(PS-PLA<sub>1</sub>)

LysoPS はホスファチジルセリン(PS)の脂肪酸がホスホリパーゼA<sub>1</sub>(PLA<sub>1</sub>)またはホスホリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)により切断されて产生されると考えられている。

PS-PLA<sub>1</sub> は PS のセリンを特異的に認識し、sn-1 位の脂肪酸を加水分解して sn-2 位に脂肪酸を有する 2-acyl LysoPS を产生する。

一方で **LysoPS** 受容体に関しては現在までに以下のことが明らかになってい  
る。まず、2006 年に他の研究室により G タンパク質共役型受容体 (G-protein  
coupled receptor : GPCR) である GPR34 が LysoPS に応答性を示す受容体で  
あることが初めて報告された (Ref. 14)。さらに、当研究室では 2012 年 LysoPS  
に特異的な応答性を示す受容体として P2Y10、A630033H20Rik (ヒトでは偽遺  
伝子)、GPR174 を同定している (**Fig. 3**) (Ref. 15)。これら LysoPS 特異的受  
容体の存在は、LysoPS がこれらの受容体を介してメディエーターとして機能す  
ることを示唆しているが、未だこれらの受容体の生体内での機能は明らかにな  
っていない。当研究室ではこれら分子の解析を進めており、P2Y10 と GPR174  
は脾臓や胸腺、リンパ節などの免疫系の組織に高発現していること、また活性  
化 T 細胞で発現が上昇することを明らかにしている。さらに単離 T 細胞を用い  
た *in vitro* の解析から、LysoPS が P2Y10 を介して活性化 T 細胞の細胞接着抑制、  
増殖抑制作用を示すこと、GPR174 を介してインターロイキン 2 産生抑制作用  
を示すことを見出している (Ref. 16)。

## リゾホスファチジルセリン(LysoPS)

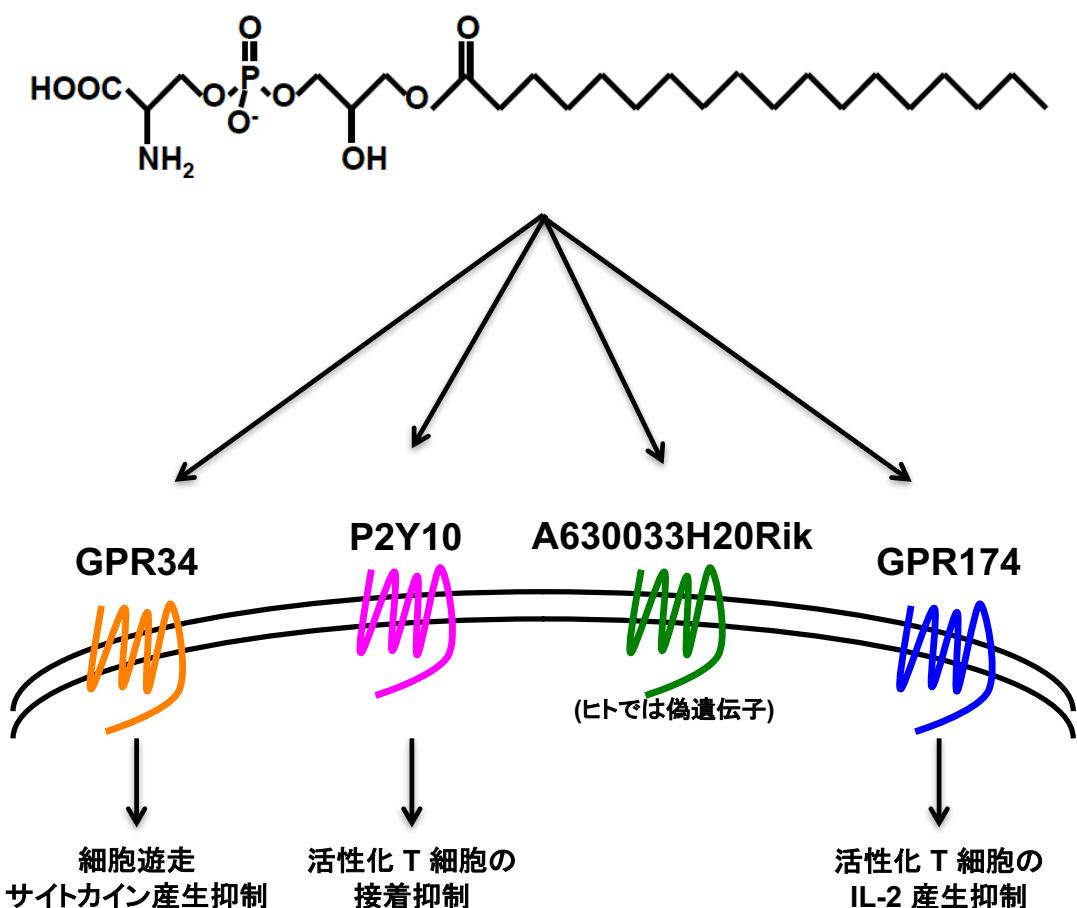


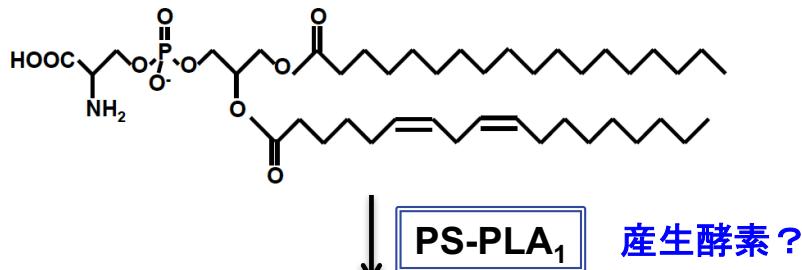
Fig. 3 LysoPS 受容体と *in vitro* における機能

現在 LysoPS 応答性を示す受容体として GPR34、P2Y10、A630033H20Rik、GPR174 の 4 つの GPCR が同定されている。また、それぞれの受容体が *in vitro* でいくつかの作用を有することが分かっている。

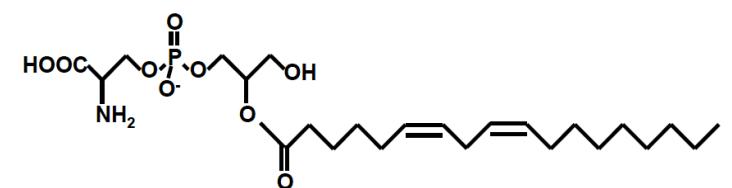
以上述べたように LysoPS の②産生機構や③特異的な受容体が少しづつ明らかになってきており、LysoPS が生体内でメディエーターとして機能しうることが強く示唆される。しかし、①LysoPS が生体内に存在するのかに関してはこれまでほとんど知見がない (Fig. 4)。LysoPS がメディエーターであることを証明する上で、LysoPS 分子そのものを捉えることは極めて重要である。そこで本研究において私は、LysoPS の測定系を構築し、LysoPS が生体内のどこにどのような状況で存在するのかについて明らかにすることとした。その中で LysoPS に非常に良く似た構造・機能を有するリゾホスファチジルスレオニン (Lysophosphatidylthreonine : LysoPT) を初めて同定することに成功したため、併せて報告する。

また当研究室で同定した LysoPS 受容体である P2Y10 および GPR174 の KO マウスを作製し、受容体の機能解析を行ったのでその結果も報告する。

## ホスファチジルセリン(PS)



## リゾホスファチジルセリン(LysoPS)



生体内のどこにどのように存在するのか？

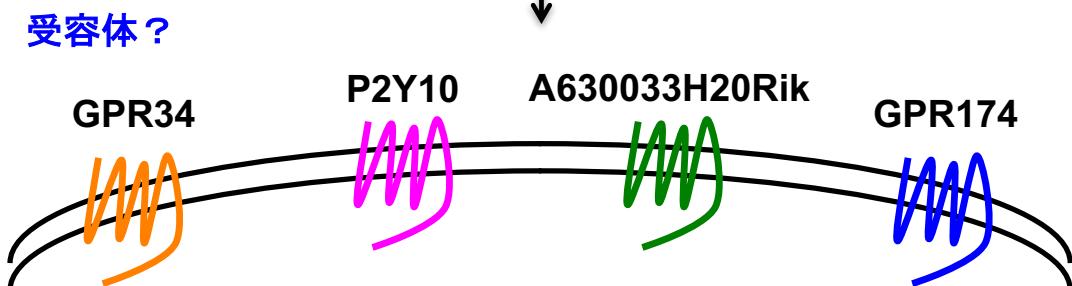


Fig. 4 LysoPS の生体内での存在はほとんど明らかになっていない

最近の研究により、LysoPS の产生酵素や受容体に関しては候補分子が同定され少しずつ明らかになってきているが、LysoPS が生体内のどこにどのように存在するのかについてはほとんど報告がない。

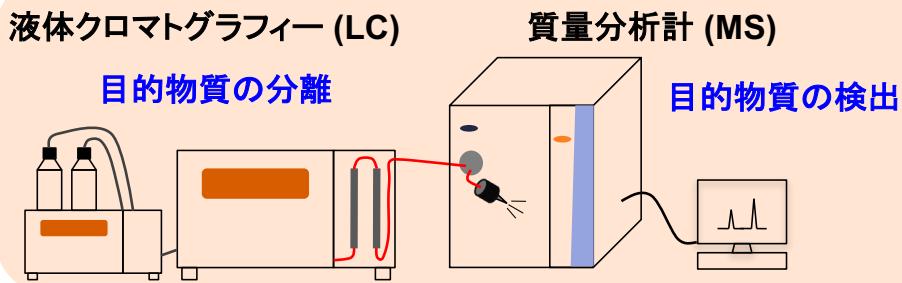
## 2. 生体中の LysoPS および LysoPT の検出

### 2.1 研究の背景と目的

1 で述べたように、LysoPS がメディエーターであることを証明する上で、生体内において LysoPS 分子そのものを捉えることは極めて重要である。しかし、これまで LysoPS の生体内での挙動に関してはほとんど知見がなかった。その理由として、LysoPS を含むリゾリン脂質は、極性頭部や脂肪酸の違いにより様々な分子種が存在すること、構造の似通った他の脂質が大量に存在することから、分離・検出が難しいことが挙げられる。このような特徴を有するリゾリン脂質の測定には、液体クロマトグラフィー (Liquid-chromatography: LC) および質量分析計 (Mass-spectrometry : MS) の組み合わせが極めて有効である。LC を用いることで、類似した構造を親水性・疎水性の違いにより精密に分離でき、また MS を用いることでわずかな質量の違いを正確に区別して検出することが可能となっている。

現在、当研究室を含めた複数の研究室から LC-MS を用いたリゾリン脂質定量系が報告されており nM レベルでの解析が可能となっている (Ref.17-20) (Fig. 5)。私はまず、2014 年に発表したリゾリン脂質一斉定量系 (Ref. 20) を用いて生体中の LysoPS 量を測定した。その結果、マウス臓器中の LysoPS を検出・定量することには成功したが、血漿中の LysoPS は検出することができなかった。臓器中の LysoPS は細胞内・細胞膜由来のものも反映しており、また臓器サンプルは調整が困難であることなどの欠点がある。したがって私は血液中の LysoPS を測定するために、本研究ではまず既存の定量系の高感度化を試みた。次に新規定量系を用いてマウス臓器および血液中の LysoPS の測定を行った。さらに、病態モデルマウスを用いて LysoPS 量の測定を行った。

(A)



(B)

LC	MS	定量限界	測定対象	引用
順相 (Silica)	Q-TRAP	30 nM	LPA	Ref. 17
逆相 (C8)	トリプル四重極	20 nM	LPA	Ref. 18
順相 (Silica)	トリプル四重極	9 nM	LPA, LysoPS, LPG, LPE	Ref. 19
逆相 (C18)	トリプル四重極	10 nM	LPA, LysoPS, LPG, LPE, LPI, LPC	Ref. 20

LPG : リゾホスファチジルグリセロール  
LPE : リゾホスファチジルエタノールアミン  
LPI : リゾホスファチジルイノシトール  
LPC : リゾホスファチジルコリン

Fig. 5 これまでに報告されているリゾリン脂質定量系

(A) LysoPS の測定には液体クロマトグラフィー(LC)および質量分析計(MS)を用いた。

(B) これまでに複数のリゾリン脂質定量系が報告されている。

ここでリゾホスファチジルスレオニン (LysoPT) について紹介する。当研究室では LysoPS 受容体同定を目的とし、LysoPS のマスト細胞脱顆粒促進作用に着目した LysoPS 誘導体の合成と活性評価を行ってきた（東京大学薬化学教室との共同研究）。その結果、LysoPS よりも強いマスト細胞活性化作用を有する LysoPT を得ることに成功した (Ref. 21)。LysoPT は極性頭部にアミノ酸のスレオニンを有しており、LysoPS とはメチル基の有無が異なるだけの極めて類似した構造をしている (Fig.6A)。LysoPT はマスト細胞脱顆粒促進作用において LysoPS より 10 倍高い活性を示す (Fig.6B)。またマウス投与時の体温低下作用においても 10-20 倍高い活性を示すことが分かっている (Fig.6C) (Ref. 13, 21)。LysoPT は GPR34 や P2Y10、GPR174 には作用しないが、マスト細胞上の未知の LysoPS 受容体を介している可能性がある。そこで本研究では LysoPT を LysoPS 関連分子と位置付け、新規定量系を用いて LysoPT の検出および定量も同時に行った。

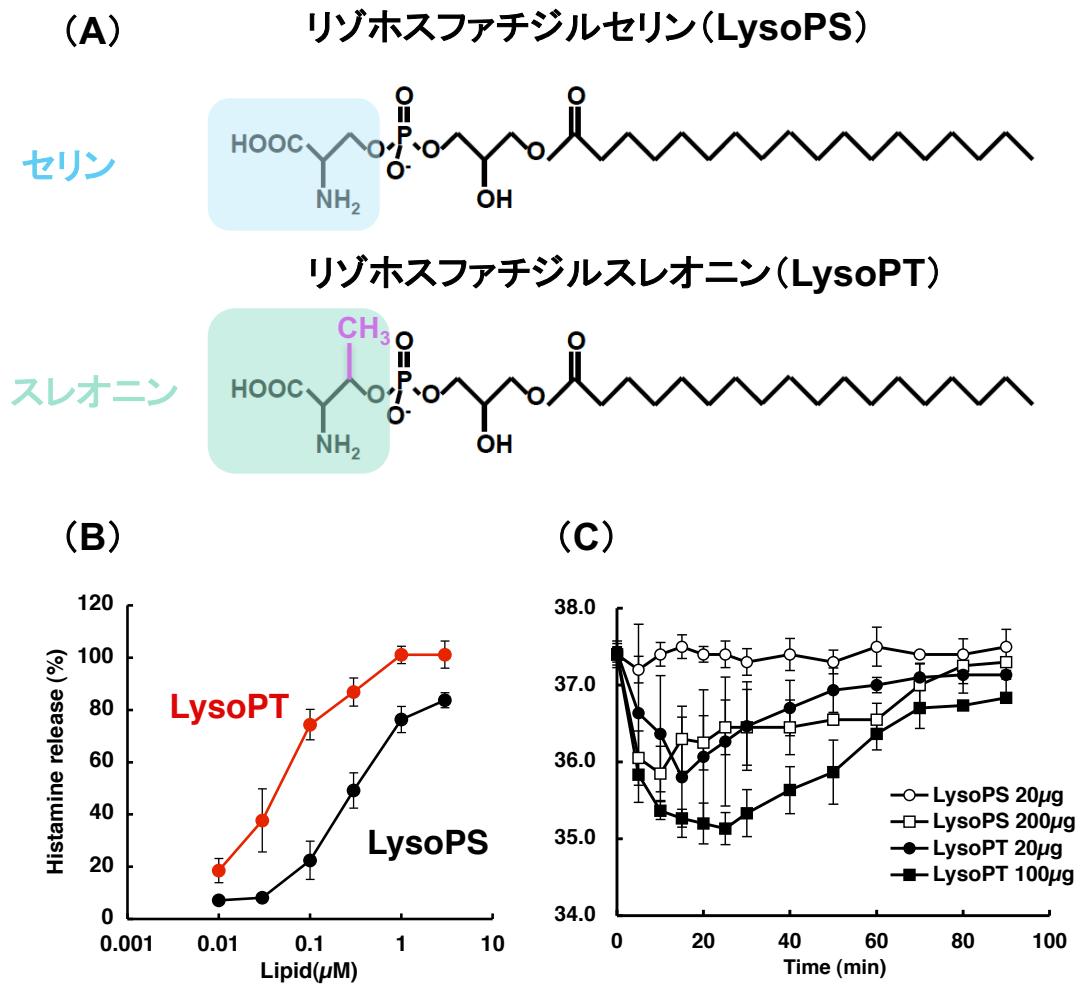


Fig. 6 リゾホスファチジルスレオニン(LyoPT)

(A) LyoPT の構造。LyoPS とは極性頭部のメチル基のみが異なる。(B) LyoPT は *in vitro* のマスト細胞脱顆粒促進作用において LyoPS より 10 倍高い活性を示す。  
 (C) LyoPT は *in vivo* の体温低下作用において LyoPS より 10-20 倍高い活性を示す。

## 2.2 実験方法

### ① 脂質の調製

LysoPS (16:0)、(17:1)、(18:0)、(18:1) は Avanti Polar Lipids から購入した。LysoPT (16:0)、(18:0)、(18:1) は東京大学薬学系研究科薬化学教室 大和田智彦教授より供与いただいた。脂質の調製にはマイクロシリジ（伊東製作所）、コーティング済み試験管 (AGC TECHNO GLASS)、メスフラスコ (IWAKI) を用いた。粉末状の LysoPS (16:0)、(18:0)、(18:1) および LysoPT (16:0)、(18:0)、(18:1) をクロロホルム (関東化学) に溶解し、10 mM の溶液をそれぞれ調製した。次に各 10 mM 溶液から 10 μL ずつメスフラスコにとり全量が 10 mL となるようにメタノール (関東化学) で希釈して 10 μM の混合液を調製した。この混合液をさらにメタノールで希釈して、100 nM、50 nM、10 nM、5 nM、1 nM、500 pM のスタンダード液を調製した。内部標準物質 (Internal Standard : IS) として LysoPS (17:1) を使用した。LysoPS (17:1) が生体中に存在しないことは確認済である。同様の方法で 1 μM の IS 液を調製し、終濃度が 100 nM となるように各サンプルに添加した。

### ② LC-MS/MS 解析

#### ②-1 : LC 分離 (**Fig.7**)

LC は Shiseido の NANOSPACE SI-II システムを用いた。分離カラムとして、CAPCELL PAK C18 ACR (250 mm x 1.5 mm i.d., 3 μm particle size) (Shiseido)、ガードカラムとして CAPCELL PAK C16 ACR (10 mm x 2.0 mm i.d., 3 μm particle size) (Shiseido) を用いた。カラムは恒温槽により 40°C に維持した。移動相は以下の二種類を用い、逆相系による分離を行った。

- ・ 移動相 A : 5 mM HCOONH<sub>4</sub> (pH 4), H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 100/0  
(100 mM HCOONH<sub>4</sub> 5 mL + H<sub>2</sub>O 95 mL、HCOOH で pH を 4 に調製)

