

学位論文題名

スフィンゴシン 1-リン酸受容体と低分子量 G タンパク質  
を介した細胞運動制御機構および  
スフィンゴシン 1-リン酸受容体アゴニストによる免疫制御

学位論文内容の要旨

序論

スフィンゴシン 1-リン酸 (SIP)は、スフィンゴシンがスフィンゴシキナーゼによりリン酸化されることで産生される生理活性脂質であり、細胞表面上の受容体を介して細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出、アクチンの重合、細胞増殖、細胞運動の制御等、多彩な細胞応答を引き起こすことが知られている。SIP 受容体は G タンパク質共役型の 7 回膜貫通型の受容体であり、これまでに SIP<sub>1</sub>、SIP<sub>2</sub>、SIP<sub>3</sub>、SIP<sub>4</sub> および SIP<sub>5</sub> が報告されており、それぞれの受容体について機能解析が行われている。これら受容体のうち SIP<sub>4</sub> は、特に免疫系組織および血液系細胞に発現している。しかしながら、SIP<sub>4</sub> についてはその情報伝達系について殆ど明らかにされていない。そこで本研究では、SIP 受容体 SIP<sub>4</sub> の情報伝達系の解析および低分子量 G タンパク質を介した細胞運動の制御、ならびに SIP 受容体アゴニストによる免疫制御機構について検討した。

結果と考察

1. SIP 刺激による SIP<sub>4</sub> の下流シグナル

SIP<sub>4</sub> を除く各種 SIP 受容体についてはその細胞応答が検討されているものの、SIP<sub>4</sub> については殆ど検討されていない。また、SIP<sub>1</sub>、SIP<sub>2</sub> および SIP<sub>3</sub> は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質を活性化または抑制することにより細胞運動を制御していることが報告されている。そこで、SIP<sub>4</sub> の下流シグナルについて検討することとした。SIP<sub>4</sub> を安定に発現する CHO 細胞を用いて、SIP 刺激による MAPK 活性化におよぼす作用について検討した。その結果、抗リン酸化 ERK1/2 抗体を用いたウエスタンブロット法により、SIP および SIP 受容体アゴニストである FTY720 リン酸刺激によって ERK のリン酸化が誘導されることを確認した。この反応は百日咳毒素の前処理によって消失した。次に、SIP<sub>4</sub> を安定に発現する CHO 細胞を用いて SIP 刺激による低分子量 G タンパク質活性化におよぼす作用について検討した。その結果、トランスウェルを用いた細胞遊走実験により SIP に対する遊走能の亢進を、また、PAK1 の活性化型 Rac および活性化型 Cdc42 結合ドメイン (PBD) ならびに GST との融合タンパク質である GST-PBD を用いたプルダウンアッセイにより、SIP 刺激後 3 分をピークとした一過性の Cdc42 の活性化を確認した。一方、Rac の活性化は認められなかった。つづいて、マウス Th2 細胞株である D10.G4.1 およびマウスリンパ腫細胞株である EL4 細胞を用いて SIP の細胞運動におよぼす影響について検討した。RT-PCR 法により D10.G4.1 細胞および EL4 細胞における各種 SIP 受容体 mRNA の発現を確認したところ、SIP<sub>1</sub> および SIP<sub>4</sub> の発現を認めた。トランスウェルを用いて D10.G4.1 細胞および EL4 細胞の細胞遊走能について検討したところ、ともに SIP に対する遊走能を示した。また、SIP は D10.G4.1 細胞および EL4 細胞の Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rac および Cdc42 を活性化した。EL4 細胞の SIP に対する遊走能は百日咳毒素および Rho ファミリー低分子量 G タンパク質阻害剤である Toxin B により阻害され、さらにドミナントネガティ

ブRacおよびドミナントネガティブCdc42の発現によっても抑制された。以上より、SIP<sub>4</sub>の下流においてERKおよびCdc42はSIPの刺激により活性化することが明らかとなった。リンパ球に存在する内因性SIP<sub>4</sub>はCdc42を介してSIP<sub>1</sub>とともにリンパ球の細胞運動に関与していると考えられた。