- ・移動相 B : 5 mM HCOONH<sub>4</sub> (pH 4) , H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 5/95  
(100 mM HCOONH<sub>4</sub> 5 mL + CH<sub>3</sub>CN 95 mL、HCOOH で pH を 4 に調製)  
※ HCOONH<sub>4</sub> (和光純薬)、CH<sub>3</sub>CN (関東化学)、H<sub>2</sub>O (Milli-Q)
- ・流速 150 μL/min
- ・グラジエント

0-0.2 min 移動相 A/B = 50/50

0.2-12 min 移動相 A/B = 50/50→0/100

12-17 min 移動相 A/B = 0/100

17-20 min 移動相 A/B = 50/50

なお、サンプル注入直後に検出される夾雑物による質量分析計の汚染を軽減する目的で、0-5 min および 18-20 min はスイッチングバルブを用いて廃液として捨てた。

## 液体クロマトグラフィー(LC) NANOSPACE SI-II(SHISEIDO)

カラム 逆相カラム : CAPCELLPAK C18 ACR  
(250 mm x 1.5 mm i.d., 3  $\mu$ m particle size)

移動相 A: 5 mM HCOONH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 100/0 (pH 4)  
B: 5 mM HCOONH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 5/95 (pH 4)

流速 150  $\mu$ L/min

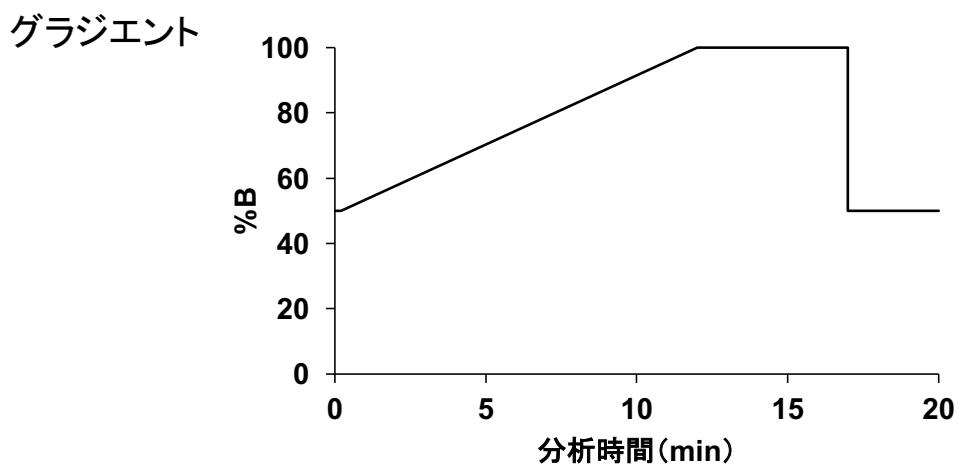


Fig. 7 液体クロマトグラフィー(LC)の分離条件

固定相に疎水性充填剤を用いる逆相分離法による分離を行った。逆相分離法では LysoPS は疎水性の低い順(脂肪酸の鎖長が短い順、また不飽和度が高い順)に溶出される。

## ②-2 : MS/MS 解析 (Fig. 8)

MS は Thermo Fischer Scientific のトリプル四重極型質量分析計 TSQ Quantiva を用いた。また MS のイオン源には Heated electrospray ionization (HESI) プローブを用いた。ESI 法は大気圧下でのイオン化が可能であること、ソフトなイオン化法であることから、難揮発性、熱不安定性化合物においても安定したイオン化を行うことができる。

MS 分析では、選択反応モニタリング (Selected reaction monitoring : SRM) モードにより MS/MS 解析を行った。SRM モードでは、Q1において特定のイオン (precursor ion) を選択し、Q2 で衝突誘起解離によりイオンを壊し、Q3において壊したイオン (Product ion) の中から特定のイオンを検出する。SRM モードでは、分子特異的な構造を捉えられること、ノイズレベルを下げられることでより高感度な分析が可能になる。LysoPS および LysoPT は Precursor ion として  $[M-H]^-$  を、Product ion として LysoPS は  $[M-H-Serine\text{ (分子量 }87)]^-$  を、LysoPT は  $[M-H-Threonine\text{ (分子量 }101)]^-$  を検出した (ネガティブイオンモード)。

生体サンプルの解析においては、スタンダードとして用意した LysoPS および LysoPT (16:0)、(18:0)、(18:1) に加えて (18:2)、(20:3)、(20:4)、(20:5)、(22:5)、(22:6) も同様の方法で検出した。スタンダードが存在しない分子種の定量はそれぞれ LysoPS (18:1)、LysoPT (18:1) の検量線を用いて行った。

マススペクトロメトリー(MS) TSQ Quantiva(Thermo Fischer Scientific)

## イオン化 エレクトロスプレーイオン化法

## 質量分析部 トリプル四重極分析計

測定モード 選択反応モニタリング(SRM)モード

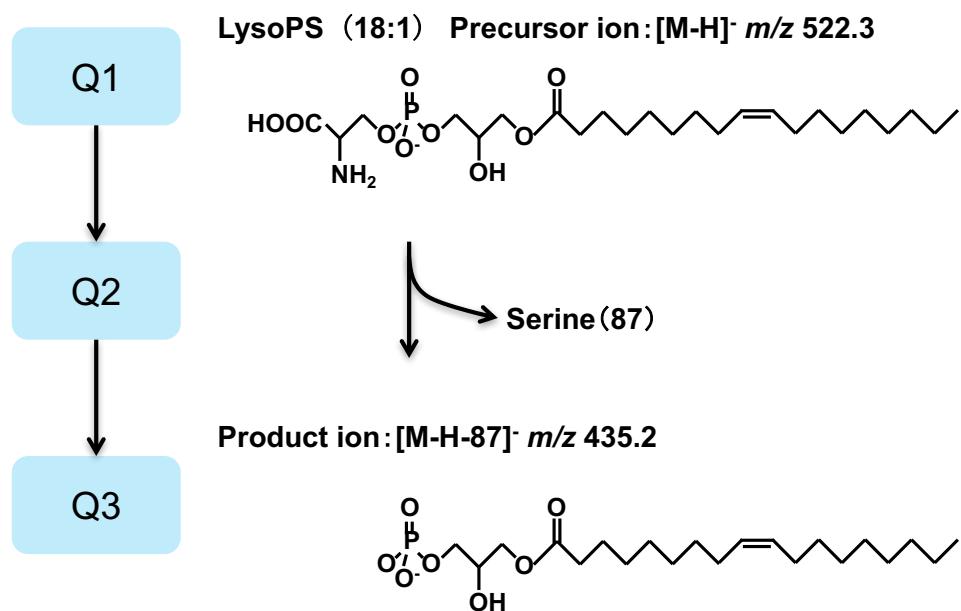


Fig. 8 質量分析系(MS)の分析条件

MS では SRM モードによる MS/MS 解析を行った。SRM モードは分子特異的な構造を捉えられること、ノイズレベルを下げられることなどの利点があり、高感度な分析が可能になる。

## ②-3：定量系の日内・日間変動の検討（精度の検討）

100 nM、50 nM、10 nM、5 nM、1 nM、500 pM のスタンダード液 (LysoPS (16:0)、(18:0)、(18:1) および LysoPT (16:0)、(18:0)、(18:1) の混合液) n = 6 で 3 days 連続測定し、精度の検討を行った。

## ③ マウス臓器および血液サンプルの調製 (Fig.9)

マウスは 7~8 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc (日本 SLC) を使用した。動物の取り扱いは東北大学大学院薬学研究科動物実験委員会が作製した「実験動物の取り扱いに関する指針」に基づいて行った。

サンプルの調製には脂質の吸着を抑えるため、全ての過程においてシリコナイズチューブ (WATSON) およびシリコナイズチップ (WATSON) を用いた。

血液サンプルとして血漿および血清の二種類を用意した。血漿サンプルはヘパリンコート済の採血管 Hemato-Clad Heparinized (フナコシ) を用いて眼底より採血を行った後、速やかに遠心 (1500 × g, 4°C, 5 min) して上清を回収した。血清サンプルはノンコートの採血管 Hamatokrit-Kapillaren (HIRSCHMANN) を用いて眼底より採血を行った後、37°Cで 1 hr 加温 (血液凝固反応) し、遠心 (1500 × g, 4°C, 5 min) して上清を回収した。

臓器サンプルとして脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、大腸、大腿筋、皮膚を用意した。マウスを 24 hr 絶食した後、頸椎脱臼を行い、各種臓器を摘出し、速やかに氷冷した。胃、小腸、大腸は食事・糞の影響を除くために PBS で 2~3 回洗浄した。

血漿および血清はそれぞれ 10 μL を、臓器は約 10 mg をチューブに取り、10 倍量のメタノール (終濃度 100 nM の IS : LysoPS (17:1) を含む) を加えた。血漿・血清は vortex 搅拌、臓器は MS-100R beads cell disrupter (TAKARA) を用いてビーズ搅拌し、遠心 (21500 × g, 4°C, 5 min) して上清を 0.2 μm の濾

過フィルター (YMC) で濾過したものを解析サンプルとした。LC-MS には 20  $\mu\text{L}$  を injection した。

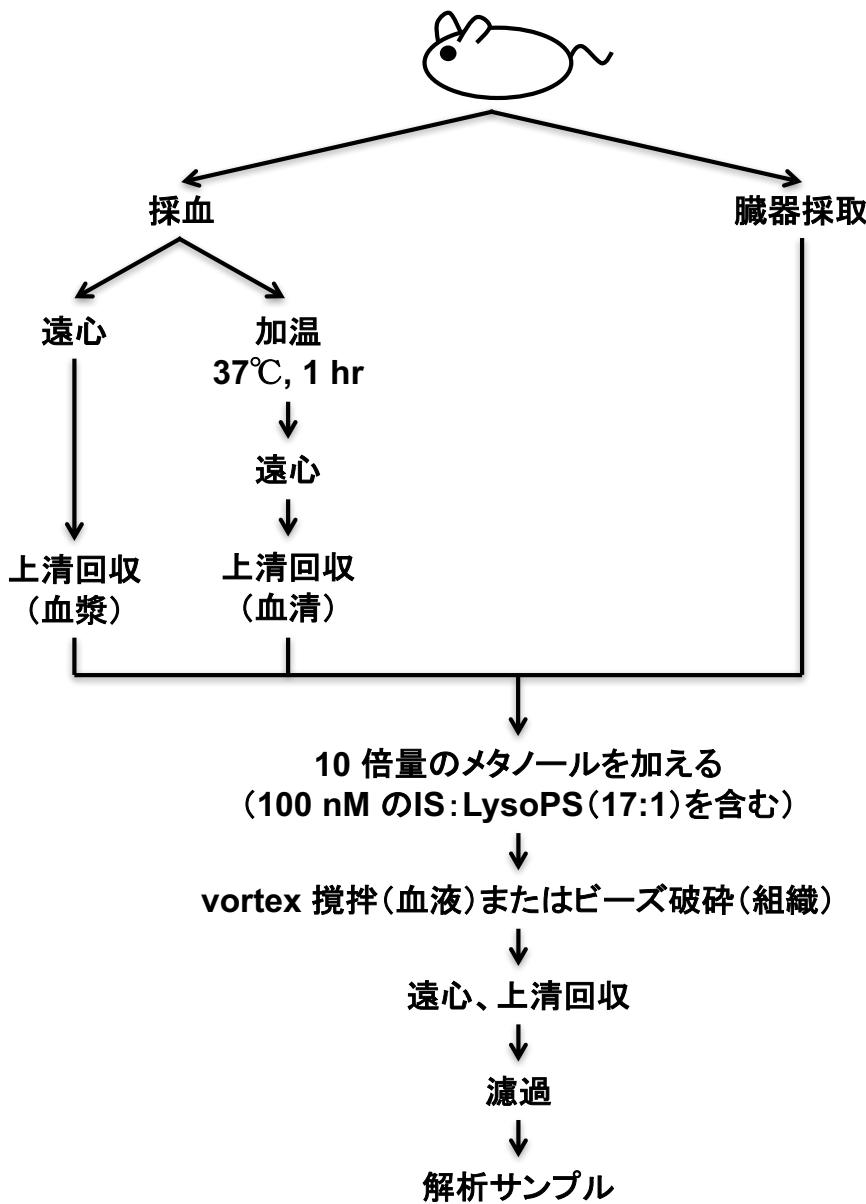


Fig. 9 マウス組織または血液サンプルの調製方法

マウスの血液、組織はメタノールによる除タンパク処理のみで解析サンプルとした。抽出効率は90~110%であることを確認している。

#### ④ 病態モデルマウスの作製

創傷モデル、カゼイン誘発性腹膜炎モデル、コンカナバリン A (Concanavalin A : Con A) 誘発性肝炎モデルを作製した。マウスはいずれも 7~12 週齢の雄性を用いた。

- 創傷モデル

前日にマウスの背部の毛を剃り、生検トレパン (KAI) を用いて皮膚に直径 4 mm の創傷を誘導した。創傷直後から 0, 1, 2, 4 hr 後に創傷部にピペットマンを当て 50µL の PBS で 2-3 回サスペンドすることにより浸出液を回収した。

- カゼイン誘導性腹膜炎モデル

オートクレーブ滅菌した 10% (w/v) カゼイン溶液 (Casein sodium (和光純薬) , PBS) 2 mL を 26G 注射針でマウス腹腔内投与し腹膜炎を惹起した。0, 4, 8, 16, 24, 48 hr 後に頸動脈切断にて瀉血し、PBS 1.5 mL を 27G 注射針で腹腔内に投与し、腹部をやさしく揉んだ後、開腹して洗浄液を回収した。

- Con A 誘発性肝炎モデル

2 mg/mL Con A 溶液 (Concanavalin A (Sigma Aldrich) , 生理食塩水 (大塚製薬)) を、29G マイジェクターを用いて 20 mg/kg となるようにマウスに尾静脈投与して肝炎を惹起した。0, 2, 4, 6, 12, 24 hr 後に血漿を回収した。また、0, 6 hr 後にマウスを頸椎脱臼し、PBS 灌流して肝臓を回収した。

それぞれの病態モデルマウスから回収した洗浄液、血液、臓器は②の方法を用いて LC-MS/MS 解析サンプルとした。

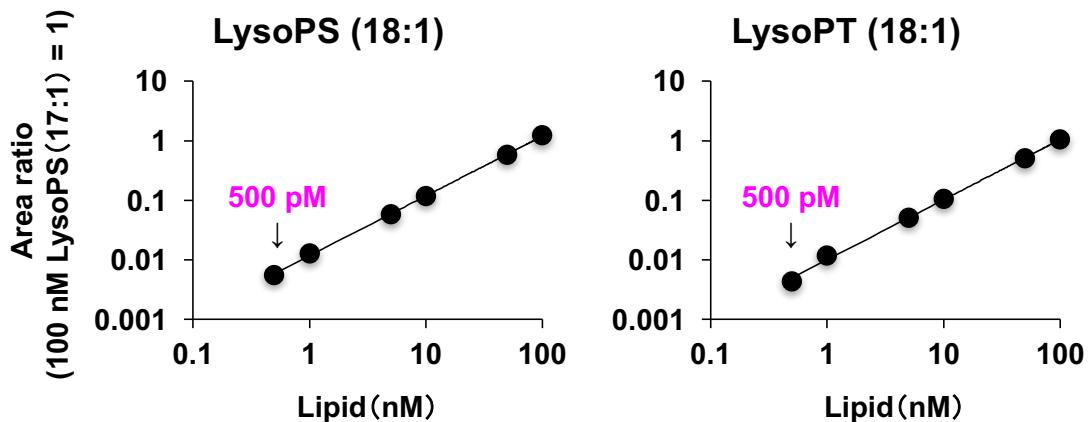
## 2.3 結果と考察

### ① 既存のリゾリン脂質定量系の高感度化

#### ①-1：結果

2014 年に報告した定量系では Thermo Fischer Scientific の TSQ Quantum Ultra を用いたが、今回は TSQ Quantiva を用いた。TSQ Quantiva はイオン化部でイオンとなった測定対象物を効率よく MS 内部に導入することでより高感度の測定を可能にする。[Fig. 10A](#) に新規定量系を用いて作製した LysoPS および LysoPT の検量線を示す。いずれも定量限界は 500 pM でありこれまでの 10 nM に比べて約 20 倍感度を上昇させることに成功した。また、定量系の精度は 0.6~10.3% と良好であることが確認できた ([Fig. 10B](#))。

(A)



(B)

concentration (nM)	日内変動(%)		日間変動(%)	
	LysoPS (18:1)	LysoPT (18:1)	LysoPS (18:1)	LysoPT (18:1)
0.5	4.0	10.3	6.0	1.7
1	9.9	1.9	8.0	4.0
5	6.2	0.8	5.1	4.2
10	9.3	3.1	3.1	4.4
50	1.3	0.7	3.6	1.5
100	0.6	2.4	2.1	1.9

Fig. 10 新規 LysoPS 定量系の検量線および精度

(A) LysoPS(18:1)および LysoPT(18:1)の検量線。各濃度のピーク面積と、IS:100 nM LysoPS(17:1)のピーク面積の比をプロットした。既存の系からさらに 20 倍の高感度化に成功した。

(B) 新規定量系の日内変動および日間変動。各濃度の LysoPS および LysoPT を  $n = 6$  で 3 days 連続測定し、精度の検討を行った。精度は日内、日間とも 10.3% 以下と極めて高いことが分かった。

## ①-2：考察

今回は新しい **MS** 装置を使用することで高感度化に成功したが、**LC-MS/MS** 解析において検出感度を向上させる方法は複数存在する。

まずサンプル調製においては、**LysoPS**・**LysoPT** の精製度を上げることで間接的に感度が向上する。現在はメタノール抽出という極めて簡便な方法を用いているが、他にもブタノール抽出や **Bligh & Dyer** 法と呼ばれるメタノール/クロロホルム抽出などいくつかの方法が存在する。中でも **Bligh & Dyer** 法は精製度が極めて高く、脂質抽出法として広く用いられている。2014 年の論文において私はメタノール抽出における臓器からの **LysoPS** 抽出効率が 90~110% であることを確認している (Ref. 20)。一方で **Bligh & Dyer** 法は抽出操作が煩雑であること、抽出過程におけるロスが多いこと (抽出効率は 40~50%) のデメリットがあり、今回は検討を行わなかった。

次に **LC** においては、分離を改善することで各分子の溶出ピークがよりシャープになり感度が上昇する。分離を改善するためには、カラム充填剤の粒子径を小さくする、カラム長を長くする、低吸着カラムに変える、移動相を変える、温度を変えるなどの方法が取られるが、溶出時間が延長すること、カラムや移動相の種類が多く検討が複雑・困難であることなどのデメリットがある。カラムの粒子径およびカラム長に関しては比較的簡便に検討できるため、今後行いたい。

また **MS** においては、**ESI** プローブの位置の調節、イオン化ガス圧や **CID** ガス圧などの **MS** のパラメーターを変更することで 2~3 倍感度が上昇する。**MS** に関する検討は **TSQ Quantiva** 導入時に実施済みである。

## ② マウス臓器および血液中の LysoPS・LysoPT の測定

### ②-1：結果

**Fig. 11** にマウス臓器（脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、大腸、大腿筋、皮膚）中の LysoPS (A) および LysoPT (B) の分布を示す。LysoPS および LysoPT の臓器分布は極めて類似しており、胃、大腸、腎臓、小腸の順で多いことが分かった。また **Fig. 12** に各臓器における LysoPS (A)・LysoPT (B) の脂肪酸分子種の分布を示す。臓器間で脂肪酸分子種の分布が異なることが分かった。また LysoPS と LysoPT の量を比較すると、LysoPS は 200 pmol/mg、LysoPT は 1 pmol/mg と約 200 倍の差があることが分かった。

次に **Fig. 13** に血漿及び血清中の LysoPS (A)・LysoPT (B) 分布を示す。まず血漿中においては LysoPS (18:0) が約 8 nM と最も多く、次いで LysoPS (22:6) が約 4 nM、LysoPS (18:1) および (20:4) が約 1.5 nM 検出された。一方、LysoPT は残念ながら検出できなかった。また、血清においては LysoPS (22:6) が約 340 nM と最も多く、次いで (20:4)、(18:2) など不飽和脂肪酸を有する LysoPS が多く検出された。同様に LysoPT も不飽和脂肪酸結合型が多く検出され、濃度は 2~8 nM であった。

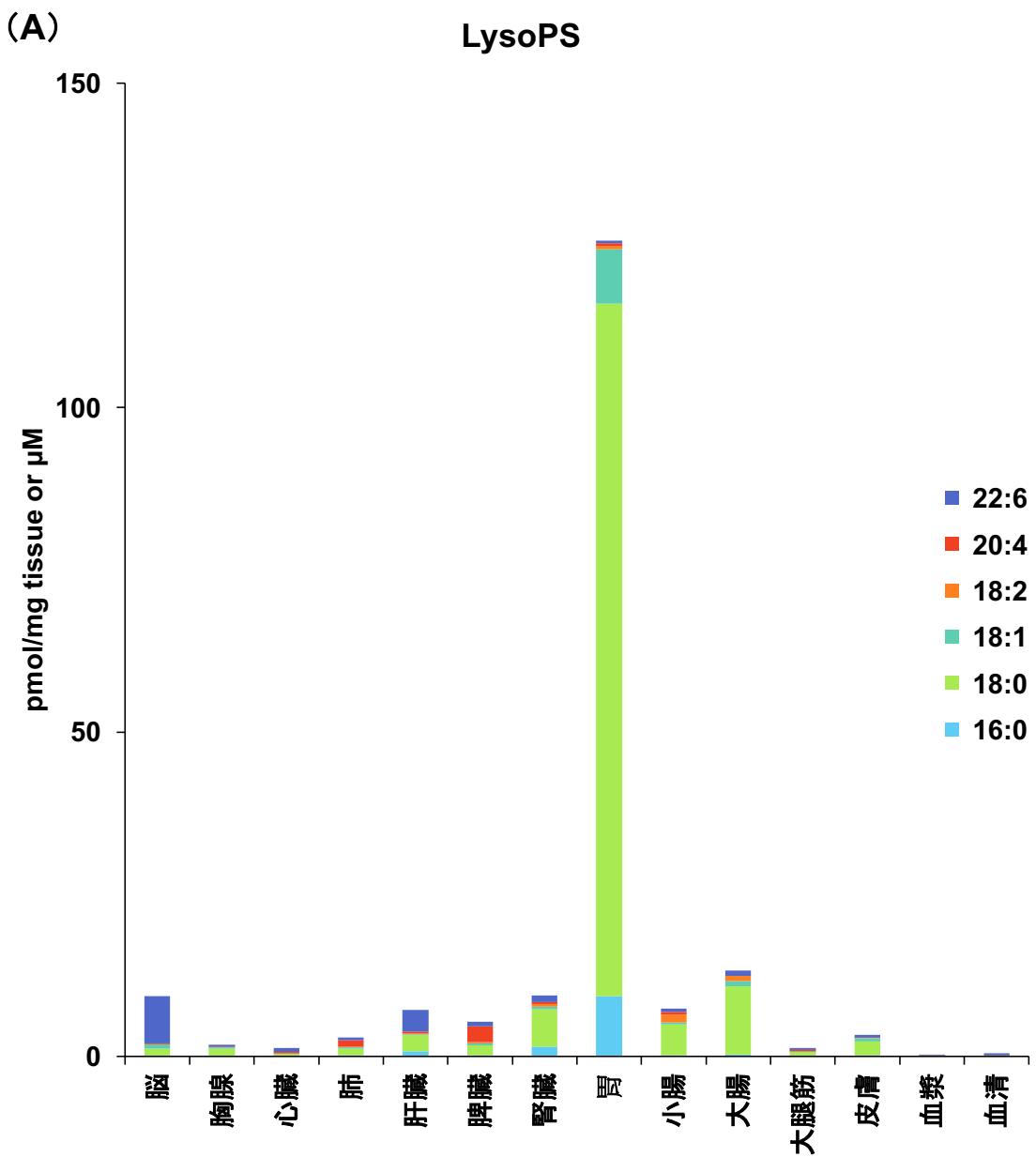


Fig. 11 マウス臓器中のLysoPSおよびLysoPT

(A) 臓器中の LysoPS。LysoPS 量は胃、大腸、腎臓、脳の順に多く、総量は約 200 pmol/mg tissue であった。

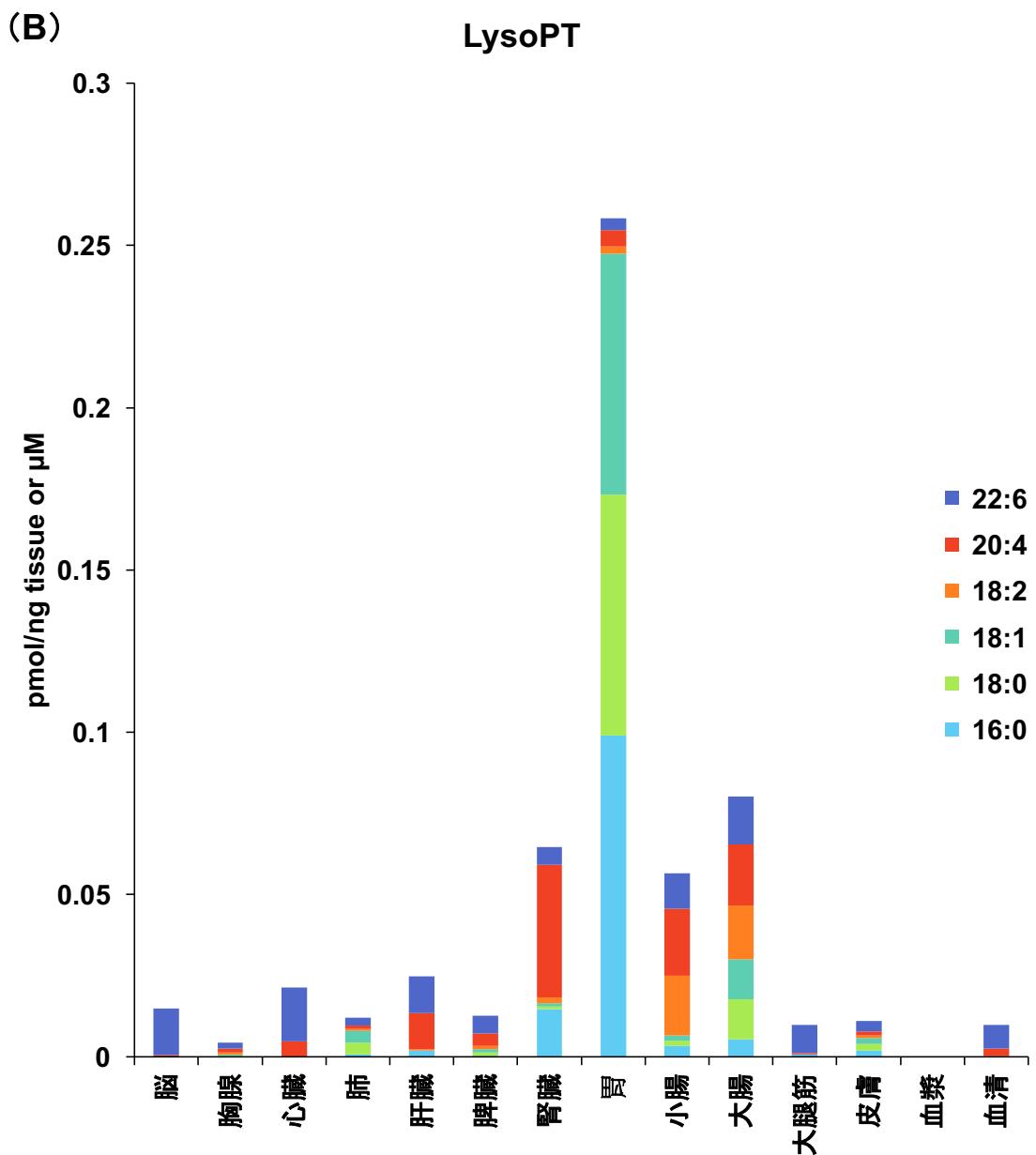


Fig. 11 マウス臓器中のLysoPSおよびLysoPT

(B) 臓器中の LysoPT。LysoPT 量は胃、大腸、腎臓、小腸の順に多く、総量は約 1.2 pmol/mg tissue であった。LysoPT の臓器分布は LysoPS と極めて類似していた。

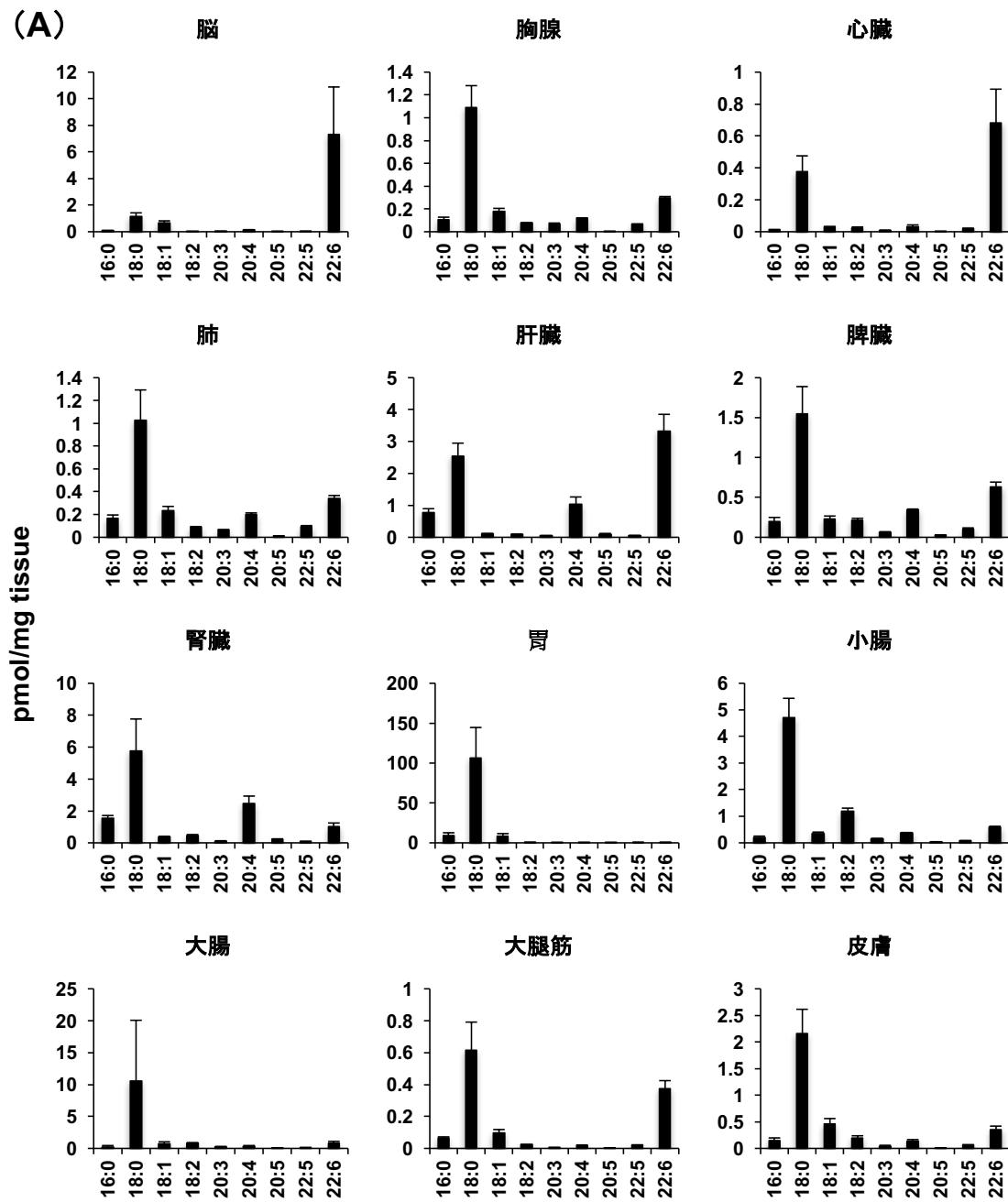


Fig. 12 各臓器における LysoPS(A)および LysoPT(B)の脂肪酸分子種の分布

(A) LysoPS の脂肪酸分子種の分布

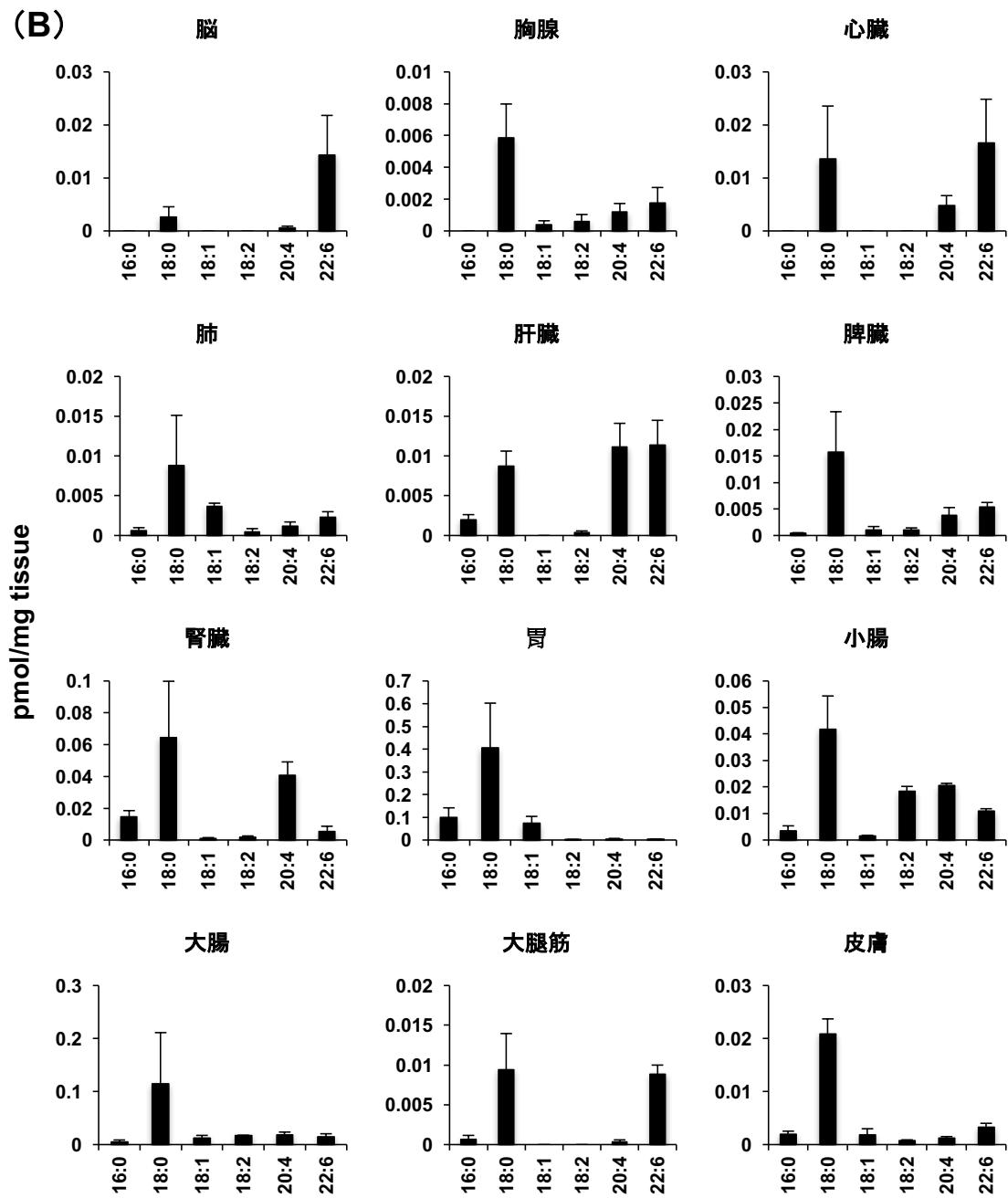


Fig. 12 各臓器における LysoPS(A)および LysoPT(B)の脂肪酸分子種の分布

(B) LysoPT の脂肪酸分子種の分布

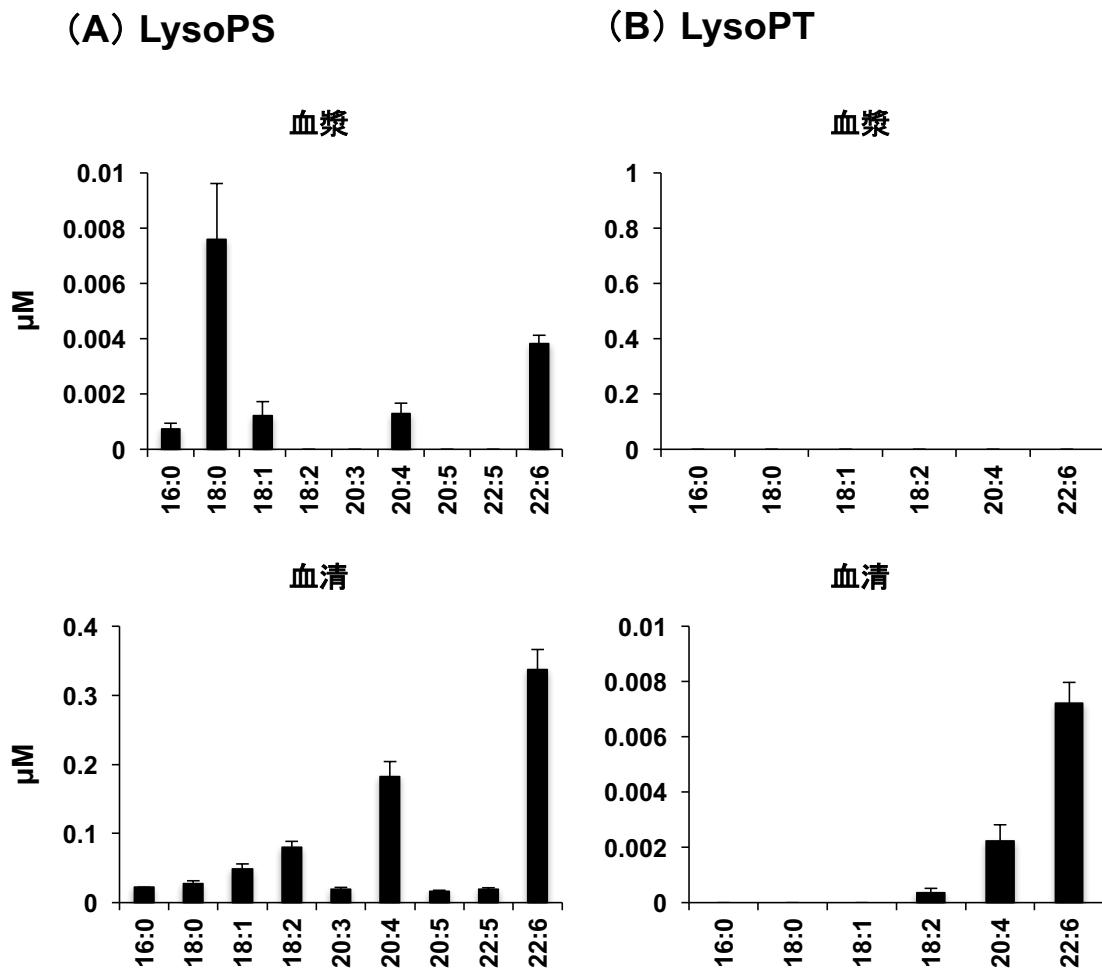


Fig. 13 血漿中および血清中のLysoPS(A)・LysoPT(B)量

(A) 血漿・血清中の LysoPS。血漿中では(18:0)、(22:6)の順で多く、総量は約 10 nM であった。一方、血清中では(22:6),(20:4)が多く、総量は約 750 nM であった。

(B) 血漿・血清中の LysoPT。血漿中の LysoPT は検出できなかった。血清中においては LysoPS と同様に(22:6),(20:4)が多く、総量は約 10 nM であった。

## ②-2：考察

- LysoPS と LysoPT の量比に関して

今回の結果からマウス体内において LysoPS は LysoPT より約 200 倍多く存在することが分かった。一方、マスト細胞活性化作用においては LysoPT は LysoPS より 10-20 倍高いことが分かっている。従って、存在量とマスト細胞活性化能のみで比較すると生体内におけるマスト細胞への作用は LysoPS の方が強いと考えられる。

ここで LysoPS および LysoPT の産生系について言及する。LysoPS と LysoPT の臓器分布が極めて類似していたことから、産生経路も類似していることが示唆される。1. 研究背景で述べたように LysoPS の産生に関する分子として PS の sn-1 位の脂肪酸を切断する PS-PLA<sub>1</sub> が想定されている (Fig.2, Ref. 8-12)。またセリン特異的ではないが PS の sn-2 位の脂肪酸を切断する PLA<sub>2</sub> の存在も示唆されている。一方、LysoPT に関しては産生酵素は未知であるが、LysoPS と同様にホスファチジルスレオニン (Phosphatidylthreonine : PT) から PLA<sub>1</sub> または PLA<sub>2</sub> により脂肪酸が切断されて産生される経路が想定される。

次に LysoPS・LysoPT の前駆体と考えられる PS・PT に関する知見を紹介する。まず PS は通常形質膜（脂質二重層）の内側に偏って存在するが、活性化血小板 (Ref. 23) やアポトーシス細胞 (Ref. 24) においては外側に露出することが知られている。一方 PT はこれまでラットの脳 (Ref. 25)、海馬神経細胞 (Ref. 26)、トキソプラズマ原虫の小胞体 (Ref. 27) に存在することが報告されている。海馬神経細胞をセリン欠乏培地で培養すると、PS の代わりに PT が増加することが分かっている (Ref. 26)。セリンは非必須アミノ酸であり、スレオニンは必須アミノ酸であるため、何らかの理由によりセリンを合成できない状態になると、スレオニンが代わりに利用されて

PT が増加すると考えられる。従ってこのような状況下においては LysoPS の代わりに LysoPT が産生され、機能する可能性がある。

- ・ 血漿中の血清中の LysoPS 量および分子種の違いに関して

興味深いことに血漿と血清では LysoPS の総量および脂肪酸分子種が大きく異なることが分かった。血漿と血清は採血後の処理が大きく異なる。血漿は採血後、血液を即座に遠心して上清を回収するのに対して、血清は血液を 37°Cで 1 hr 加温する。この間に血液凝固反応が進行する。上で述べたように活性化血小板は PS を膜の外側に露出させることができ、この PS を基質として血中の PLA により LysoPS が産生された可能性が高い。リゾリン脂質においては (16:0)、(18:0) などの飽和脂肪酸は *sn*-1 位に、(20:4)、(22:6) などの高度不飽和脂肪酸は *sn*-2 位に結合していることが分かっており、それぞれ 1-acyl 型、2-acyl 型 (Fig. 2) と呼ばれる。血清中には不飽和脂肪酸を有する LysoPS が多く存在することから、PLA<sub>1</sub> による 2-acyl 型 LysoPS の産生が行われていることが示唆される。

### ③ 病態モデルマウスにおける LysoPS 量の変動の解析

#### ③-1：創傷モデルにおける結果と考察

**Fig. 14** に創傷部浸出液中の経時的な LysoPS 量の変化 (A) および分子種の分布 (B) を示す。

創傷直後は浸出液中に LysoPS はほとんど検出されないが、創傷後 1 hr で LysoPS が検出され、4 hr まで増加し続けることが分かった。PBS で浸出液が希釈されていることを考慮すると、浸出液中には  $\mu\text{M}$  レベルの LysoPS が存在していると考えられる。また (18:2)、(20:4)、(22:5)、(22:6) などの不飽和脂肪酸結合型 LysoPS が豊富に含まれることが分かった。

一般に創傷モデルにおいては、創傷部で血小板が活性化し血液凝固が誘導されることが知られている。従って血清と同様に PS の供給源として活性化血小板が考えられる。一方、血清ではほとんど検出されなかった LysoPS (22:5) が浸出液中で高濃度に検出されたことから、活性化血小板以外の PS 供給細胞の存在も示唆される。

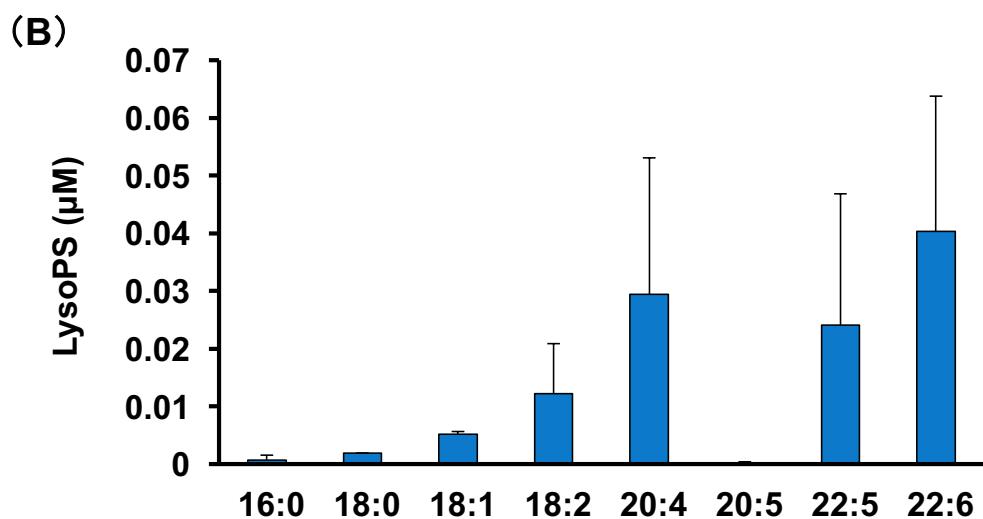
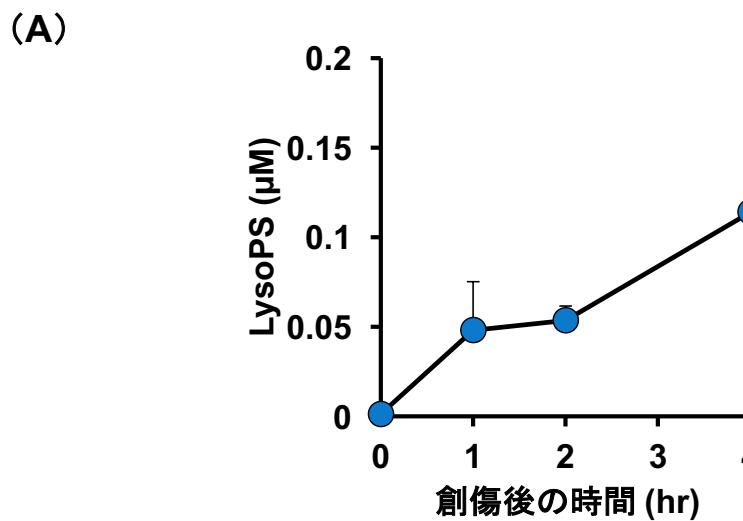


Fig. 14 創傷部浸出液中に LysoPS が検出される

(A) マウスに創傷を誘導し、0, 1, 2, 4 hr 後の浸出液中の LysoPS を測定した。創傷後 4 hr まで LysoPS は増加し、濃度は約 100 nM であった。

(B) 4 hr 後の LysoPS 分子種。浸出液中には不飽和脂肪酸結合型の LysoPS が多く検出された。

### ③-2：カゼイン誘発性腹膜炎モデルにおける結果と考察

**Fig. 15** に腹膜炎誘発後の腹腔洗浄液中の LysoPS 量の変化 (A) および分子種の分布 (B) を示す。炎症誘発前の腹腔内にはほとんど LysoPS が検出されないが、炎症誘発後 16 hr をピークとして LysoPS の増加が見られた。またピーク時の LysoPS 分子種は (18:0)、(18:1) が主であり、(18:2)、(20:4)、(22:6) などの不飽和脂肪酸結合型 LysoPS も存在することが分かった。

カゼイン誘発性腹膜炎モデルでは、カゼインを抗原としてマスト細胞や好中球が活性化し、腹腔内に炎症が惹起される。PS 供給細胞の同定には更なる解析が必要であるが、LysoPS (18:0) が豊富に検出されることから PLA<sub>2</sub> が主に寄与していることが示唆される。

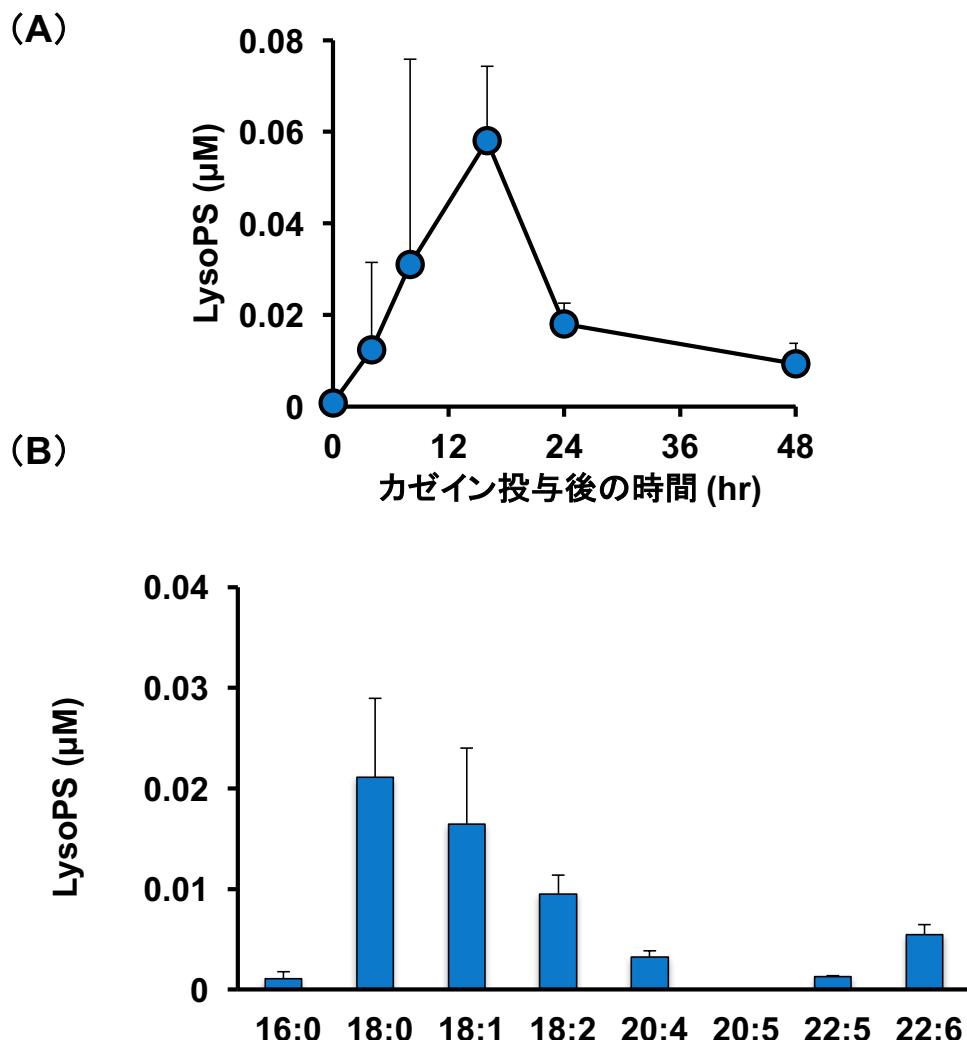


Fig. 15 腹膜炎の腹腔洗浄液中に LysoPS が検出される

(A) マウスに腹膜炎を誘導し、0, 4, 8, 16, 24, 48 hr 後の腹腔洗浄液中の LysoPS を測定した。炎症誘導後 16 hr をピークとして LysoPS は増加し、最高濃度は約 60 nM であった。

(B) 16 hr 後の LysoPS 分子種。(18:1)が最も多いが、(18:2)、(22:6)なども検出された。

### ③-3 : Con A 誘発性肝炎モデルにおける結果と考察

**Fig. 16** に肝炎誘発後の血漿中の LysoPS 量の変化 (A) および分子種の分布 (B) を示す。通常時の血漿中 LysoPS 量は約 20 nM であるのに対して、肝炎発症後 6 hr をピークとして LysoPS 量の増加が見られ、総量は約 400 nM であることが分かった。また脂肪酸分子種は (18:0)、(22:6)、(20:4) など飽和・不飽和両方とも豊富に存在することが分かった。

次に **Fig. 16C** に肝傷害によって生じる肝壞死部の LysoPS 量および分子種を示す。肝壞死部では正常部の約 10 倍量の LysoPS が検出され、総量は血液量換算 (臓器 (g) / 血液 (mL) = 1 とみなす) すると約 20 μM であった。脂肪酸分子種は血漿中と同様に飽和・不飽和両方とも存在するが、血漿中と比較すると LysoPS (18:0) の割合が高いことが分かった。

この結果から、肝炎時においては炎症局所 (肝臓) で極めて高濃度の LysoPS が産生されることが示唆された。また肝臓と血漿中で脂肪酸の分子種が異なることから、不飽和脂肪酸結合型 LysoPS の Source が肝臓以外にも存在する可能性がある。

Con A は T 細胞のマイトジエンであり、マウスに投与すると抗原非特異的に活性化した T 細胞が臓器を傷害し、特に肝臓で重篤な肝炎を発症する。肝壞死部においては肝細胞や炎症細胞のアポトーシスが起こっており、これらアポトーシス細胞由来の PS が基質となり LysoPS が産生されている可能性がある。また、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸両方の LysoPS が検出されたことから、LysoPS の产生には PLA<sub>1</sub>、PLA<sub>2</sub> の両方が関与していると考えられる。

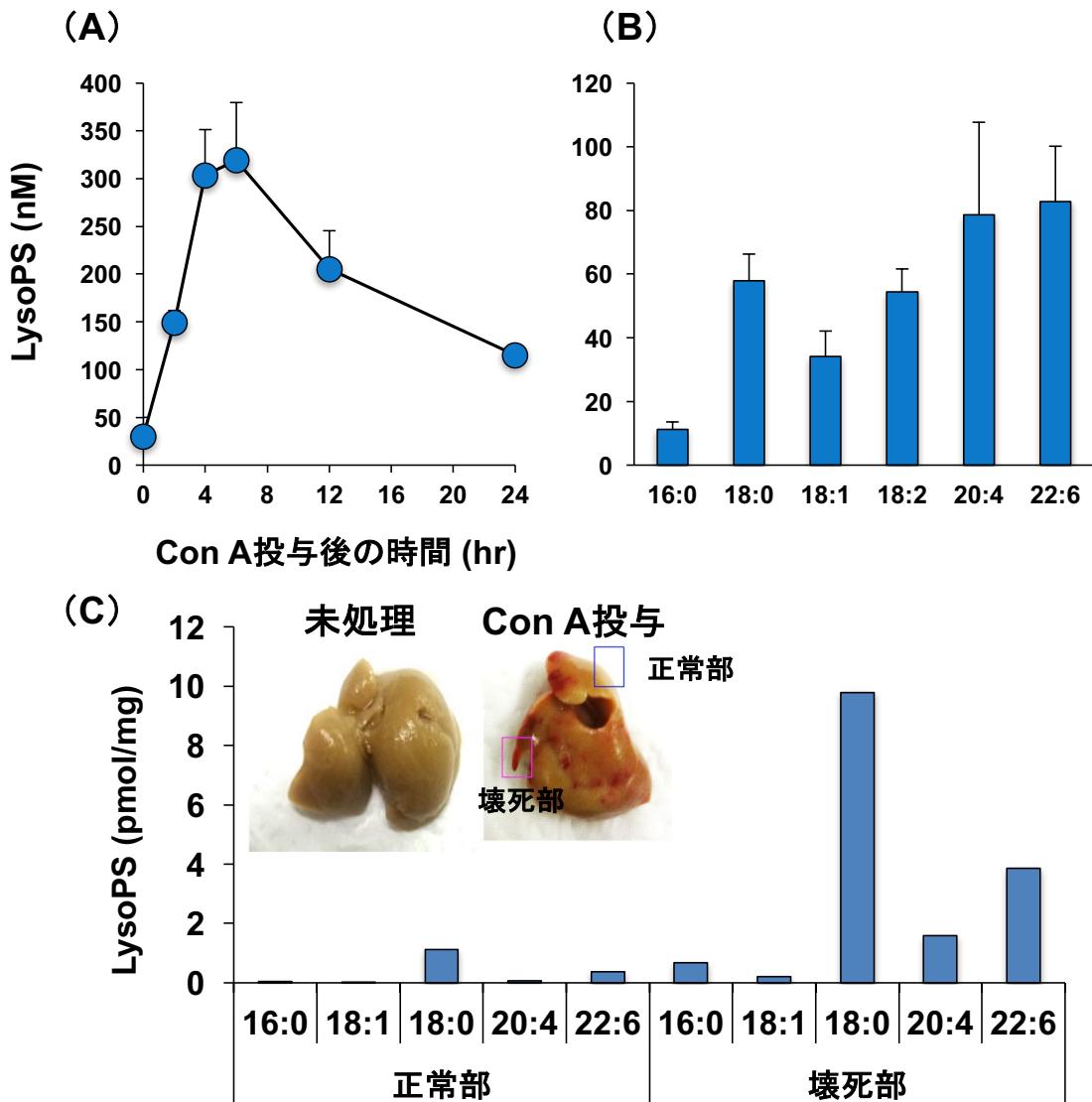


Fig. 16 肝炎の血漿および肝壞死部に LysoPS が検出される

(A) マウスに肝炎を誘導し、0, 2, 4, 6, 12, 24 hr 後の血漿中の LysoPS を測定した。炎症誘導後 6 hr をピークとして LysoPS は増加し、最高濃度は約 300 nM であった。

(B) 6 hr 後の LysoPS 分子種。さまざまな脂肪酸分子種が検出された。

(C) 肝臓の正常部と壞死部の LysoPS を測定した。壞死部では約 10 倍量の LysoPS が検出された。

## 2.4 まとめと今後の展望

### ① LysoPT に関して

本研究により、これまで LysoPS の有機合成誘導体であると考えられていた LysoPT が生体内に存在することが初めて明らかになった。LysoPT に関しては産生機構も受容体も全く未知であるが、本定量系が LysoPT の生体内での機能や産生酵素、受容体を解明する上で強力な手助けとなることを期待したい。

### ② 病態時における LysoPS に関して

創傷モデル、腹膜炎モデル、肝炎モデルを用いた解析から、炎症反応において LysoPS が増加することが初めて明らかになった。LysoPS は活性化血小板やアポトーシス細胞由来の PS を基質として、PLA<sub>1</sub> または PLA<sub>2</sub> により産生されると考えられる (Fig. 17)。脂肪酸分子種の詳細な解析により、今後産生酵素の同定が期待される。

当研究室では LysoPS 関連分子として、PS-PLA<sub>1</sub>、GPR34、P2Y10、GPR174 の KO マウスを作製し解析を進めている。以下、後輩である鈴木健介修士、根本祥李修士とともに行った研究結果について述べる (Table 1)。まず PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスを用いた LysoPS 量の解析から、

- (1) 血清中の不飽和脂肪酸 LysoPS は PS-PLA<sub>1</sub> よって産生される (Fig. 18A)
- (2) 創傷部浸出液中、カゼイン腹膜炎腹腔洗浄液中の不飽和脂肪酸 LysoPS は PS-PLA<sub>1</sub> によって産生される (Fig. 18B, C)
- (3) Con A 肝炎マウスの血漿中の LysoPS の一部は PS-PLA<sub>1</sub> によって産生される (鈴木修論)

ことが明らかとなった。

また PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスの表現型解析から、

- (1) 創傷モデルにおいて PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスと野生型 (Wild Type : WT) マウスで創傷治癒の時間に大きな差はなかった
- (2) カゼイン腹膜炎において PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスは WT マウスに比べて、脱顆粒しているマスト細胞の割合が少ない (Ref. 22)
- (3) Con A 肝炎において PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスは WT マウスに比べて肝炎の発症が抑制される傾向がある ([鈴木修論](#))

ことが分かっている。以上の結果から、PS-PLA<sub>1</sub> が LysoPS 産生酵素として機能していることが証明されたが、産生された LysoPS がどのような機能を発揮しているかについてはさらなる解析が必要である。

次に GPR34、P2Y10、GPR174 KO マウスを用いた表現型解析から、P2Y10 KO マウスにおいて肝炎の発症が約 5 割抑制されることが分かった。GPR34、GPR174 KO マウスでは肝炎の発症に差は見られなかった ([鈴木修論](#))。P2Y10 は T 細胞活性化により発現上昇することが分かっており、LysoPS が P2Y10 を介して活性化 T 細胞の機能を抑制することで、肝炎の発症を抑制している可能性が示唆される。今後、肝炎発症時の活性化 T 細胞の数や炎症性サイトカイン量の測定などの解析が必要である。

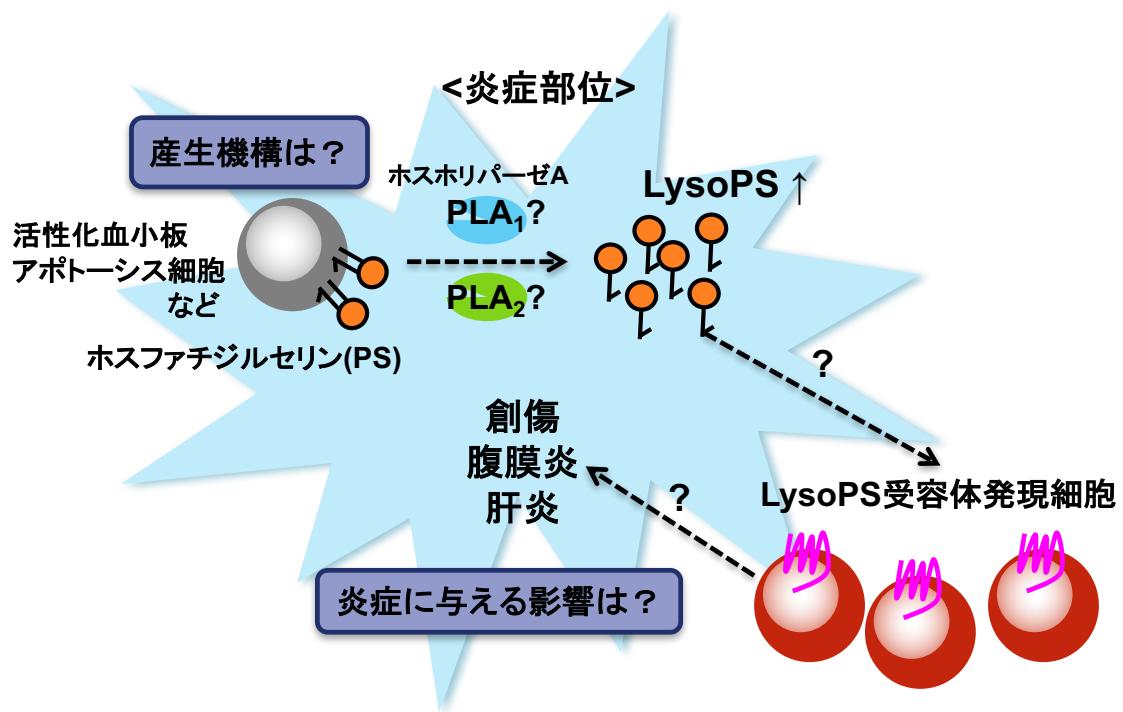


Fig. 17 LysoPS は活性化血小板やアポトーシス細胞由来の PS を基質として PLA<sub>1</sub> または PLA<sub>2</sub> により產生される?

### (A)創傷モデル

分子	KO マウスの表現型
PS-PLA <sub>1</sub>	浸出液中の LysoPS 量の減少
GPR34	未解析
P2Y10	未解析
GPR174	未解析

### (B)カゼイン腹膜炎モデル

分子	KO マウスの表現型
PS-PLA <sub>1</sub>	腹腔中の LysoPS 量の減少。 脱顆粒しているマスト細胞数の減少。
GPR34	未解析
P2Y10	未解析
GPR174	未解析

### (C)Con A 肝炎モデル

分子	KO マウスの表現型
PS-PLA <sub>1</sub>	血漿中の LysoPS 量の減少。 肝炎の発症が抑制される傾向。
GPR34	肝炎の発症に WT との差はなし。
P2Y10	WT に比べて肝炎が悪化する。
GPR174	肝炎の発症に WT との差はなし。

Table 1 LysoPS 関連分子の KO マウスの解析結果

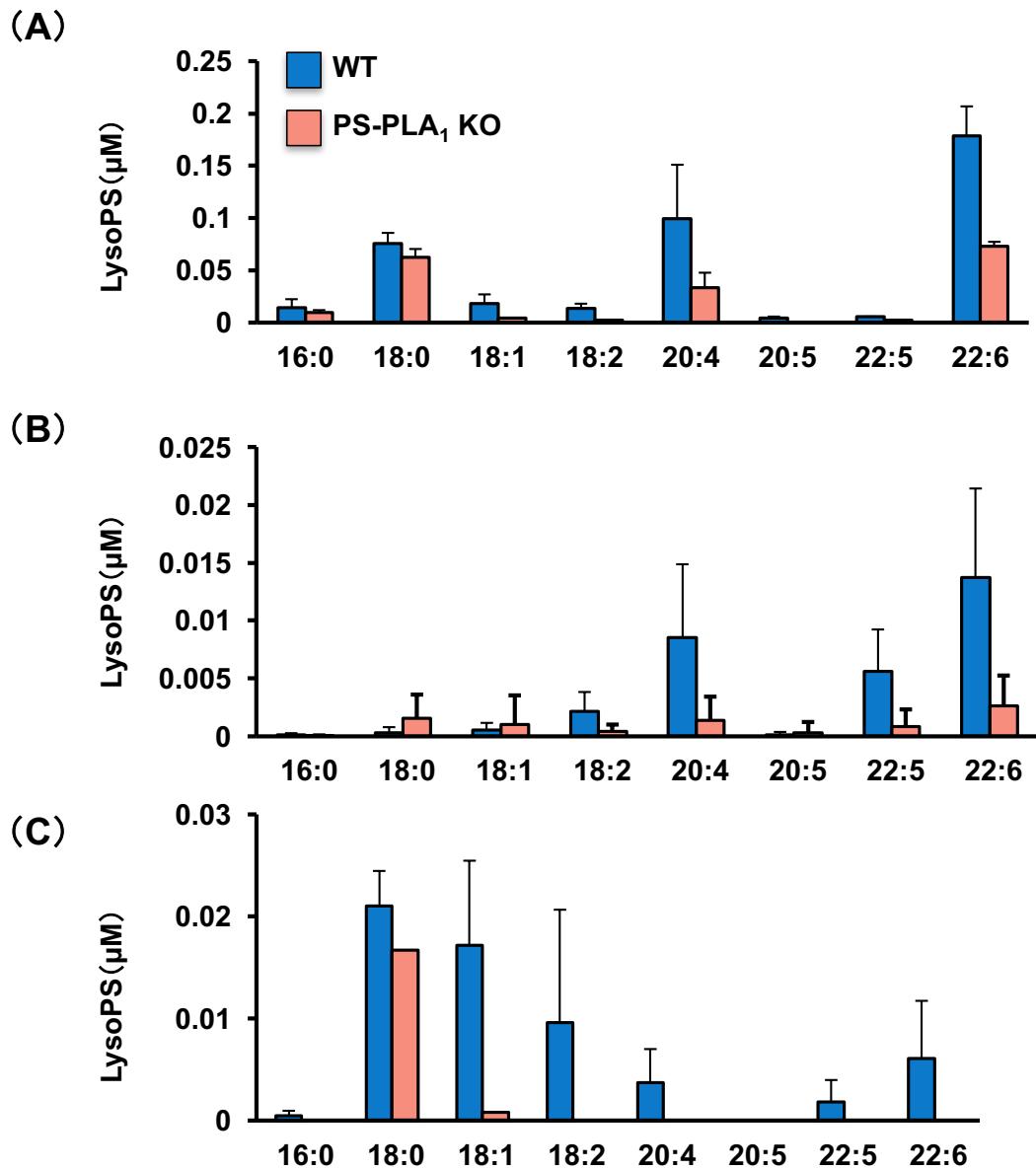


Fig. 18 PS-PLA<sub>1</sub> KO マウスの LysoPS 量

PS-PLA<sub>1</sub> KOマウスの血清中(A)、創傷部浸出液中(B)、カゼイン腹膜炎腹腔洗浄液中(C)の LysoPS を測定した。KO マウスではいずれも WT に比べて不飽和脂肪酸結合型 LysoPS の顕著な減少が見られた。

### 3. LysoPS 受容体の機能解析

#### 3.1 研究の背景と目的

現在 LysoPS に特異的な応答性を示す受容体として GPR34、P2Y10、A630033H20Rik（ヒトでは偽遺伝子）、GPR174 の 4 つ GPCR (**Fig. 3**) が同定されており、当研究室で解析を進めている。

まず、mRNA の発現解析から以下のことことが分かっている (**Fig. 19**)。

- (1) GPR34 は全身性に発現が見られ特に脾臓で発現が高い
- (2) P2Y10 および GPR174 は脾臓、胸腺、リンパ節などの免疫系組織に限局して発現が高い

次に、*in vitro* の解析から以下のことことが分かっている。

- (1) LysoPS は GPR34 を介して細胞遊走を促進する (Ref. 14)
- (2) LysoPS は P2Y10 を介して活性化 T 細胞の接着・増殖を抑制する (**Fig. 20**) (Ref. 16)
- (3) LysoPS は GPR174 を介して活性化 T 細胞のインターロイキン 2 (interleukin-2 : IL-2) 産生を抑制する (Ref. 16)

私は当研究室で同定した P2Y10 および GPR174 に着目し、生体内における LysoPS-P2Y10/GPR174 シグナルの役割を明らかにしたいと考えた。上記の解析結果から、生体内において LysoPS が P2Y10 および GPR174 を介して活性化 T 細胞の増殖やサイトカイン産生を抑制している可能性が示唆される。P2Y10 KO マウスおよび GPR174 KO マウスは健常時には異常を示さないことが分かれている。そこで本研究では P2Y10 KO マウス、GPR174 KO マウスに T 細胞が関与する病態を誘導し、表現型解析を行うこととした。

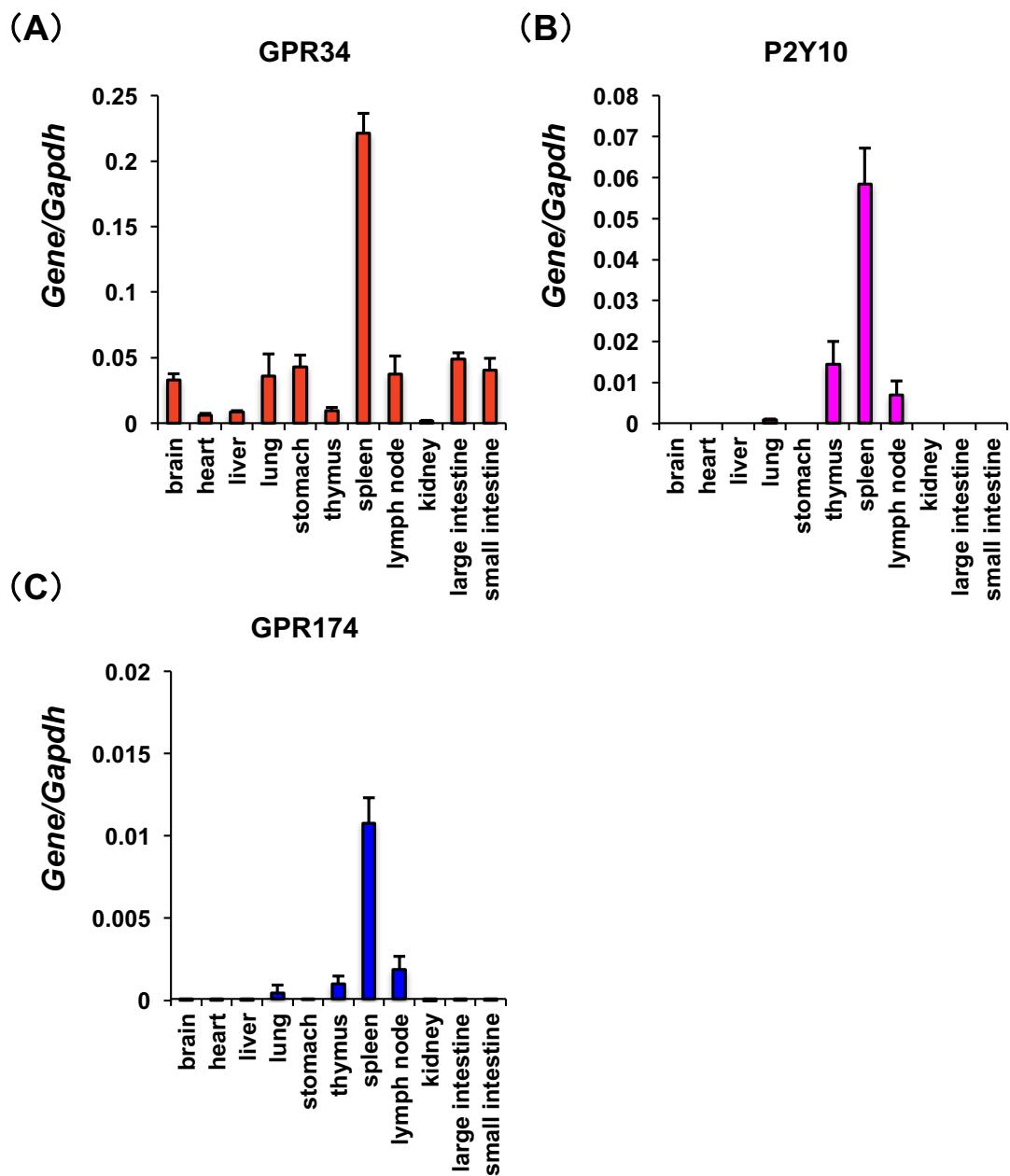


Fig. 19 LysoPS 受容体の mRNA の発現解析

- (A) GPR34は全身性に発現が見られ、特に脾臓で発現が高い
- (B) P2Y10、(C)GPR174 は免疫系組織に限局して発現が高い

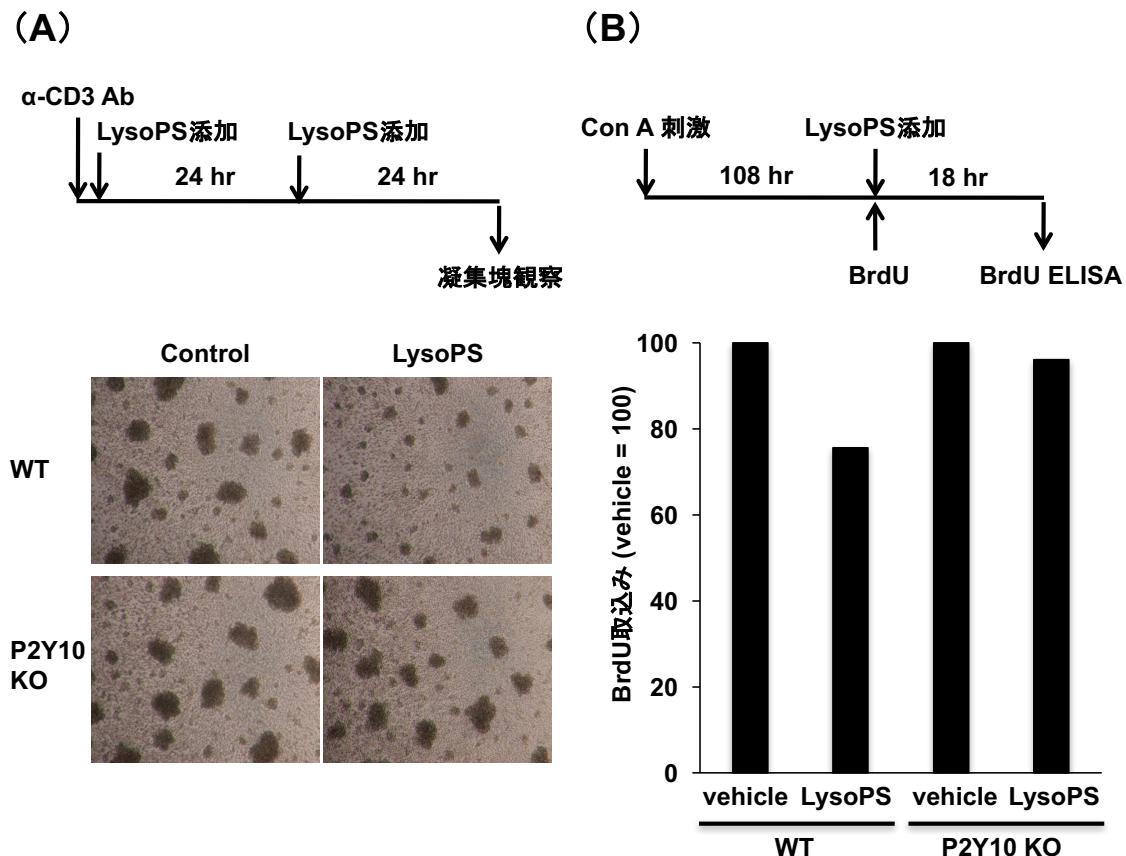


Fig. 20 P2Y10 は *in vitro* で T 細胞の増殖・接着を抑制する

(A) 単離 T 細胞を anti-CD3 抗体で刺激し、24 hr 毎に培地に Lysophosphatidylserine (LysoPS) を添加して、48 hr 後の凝集塊の形成を観察した。WT 由来の T 細胞では、LysoPS により凝集塊の形成が抑制されるのに対して、P2Y10 KO 由来の T 細胞では LysoPS の効果は見られなかった。

(B) 単離 T 細胞を Con A で刺激し、108 hr 後に培地に Lysophosphatidylserine (LysoPS) を添加して、さらに 18 hr 後の BrdU の取り込みを ELISA にて測定した。WT 由来の T 細胞では、LysoPS により BrdU の取り込みが抑制されるのに対して、P2Y10 KO 由来の T 細胞では LysoPS の効果は見られなかった。

病態モデルとして自己免疫性リンパ球異常増殖症（Autoimmune Lympho-Proliferative Syndrome: ALPS）モデルの解析を行った（Fig. 21）。ALPS はアポトーシス経路の異常にによりリンパ球の異常増殖をきたし、リンパ節腫脹や肝脾腫、腎炎・皮膚炎・血管炎などの自己免疫疾患を示す症候群である（Ref. 28, 29）。通常、リンパ球の分化の過程で自己成分に反応するリンパ球はアポトーシスにより除去される必要がある。ALPS ではアポトーシス異常ににより自己反応性 T 細胞、自己反応性 B 細胞が除去されず、それらの細胞が自己細胞を攻撃することで多様な自己免疫疾患を発症する。ヒトでは先天的なアポトーシス関連分子（Fas、FasL、Caspase10 など）の欠損により ALPS を発症することが分かっている（Ref. 30, 31）。またマウス ALPS モデルも存在し、Fas 遺伝子にトランスポゾンが挿入された  $Fas^{lpr/lpr}$  マウス（以下 lpr マウスとする）が広く用いられている（lpr : lymphoproliferation の略）（Ref. 32, 33）。

lpr マウスを用いるメリットとしては、ヒトとマウスの病態が極めて類似していること、自然発症であるため抗原の免疫などの手技が必要ないこと、広く用いられているマウスであるため評価方法が確立していることなどが上げられる。一方でデメリットとしては、lpr マウスが MRL 系統であるため KO マウス（BL/6 系統）との 7~8 回のバッククロスが必要であること、ALPS 症状を発現するまでに数ヶ月かかること、個体差が大きいことが上げられる。

本研究では P2Y10 KO マウス、GPR174 KO マウスと lpr マウスをそれぞれ交配して P2Y10 KO-lpr マウス、GP174 KO-lpr マウスを作製し、表現型解析を行った。

最後に、*in vivo*において LysoPS が P2Y10 および GPR174 を活性化しうるのかどうかを調べるために、当研究室で保有している P2Y10 アゴニストを用いて lpr マウスにおける薬理的作用の評価を行った。

### ALPS(自己免疫性リンパ球異常増殖症)

- ・アポトーシスの障害によりリンパ球の増殖を示し、脾腫・リンパ節腫脹が起こり、自己免疫疾患を合併する症候群
- ・アポトーシス経路に関わる Fas、FasL、Caspase10 の遺伝子異常が原因として挙げられる
- ・疫学は不明であり、世界で 400 例ほど報告されている
- ・自己免疫異常の結果として、血球減少症、腎炎、肝炎、関節炎などを合併することがある



### MRL 系統 $Fas^{lpr/lpr}$ マウス(本論文中では lpr マウスとする)

- ・Fas 遺伝子へのトランスポゾンの挿入により、Fas の転写異常が起こる
- ・12 週齢ごろからリンパ球の異常増殖を呈し、腎炎、皮膚炎など自己免疫疾患を自然発症する

Fig. 21 自己免疫性リンパ球異常増殖症(ALPS)と lpr マウス

### 3.2 実験方法

#### ① P2Y10 KO-lpr マウス、GPR174 KO-lpr マウスの作製

P2Y10 KO マウスおよび GPR174 KO マウスは TIGM から 129/SvJ 系統で購入し、C57BL6 系統にバッククロスしたものを既に飼育していた。Lpr マウスは MRL 系統であったため Fig. 22 のように 7~8 回交配を繰り返し、MRL 系統 P2Y10 KO-lpr マウスおよび MRL 系統 GPR174 KO-lpr マウスを作製した。

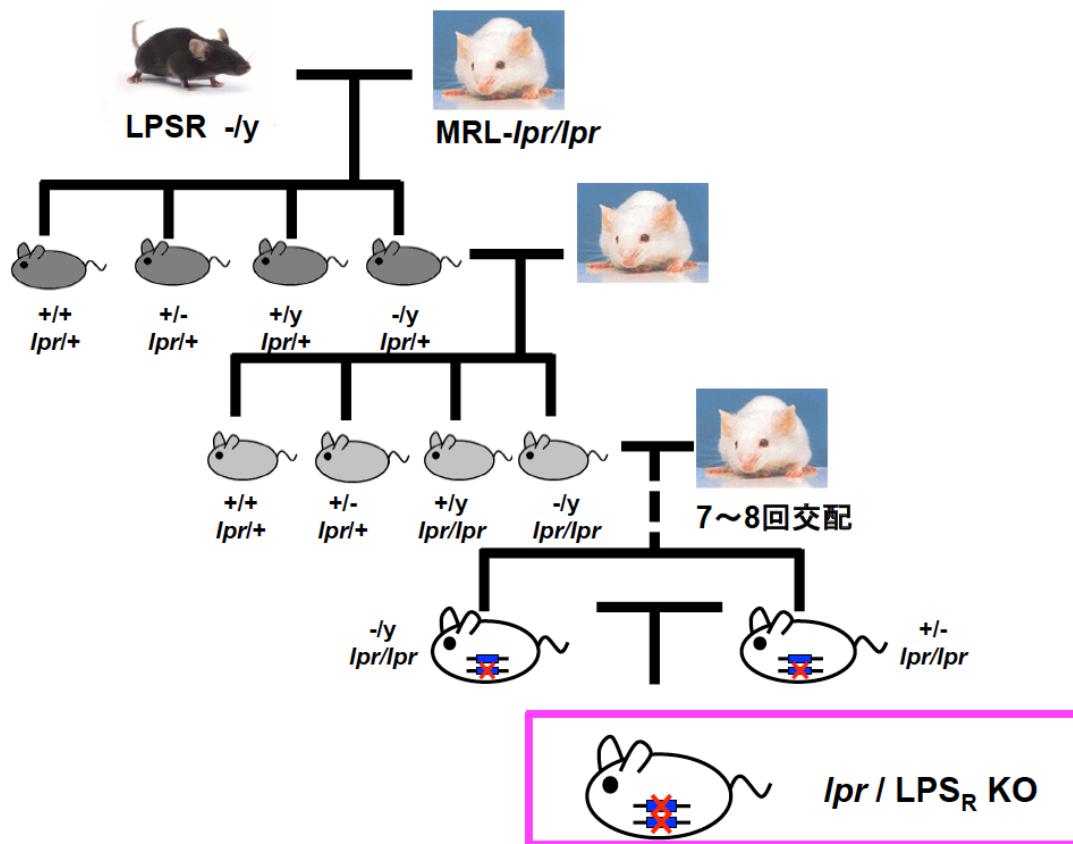


Fig. 22 LysoPS 受容体 KO – lpr マウスの作製

LysoPS 受容体 KO マウスは C57BL6 系統、lpr マウスは MRL 系統であったため、KO マウスを MRL 系統へ戻し交配を行う必要がある。一般的に 7~8 回の戻し交配が必要とされる。

マウスの genotype は tail から抽出した genome DNA を用い PCR 反応により確認した。マウス tail (1~2 mm) を 50 mM NaOH で溶解した後、1/10 量の 1M Tris Buffer (pH8) で中和し PCR 反応の template とした。PCR 反応液の組成は以下のとおりである。

2.5 mM dNTP	1.6 μL
10xPCR buffer	2 μL
100 μM primer	fwd, rev 各 0.1 μL ずつ
Taq polymerase	0.2 μL
MQ	15 μL
template	1 μL

#### [P2Y10]

WT fwd : 5'- gagtctctacttattgatc

WT rev : 5'- ggcacacctgaaaggctaatg

KO fwd : 5'- gcagcgcatgcgcctctatc

KO rev : 5'- gaacttaaattgggacttg

Cycling Steps①	94°C	15sec		10cycle
	65°C	30sec	decrease 1°C	
	72°C	40sec		
Cycling Steps②	94°C	15sec		30cycle
	55°C	30sec		
	72°C	40sec		
Cooling Step	10°C	∞		

[GPR174 の genotyping primer]

WT fwd : 5'- ggtttctcatgtacccttgc

WT rev : 5'- ggcgtttctgaactcatt

KO fwd : 5'- gcagcgcatgcgcctatc

KO rev : 5'- ccaacattaccgcatggaca

Initial Denaturation Step	94°C	4min		
Cycling Steps①	94°C	15sec		10cycle
	65°C	30sec	decrease 1°C	
	72°C	30sec		
Cycling Steps②	94°C	15sec		30cycle
	55°C	30sec		
	72°C	30sec		
Cooling Step	10°C	∞		

## ② KO-lpr マウスの表現型解析

### ②-1：血中リンパ球数の測定

50 mM EDTA 20  $\mu\text{L}$  を通したノンコート採血管 Hamatokrit-Kapillaren (HIRSCHMANN) を用いて、眼底から約 200  $\mu\text{L}$  の血液を採取した。採血後速やかに攪拌し、室温で 5 分間静置した後、自動血球計測装置 VetScan HM2 (ABAXIS) により測定を行った。

### ②-2：臓器重量の測定

24-26 週齢のマウスから脾臓、胸腺、腸間膜リンパ節を採取し重量計により測定を行った。

### ②-3：リンパ球ポピュレーションの解析

ポピュレーション解析はフローサイトメーターを用いて行った。24-26 週齢のマウスから脾臓および腸間膜リンパ節を摘出した後、PBS で wash し、メッシュサイズ 70  $\mu\text{m}$  の Cell Strainer (BD) 上で 1mL シリンジ (TERUMO) を用いて押しつぶして細胞を採取した。採取した細胞を遠心 ( $300 \times g$ , 4°C, 5 min) した後、溶血 Buffer (0.16M NH4Cl, 0.17M Tris, MQ, pH7.2) に細胞を懸濁して溶血処理を行った。再び遠心し、PBS に再懸濁して  $1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$  の細胞液を調製した。

細胞液 100  $\mu\text{L}$  を V 底 96 well plate (WATSON) に移し遠心した後、下に記す表面抗原抗体を含む FACS Buffer (5% (w/v) BSA-PBS, 500 mM EDTA (pH8.0)) に懸濁し、4°Cで 10 min 染色した。その後、FACS Buffer 100 $\mu\text{L}$  を添加して遠心し、FACS Buffer 200  $\mu\text{L}$  に再懸濁して Cellanalyzer EC800 (SONY) にて FCM 解析を行った。

抗体	clone	終濃度	購入元
anti-CD3 FITC	145-2C11	0.2 µg/mL	eBioscience
anti-B220 PC7	RA3-6B2	0.25 µg/mL	eBioscience
anti-CD4 APC	GK1.5	0.25 µg/mL	eBioscience
anti-CD8 PE	53-6.7	0.03 µg/mL	eBioscience

### ③ P2Y10 アゴニストの治療効果の評価

P2Y10 アゴニストである deoxy LysoPS は東京大学薬学研究科薬化学教室 大和田智彦教授から供与いただいた。クリーンベンチ内で deoxy LysoPS を 3% mouse serum (lpr マウスから採取) を含む PBS に溶解し 10 mM の溶液を調製した。なお deoxy LysoPS は mouse serum 中で速やかに分解されてしまうため、調製は投与直前に行った。10 mM deoxy LysoPS 溶液を 1 日 2 回（朝 8-9 時および夜 8-9 時）、1 回 200 µL 皮下投与し、これを 12 週齢から 21 週齢まで 9 週間続けた。Vehicle として 3% mouse serum-PBS を投与した。

### 3.3 結果と考察

#### ① P2Y10 KO-lpr マウスおよび GPR174 KO-lpr マウスの表現型解析

**Fig. 23** に各週齢における P2Y10 KO-lpr マウスおよび GPR174 KO-lpr マウスの血中リンパ球数を示す。まず、それぞれの litter mate (WT-lpr マウス) は 16 週齢頃から血中リンパ球数の増加が見られ、24 週齢まで増加する。一方、P2Y10 KO-lpr マウスおよび GPR174 KO-lpr マウスは WT に比べてリンパ球数がさらに増加することが分かった。特に P2Y10 KO-lpr マウスは WT-lpr マウスに比べて約 2 倍増加していることが明らかとなった。

**Fig. 24** に 24-26 週齢における脾臓および腸間膜リンパ節の重量を示す。P2Y10 KO-lpr マウスおよび GPR174 KO-lpr マウスは WT-lpr マウスに比べて、リンパ組織が肥大していることが分かった。

次に、リンパ組織の肥大化がリンパ球ポピュレーションの変動と関係があるのか FCM を用いて解析を行った。リンパ球は大きく B 細胞と T 細胞に分類され、T 細胞はさらに CD4 陽性または CD8 陽性に分類される。ALPS 患者および lpr マウスでは、上記のリンパ球に加えてダブルネガティブ T 細胞 (Double Negative T cell : DNT) と呼ばれる異常リンパ球集団が蓄積することが知られている。DNT 細胞の表面抗原染色では CD3 陽性 B220 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性と定義される。**Fig.25** に示すように T 細胞マーカーである CD3 および B 細胞マーカーである B220 で展開した際の両陽性群をさらに CD4 および CD8 で展開したときの両陰性群が DNT 細胞である。P2Y10 KO-lpr マウスおよび GPR174 KO-lpr マウスの FCM 解析の結果を **Fig. 26** に示す。解析の結果、P2Y10 KO-lpr マウスおよび GPR174 KO-lpr マウスでは DNT 細胞の数が WT-lpr マウスよりも 2-3 倍多いことが分かった。一方で、B 細胞、CD4T 細胞、CD8T 細胞については KO-lpr マウスと WT-lpr マウスで差は見られなかった。最後に lpr マウスで見られる他の自己免疫疾患症状のうち、腎炎の指標とされ

ている抗核抗体、血中クレアチニン、血中 BUN、尿タンパク量の測定も行ったが、いずれの項目においても KO-Ipr マウスと WT-Ipr マウスで差は見られなかつた。また、2 で報告した LysoPS 定量系を用いて Ipr マウスの血中 LysoPS 量の測定を行ったが、どの週齢においても血中 LysoPS 量の増加は認められなかつた (Fig. 27)。

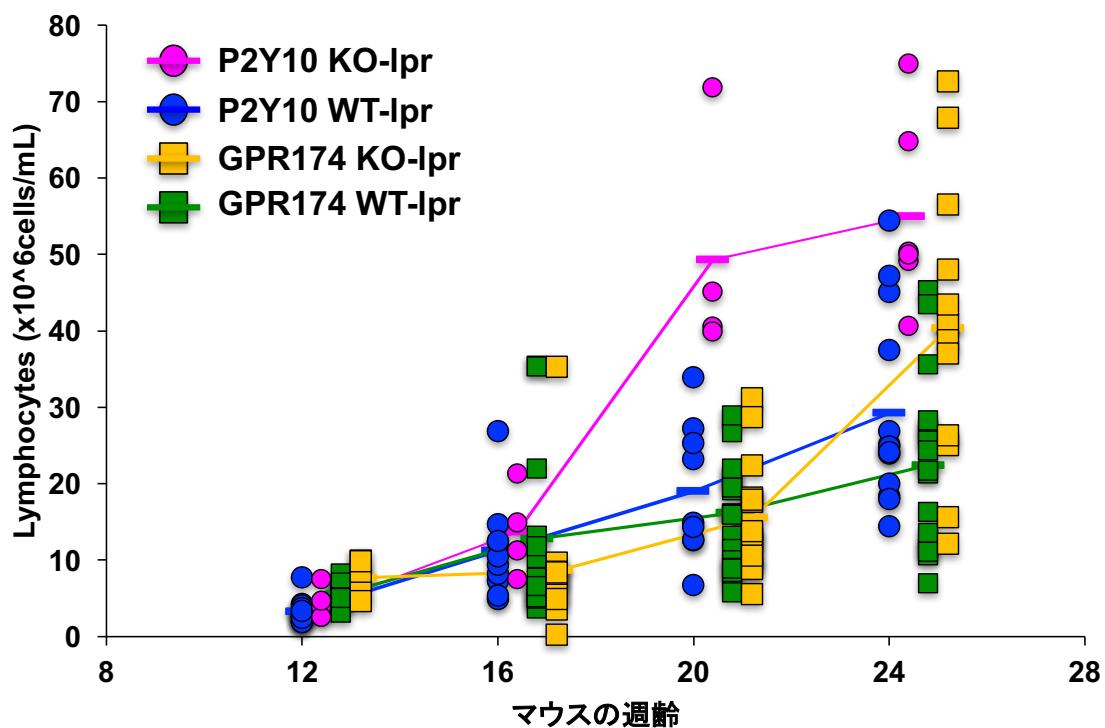
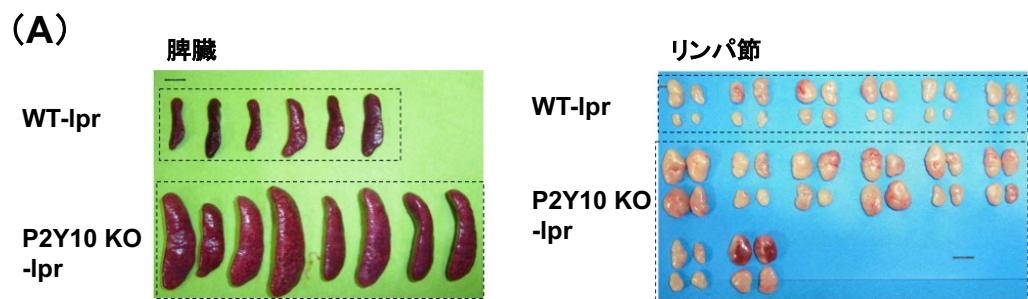
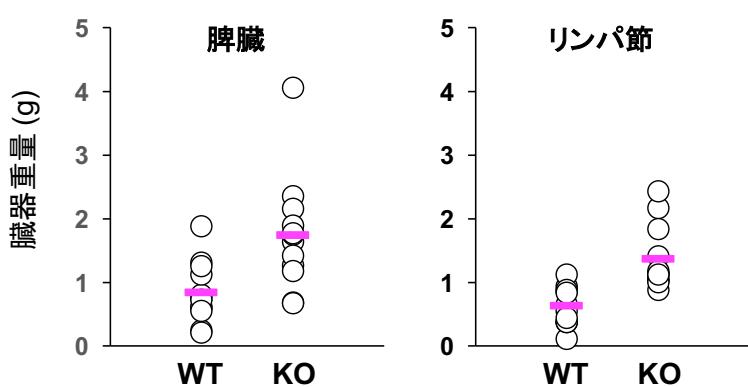


Fig. 23 P2Y10 KO-Ipr · GPR174 KO-Ipr マウスの血中リンパ球数

各週齢における血中リンパ球数を測定した。Litter mate の WT-Ipr マウスでも、16 週齢頃からリンパ球数の増加が見られるが、P2Y10 KO-Ipr マウスでは 20 週齢で、GPR174 KO-Ipr マウスでは 24 週齢で WT-Ipr マウスに比べてリンパ球数の更なる増加が見られる。



(B) P2Y10 KO-Ipr



(C) GPR174 KO-Ipr

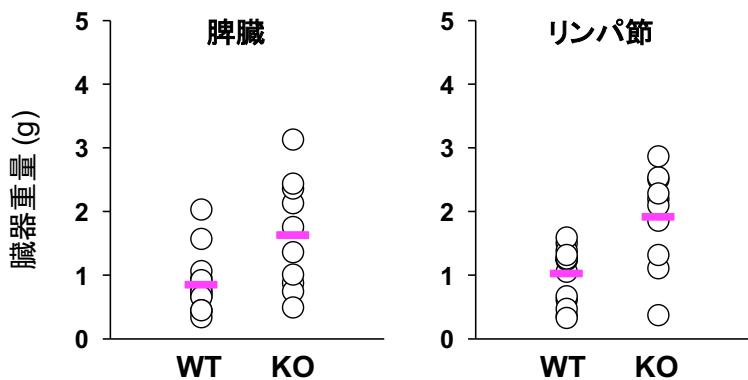


Fig. 24 P2Y10 KO-Ipr · GPR174 KO-Ipr マウスの脾臓・リンパ節重量

(A) P2Y10 KO-Ipr マウスの脾臓、リンパ節の写真。  
 (B) P2Y10 KO-Ipr マウス、(C) GPR174 KO-Ipr マウスの脾臓、リンパ節重量。WT-Ipr と比較して約 2 倍の肥大化が見られた。

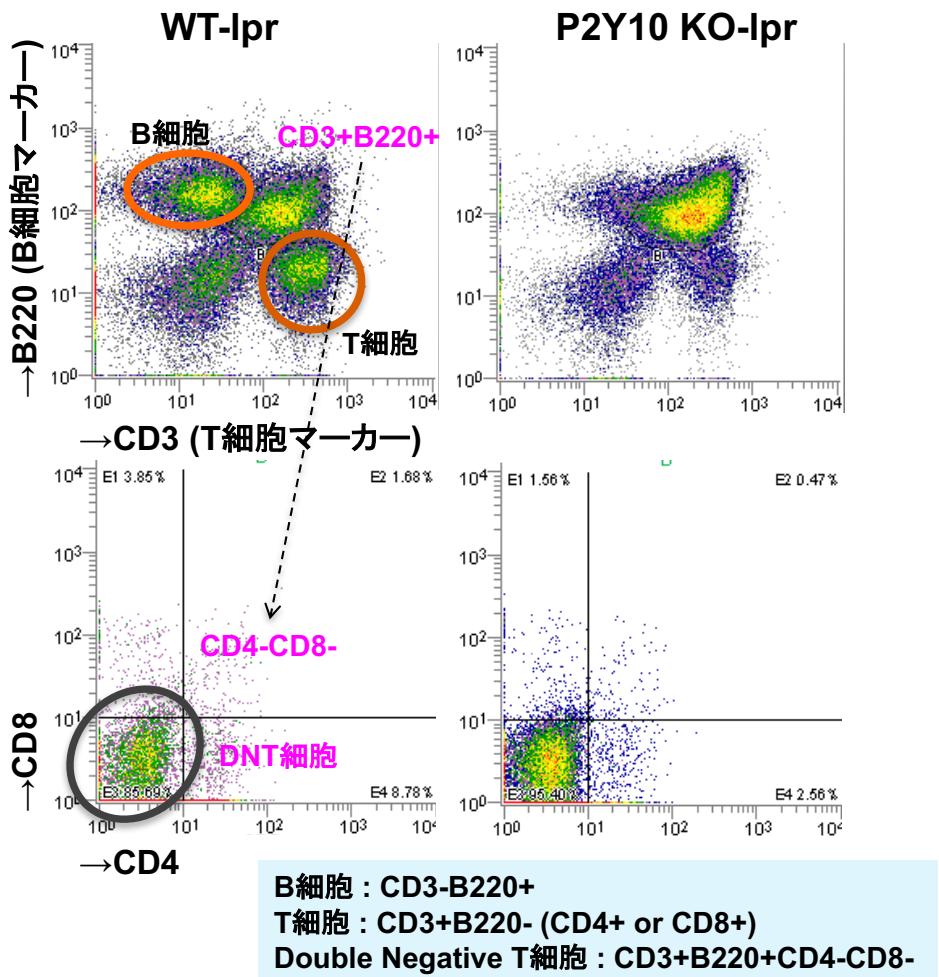


Fig. 25 ダブルネガティブ T (DNT) 細胞の FCM サイトグラム

脾臓またはリンパ節のリンパ球を表面抗原染色し FCM で解析した際のサイトグラム。T 細胞マーカーである CD3 および B 細胞マーカーである B220 で展開した際の両陽性群をさらに CD4 および CD8 で展開したときの両陰性群が DNT 細胞である

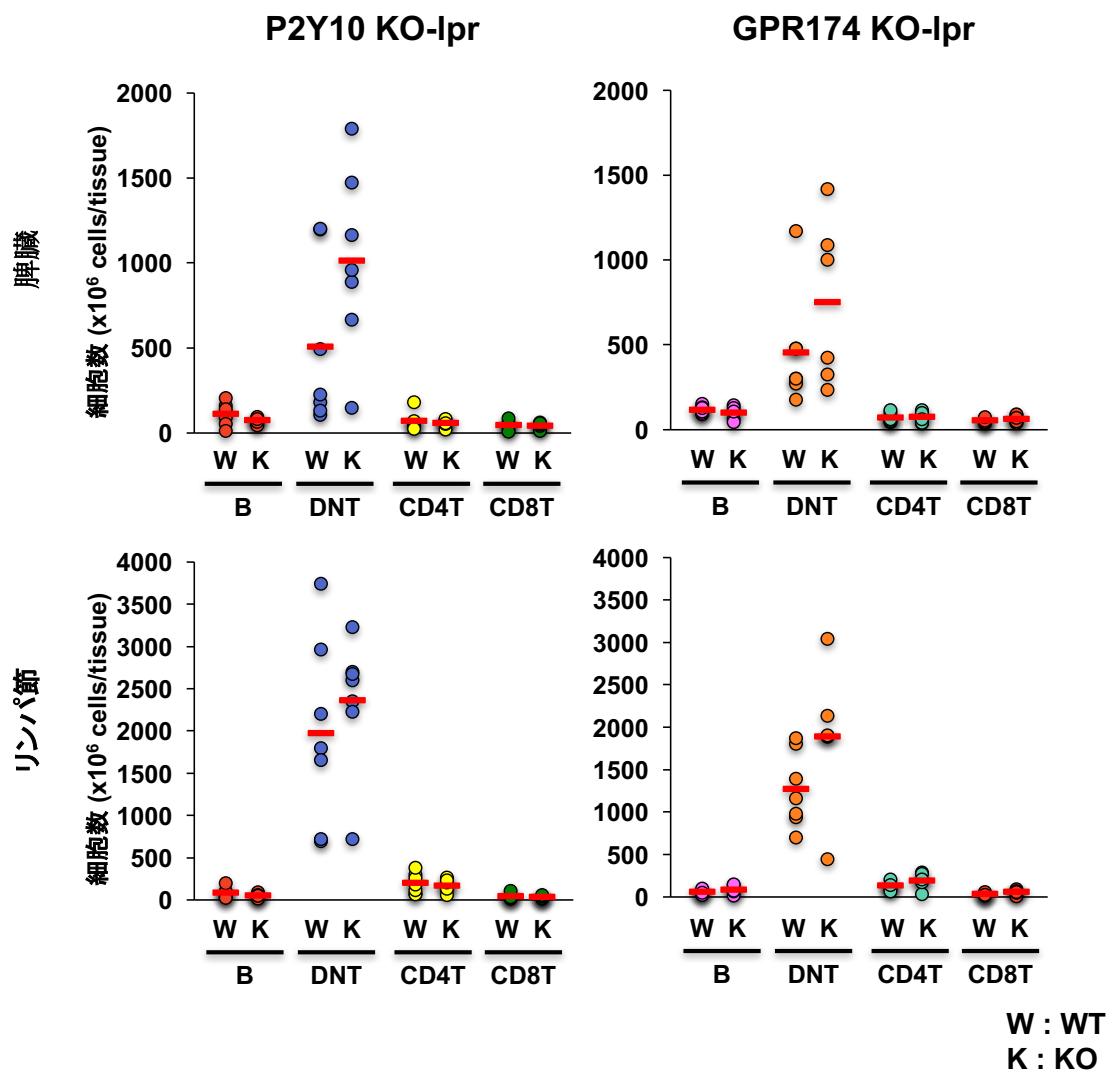
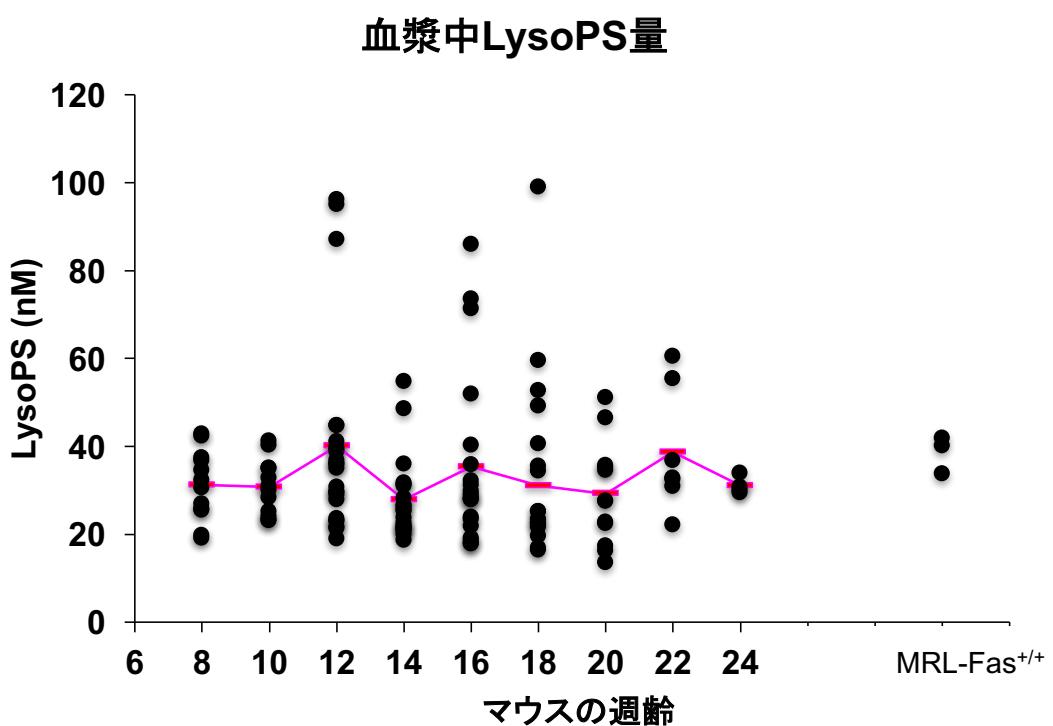


Fig. 26 P2Y10 KO-lpr マウス・GPR174 KO-lpr マウスにおける脾臓、リンパ節のリンパ球ポピュレーションの数

各 KO マウスの脾臓、リンパ節からリンパ球を回収し、表面抗原染色した後 FCM 解析を行った。P2Y10 KO-lpr マウス、GPR174 KO-lpr マウスともに WT-lpr マウスに比べて DNT 細胞の数が増加していることが分かった。一方、B 細胞、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞の数に差はなかった。



**Fig. 27 Ipr マウスの血中 LysoPS 量**

各週齢における Ipr マウスの血漿中 LysoPS 量を測定した。病態を発症する 12 週齢を超えて、LysoPS 量の増加は見られなかった。

また、Fas に変異のない MRL-Fas<sup>+/+</sup> マウスと比較しても LysoPS 量に差はなかった。

以上の結果から、*lpr* マウスにおいて P2Y10 および GPR174 は DNT 細胞の数を負に制御することでリンパ器官の肥大化を抑制していることが示唆された。*lpr* マウスにおける P2Y10 および GPR174 の機能として、①DNT 細胞の増殖抑制、②DNT 細胞の除去促進の 2 つを想定している (Fig. 28)。

DNT 細胞の由来や増殖メカニズム、除去メカニズムに関しては、*in vitro* の結果が *in vivo* にも適用できることが少ないために未だ不明な点が多く、複数の説が議論されている (Ref. 34)。これまでに報告されている DNT 細胞に関する知見を以下に述べる。

- (1) DNT 細胞は健常人およびマウスにもわずかに存在しており、通常の T 細胞と比べて増殖および除去スピードが速い。*lpr* マウスではアポトーシス異常により増殖>除去となり、DNT 細胞が蓄積する。(Ref. 35)
- (2) DNT 細胞は *in vivo* において常に hyper-proliferative な状態にある(Ref. 36)。
- (3) 細胞周期を抑制する分子である p21 (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1) を *lpr* マウスに過剰発現させると、リンパ球の異常増加が抑制される (Ref. 37)。
- (4) DNT 細胞は T 細胞と同様に T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) を発現しているが、*in vitro* での TCR 活性化刺激には反応しない。

一般に、通常の T 細胞の増殖、細胞死を評価する際には anti-CD3 や Con Aなどを用いて TCR に活性化刺激を入れたのち BrdU の取り込みや、caspase の活性化などの測定を行うが、上記の知見から DNT 細胞の評価においては TCR への活性化刺激というストラテジーは使えない。まずは P2Y10 KO-*lpr*、GPR174 KO-*lpr* マウスの DNT 細胞で増殖・細胞死に差があるのかを、単離した DNT 細胞に対して評価する必要がある。また、DNT 細胞の mRNA を用いたマイクロアレイ解析などの網羅的な解析により、新たな結果が得られるかもしれない。

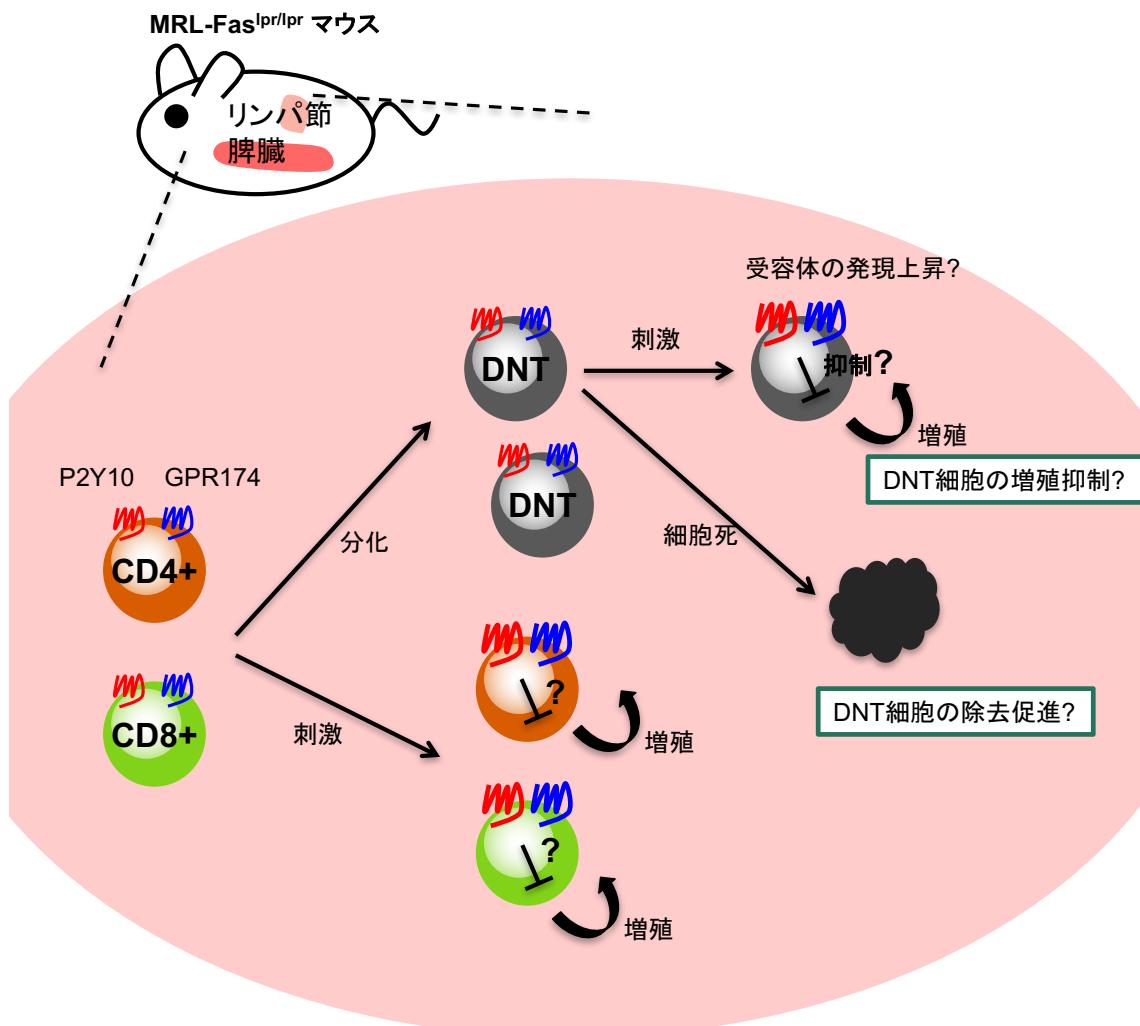


Fig. 28 想定される P2Y10 および GPR174 の作用機構

DNT 細胞は CD4<sup>+</sup> T 細胞または CD8<sup>+</sup> T 細胞から分化した細胞であると考えられている。in vivo における機構は不明であるが、何らかの刺激を受けて増殖または細胞死することが分かっている。

P2Y10、GPR174 は DNT 細胞の増殖抑制または除去促進することで、DNT 細胞の数を負に制御している可能性がある。

## ② P2Y10 アゴニスト (deoxy LysoPS) の薬理効果の検討

①の結果から、P2Y10 および GPR174 が *in vivo* においても T 細胞 (lpr マウスにおいては DNT 細胞という亜集団ではあるが) の数を負に制御していることが明らかとなった。そこで最後に、LysoPS が *in vivo* において P2Y10・GPR174 を活性化しうるのかどうかを示すために、LysoPS の薬理作用の検討を行うこととした。しかし、LysoPS はマウスに投与するとマスト細胞を介した体温低下を引き起こしてしまう (Ref. 21, 22) ため lpr マウスの病態に P2Y10・GPR174 由来でない影響を与えててしまう。したがって今回は当研究室で保有している LysoPS 誘導体を用いて薬理作用の評価を行なった。

当研究室では東京大学薬学研究科薬化学教室との共同研究により、各 LysoPS 受容体特異的に作用する LysoPS 誘導体の合成および活性評価を行なっている (Ref. 38, 39)。今回は deoxy-LysoPS (**Fig. 29A**) という P2Y10 選択性の高い LysoPS 誘導体をマウスに皮下投与し、lpr マウスの病態解析を行なった。なお、皮下投与は静脈内投与、腹腔内投与に比べて血中濃度を長時間維持できるため、投与回数を減らすことが可能である (**Fig. 29B**)。

deoxy LysoPS を 1 日 2 回、1 回 1 mg、12 週齢から 21 週齢まで 9 週間続けた結果、deoxy LysoPS 投与群において血中リンパ球数、脾臓・リンパ節の肥大化が抑制されることが分かった (**Fig. 30**)。一方、vehicle 投与群においてもわずかに抑制される傾向があった。

deoxy LysoPS は P2Y10 に比較的選択性が高いが、わずかにマスト細胞脱顆粒作用および GPR34 に対する反応性も残っている。今回の結果から、deoxy LysoPS が lpr マウスに対して治療効果を有する可能性が示唆されたが、今後さらに P2Y10 に選択性の高い LysoPS 誘導体を用いた評価が必要であると考えている。また、vehicle 投与群 (3%mouse serum 投与群) でも、リンパ球の増加が抑制される傾向にあったことから、毎日の連続投与がマウスに負荷を与えて

いる可能性を考えている。今後の解析では投与方法についても改良が必要であると考える。現在も LysoPS 誘導体の合成、活性評価は行っており、すでに P2Y10、GPR174 に選択性が高く、かつ体内安定性も優れている誘導体が複数見つかっている。今後の治療効果の評価が期待される。

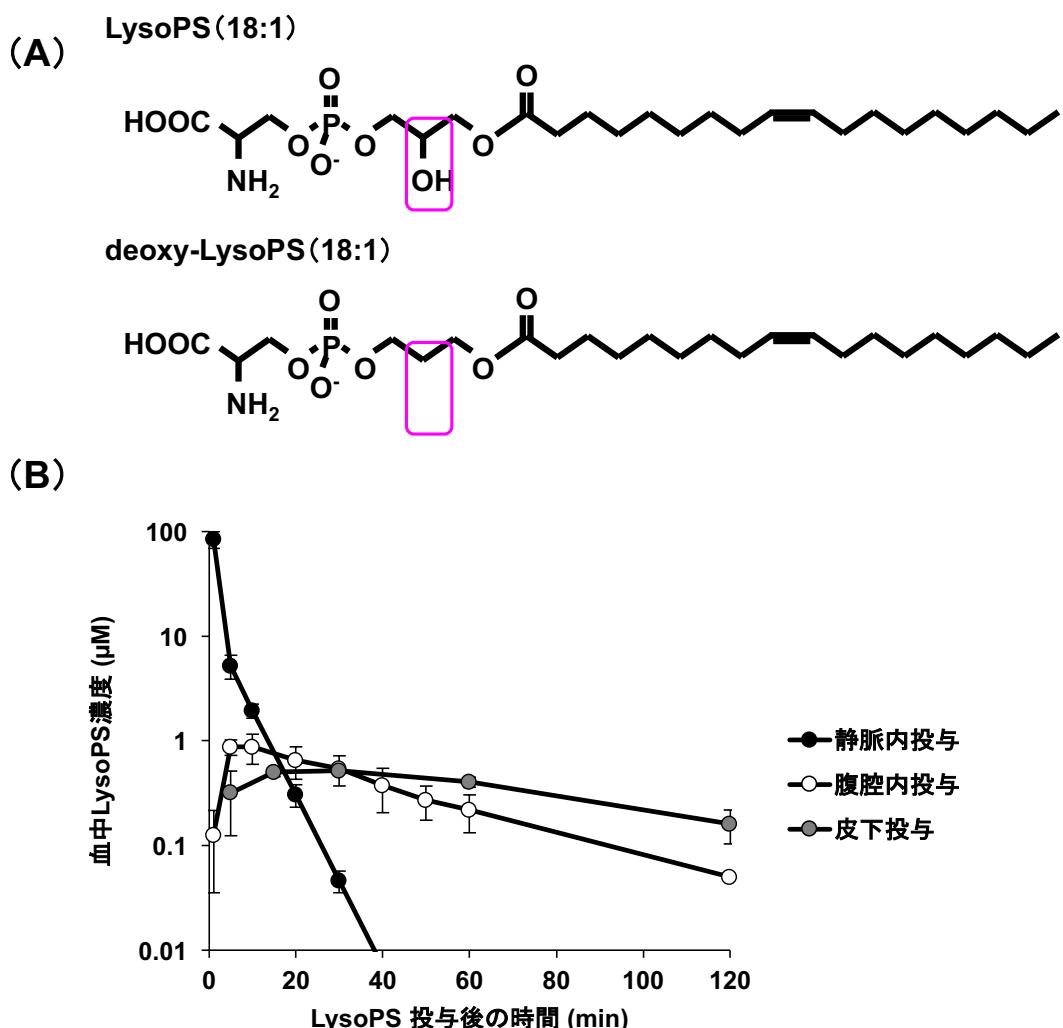


Fig. 29 deoxy-LyoPS と投与経路の違いによる血中濃度推移の違い

(A) deoxy-LyoPS の構造。LysoPS のグリセロール骨格の *sn*-2 位の OH 基を除いた構造をしている。  
 (B) 同量の LysoPS を静脈内、腹腔内、皮下投与した際の、血中濃度推移。血中半減期は静脈内投与 : 1 min、腹腔内投与 : 10 min、皮下投与 : 30 min であり、消失するまでにかかる時間は静脈内投与 : 38 min、腹腔内投与 : 174 min、皮下投与 : 385 min であった。

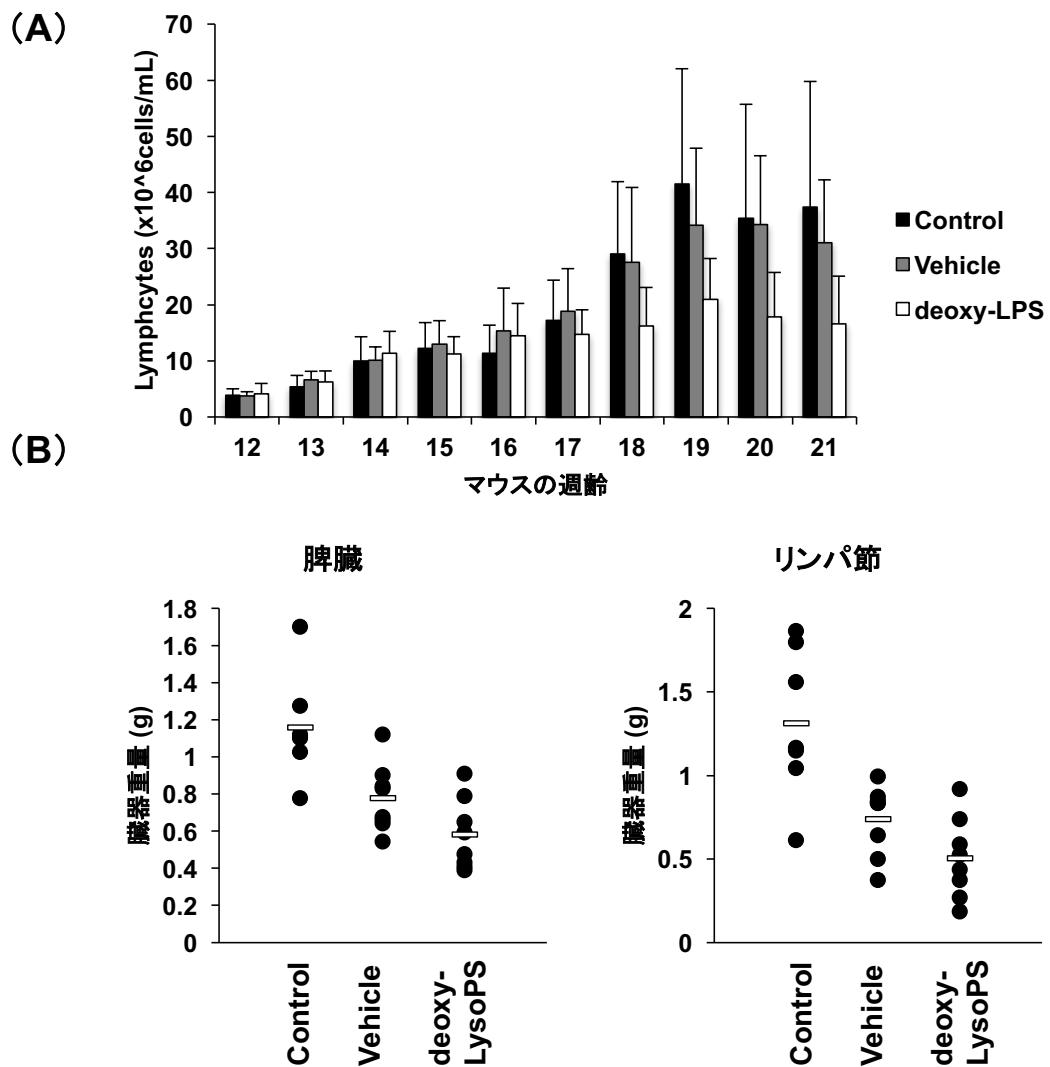


Fig. 30 deoxy-LyoPS の投与により Ipr マウスの症状が抑制される?

Ipr マウスに 12-21 週齢の 9 週間 deoxy-LyoPS を皮下投与し、血中リンパ球数(A)、および脾臓・リンパ節重量(B)を測定した。deoxy-LyoPS 投与群で Control 群に比べてリンパ球数、脾臓・リンパ節の重量が減少したが、vehicle 投与群でもわずかな減少が見られた。

### 3.4 まとめと今後の展望

本研究により P2Y10 および GPR174 が *in vivo* においてもリンパ球の機能を抑制することが初めて明らかになった。今後の課題としては①P2Y10、GPR174 の作用機構の解明、②LysoPS の供給源の同定、③LysoPS 產生酵素の同定が挙げられる。

- ① 単離 DNT 細胞を用いた *in vitro* での増殖、細胞死評価を行い、KO-lpr マウスで差があるかを評価する。
- ② 残念ながら血漿中 LysoPS 量の増加は見られなかった。2 で行った LC-MS/MS の解析から LysoPS は炎症局所で産生されることが分かっている。従って、lpr マウスにおいても DNT 細胞が増殖している場所（脾臓やリンパ節）に限局して LysoPS が産生されている可能性がある。当研究室では imaging MS を用いたリゾリン脂質の局在解析が可能になっており、組織切片上の LysoPS の局在解析により、LysoPS の増加を捉えられる可能性はある。
- ③ PS-PLA<sub>1</sub> KO-lpr マウスの表現型解析は同時に実行しており、興味深いことに P2Y10 KO-lpr、GPR174 KO-lpr マウスとは逆の、つまりリンパ球数の減少という結果が得られている。従って、lpr マウスにおいては LysoPS を產生する酵素は別に存在すると考えられる。

ところで現在、当研究室の後輩の新上雄二修士が抗原免疫による B 細胞増殖モデルの解析を行なっており、B 細胞の増殖においても P2Y10 および GPR174 が抑制的に作用している可能性が示唆されている。P2Y10・GPR174 は全てのリンパ球に共通している増殖機構を抑制しており、lpr マウスの場合は DNT 細胞の数を、抗原免疫モデルマウスの場合は B 細胞の数を抑制しているのかもしれない。

当研究室で開発された新規 GPCR 活性化評価法 (Ref. 15) により、GPR34

は  $G_i$  に、P2Y10 および GPR174 は  $G_{12/13}$  に共役していることが分かっている。したがって P2Y10 と GPR174 は相補的に作用している可能性があり、ダブル KO (Double KO : DKO) マウスを用いた解析の必要性が示唆されていた。しかし、P2Y10 と GPR174 は共に X 染色体上にコードされており、通常の交配でダブル KO マウスを作ることは極めて困難であった。しかし近年、CRISPER-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術の進歩により、当研究室でも DKO マウスの作製に成功している。P2Y10/GPR174 DKO-lpr マウスは各シングル KO よりもさらにリンパ球異常増殖が亢進していることが予想され、今後の解析が期待される。

## 4. 総括

本研究で、私は LysoPS および LysoPT の高感度測定系を構築し、①LysoPS が炎症時に高濃度に產生されること、②LysoPS 誘導体としての位置づけであつた LysoPT が生体中に存在すること、を初めて明らかにした。また、病態モデルマウスを用いた解析から、③P2Y10 および GPR174 が *in vivo* においてリンパ球の数を抑制することを明らかにした。

LysoPS は他のリゾリン脂質である LPA や S1P と比較すると、產生酵素や受容体の研究がほとんど進んでおらず、脂質メディエーターとして機能するかどうかは明らかではなかった。本研究は LysoPS がメディエーターとしての地位を獲得する大きな一歩となると考える。

今後の大きな課題として、LysoPS 產生酵素-LysoPS-LysoPS 受容体の一連のシグナルが同時期に同じ場所で発生することを捉える必要がある。今回は残念ながら LysoPS の上昇と受容体の機能を結びつけることができなかつたため、今後の解析が期待される。

また、P2Y10 アゴニストが lpr マウスにおいて治療効果を示す結果が得られしたことから、LysoPS が免疫疾患の新たな治療薬になり得るのではないかと考えられる。

## 5. 引用文献

1. Martin TW. et al. Interactions of lysophospholipids and mast cells. *Nature*. 1979, 279(5710), p. 250-252.
2. Smith GA. et al. The exogenous lipid requirement for histamine release from rat peritoneal mast cells stimulated by concanavalin A. *FEBS Lett.* 1979, 105(1), p. 58-62
3. Horigome K. et al. Effect of serine phospholipid structure on the enhancement of concanavalin A-induced degranulation in rat mast cells. *J Biochem.* 1986, 100(3), p. 571-579.
4. Bruni A. et al. Lysophosphatidylserine as histamine releaser in mice and rats. *Agents Actions.* 1984, 14(5-6), p. 619-25.
5. Lourenssen S. et al. Lysophosphatidylserine potentiates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Neurosci Lett.* 1998, 248(2), p. 77-80.
6. Bellini F. et al. Role of a serum phospholipase A1 in the phosphatidylserine-induced T cell inhibition. *FEBS Lett.* 1993, 316(1), p. 1-4.
7. Park KS et al. Lysophosphatidylserine stimulates L2071 mouse fibroblast chemotactic migration via a process involving pertussis toxin-sensitive trimeric G-proteins. *Mol Pharmacol.* 2006, 69(3), p. 1066-73.
8. Horigome K. et al. Selective release of phospholipase A2 and lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase from rat platelets. *J Biochem.* 1987, 101(1), p. 53-61.
9. Higashi S. et al. Purification and characterization of lysophospholipase

released from rat platelets. *J Biochem.* 1988, 103(3), p. 442-447.

10. Yokoyama K. et al. Phospholipid degradation in rat calcium ionophore-activated platelets is catalyzed mainly by two discrete secretory phospholipase As. *J Biochem.* 1995, 117(6), p. 1280-1287.
11. Sato T. et al. Serine phospholipid-specific phospholipase A that is secreted from activated platelets. A new member of the lipase family. *J Biol Chem.* 1997, 272(4), p. 2192-2198.
12. Aoki J. et al. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1582(1-3), p. 26-32.
13. 卷出 久美子. 2006 年度博士論文.
14. Sugo T. et al. Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 341(4), p. 1078-1087.
15. Inoue A. et al. TGF $\alpha$  shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods.* 2012, 9(10), p. 1021-9.
16. 北村 一. 2011 年度博士論文.
17. Scherer M. et al. High-throughput analysis of sphingosine 1-phosphate, sphinganine 1-phosphate, and lysophosphatidic acid in plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009, 55(6), p. 1218-1222.
18. Aaltonen N. et al. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010, 878(15-16). P. 1145-1152.
19. Bollinger JG. et al. Improved method for the quantification of lysophospholipids including enol ether species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2010, 51(2), p. 440-447.

20. Okudaira M. et al. 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(10), p. 2178-2192.
21. Iwashita M. et al. Synthesis and evaluation of lysophosphatidylserine analogues as inducers of mast cell degranulation. Potent activities of lysophosphatidylthreonine and its 2-deoxy derivative. *J Med Chem.* 2009, 52(19), p. 5837-5863.
22. 卷出 久美子. 2006 年度博士論文.
23. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.* 2003, 42(5), p. 423-438.
24. Schlegel RA. et al. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ.* 2001, 8(6), p. 551-563.
25. Omori T. et al. Identification of novel mammalian phospholipids containing threonine, aspartate, and glutamate as the base moiety. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011, 879(29), p. 3296-3302.
26. Mitoma J. et al. Occurrence of an unusual phospholipid, phosphatidyl-L-threonine, in cultured hippocampal neurons. Exogenous L-serine is required for the synthesis of neuronal phosphatidyl-L-serine and sphingolipids. *J Biol Chem.* 1998, 273(31), p. 19363-19366.
27. Arroyo-Olarte RD. et al. Phosphatidylthreonine and Lipid-Mediated Control of Parasite Virulence. *PLoS Biol.* 2015, 13(11).
28. Japan Intractable Disease Information Center. [www.nanbyou.or.jp/entry/2231](http://www.nanbyou.or.jp/entry/2231). 2017/7/8 入手
29. Sneller MC. A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J Clin Invest.* 1992, 90(2), p. 334-341.

30. Fisher GH. et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995, 81(6), p. 935-946
31. Rieux-Laucat F. et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995, 268(5215), p. 1347-1349.
32. Watanabe-Fukunaga R. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992, 356, p. 314-317 .
33. Adach M. et al. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90(5), p. 1756-1760.
34. Balomenos D. et al. On How Fas Apoptosis-Independent Pathways Drive T Cell Hyperproliferation and Lymphadenopathy in lpr Mice. *Front Immunol*. 2017, 8, 237.
35. Abdiaziz S. et al. Fas-Mediated Apoptosis Regulates the Composition of peripheral  $\alpha \beta$  T Cell Repertoire by Constitutively Purging Out Double Negative T cells. *PLoS ONE*. 2008, 3(10), e3456.
36. Balomenos D. et al. The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J Immunol*. 1997, 159(5), p. 2265-2273.
37. Daszkiewicz L. et al. Distinct p21 requirements for regulating normal and self-reactive T cells through IFN- $\gamma$  production. *Sci Rep*. 2015, 5, 7691.
38. Uwamizu A. et al. Lysophosphatidylserine analogues differentially activate three LysoPS receptors. *J Biochem*. 2015, 157(3), p. 151-160.

39. Ikubo M. et al. Structure-activity relationships of lysophosphatidylserine analogs as agonists of G-protein-coupled receptors GPR34, P2Y10, and GPR174. *J Med Chem.* 2015, 58(10), p. 4204-4219.

## 6. 発表論文

「Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS」  
Michiyo Okudaira, Asuka Inoue, Akira Shuto, Keita Nakanaga, Kuniyuki Kano,  
Kumiko Makide, Daisuke Saigusa, Yoshihisa Tomioka, and Junken Aoki  
Journal of Lipid Research, Volume 55 (10), 2178-2192, 2014

「Detection of threonine-containing lysophospholipids using ESI-LC-MS/MS」  
(投稿準備中)

## 7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導頂きました 東北大学薬学研究科分子細胞生物学分野の青木淳賢 教授、井上飛鳥 准教授、巻出久美子 元助教、可野邦之 助教に深く感謝します。特に青木教授からは研究者としての考え方や実験に取り組む姿勢を教えて頂き感謝いたします。また東北大学東北メディカル・メガバンク機構 三枝大輔 講師は LC-MS/MS の測定に関して丁寧に指導して頂き、感謝いたします。

マウスの飼育にあたり、陰で支えてくださった動物舎のスタッフの方々に感謝いたします。

研究生活を共にし、本研究を様々な面から支えてくださった分子細胞生物学分野のスタッフ、学生の皆様に深く感謝します。特に同期である石黒純 修士、雪浦弘志 博士とはお互いに励まし合い、切磋琢磨しながら研究室生活を送ることができたことを嬉しく思い、感謝いたします。

最後に、いつも応援し見守ってくれた母、祖父母、夫に深く感謝します。

ありがとうございました。