## 2. SIP<sub>1</sub>およびSIP<sub>4</sub>の相互作用の可能性

多くの7回膜貫通型受容体は、ホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成することが知られているが、SIP受容体もまたSIP<sub>1</sub>、SIP<sub>2</sub>およびSIP<sub>3</sub>との間においてそれぞれホモダイマーおよびヘテロダイマーを形成することが報告されている。しかしながらSIP<sub>4</sub>に関しては報告されていない。リンパ球においてSIP<sub>1</sub>およびSIP<sub>4</sub>の発現を認めたことより、本研究ではSIP<sub>1</sub>およびSIP<sub>4</sub>の相互作用について検討することとした。C末端にHAタグを付加したSIP<sub>1</sub>を安定に発現するCHO細胞にN末端にFLAGタグを付加したSIP<sub>4</sub>を、またC末端にHAタグを付加したSIP<sub>4</sub>を安定に発現するCHO細胞にN末端にFLAGタグを付加したSIP<sub>1</sub>をそれぞれ一過性に発現させた後、抗HA抗体を用いて免疫沈降を、抗FLAG抗体および抗HA抗体を用いて間接蛍光抗体染色を行った。その結果、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロット法により、SIP<sub>1</sub>およびSIP<sub>4</sub>の共沈を確認した。この共沈はSIP刺激の有無にかかわらず認められた。また、間接蛍光抗体染色によりSIP<sub>1</sub>およびSIP<sub>4</sub>の細胞表面上における共局在が確認された。リンパ球においてはSIP<sub>1</sub>およびSIP<sub>4</sub>が存在していること、および今回の検討により、SIP<sub>1</sub>およびSIP<sub>4</sub>は共局在することによってその情報伝達系に何らかの影響をおよぼしているものと推測された。

## 3. SIP受容体アゴニストによる免疫抑制作用

FTY720は冬虫夏草の一種である*Isaria sinclairii*菌が産生する天然物、myriocin (ISP-1)より誘導された、シクロスポリンおよびタクロリムスとは異なる作用機序を有する強力な免疫抑制薬であり、海外および国内においても腎移植を対象とした臨床試験が進行中である。FTY720は各種モデル動物において末梢血循環リンパ球を二次リンパ組織および胸腺中に隔離し、末梢血中のリンパ球数を減少させることによって免疫抑制作用を示すことが報告されている。近年、FTY720は生体内において二次リンパ系組織に存在するスフィンゴシンキナーゼ2によってFTY720リン酸に変換され、SIP<sub>2</sub>を除くSIP受容体に対してアゴニストとして作用することが報告された。そこで、FTY720リン酸の細胞応答におよぼす作用について検討した。SIP<sub>1</sub>はSIP刺激により細胞内へ移行し、刺激後2~3時間においてその一部の受容体が再び細胞表面上へ発現することが報告されている。FTY720リン酸のSIP<sub>1</sub>に対する細胞内移行について検討したところ、SIP刺激時とは異なり、より長時間の細胞内移行を誘導することを確認した。マウスCD4 T細胞のSIPに対する遊走能におよぼすFTY720リン酸の作用を確認したところ、FTY720リン酸の前処理によってマウスCD4 T細胞のSIPに対する遊走はFTY720リン酸の濃度依存的に阻害されることを確認した。

以上より、FTY720による末梢血リンパ球数の減少作用は、生体内において生成されたFTY720リン酸によるSIP<sub>1</sub>の細胞内移行に伴う、SIP/SIP<sub>1</sub>依存性の二次リンパ組織および胸腺からのリンパ球の移出の阻害によるものと推察された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 五十嵐 靖 之  
副 査 教 授 横 沢 英 良  
副 査 助 教 授 井ノ口 仁 一  
副 査 助 教 授 川 原 裕 之

## 学位論文題名

### スフィンゴシン 1-リン酸受容体と低分子量 G タンパク質 を介した細胞運動制御機構および

### スフィンゴシン 1-リン酸受容体アゴニストによる免疫制御

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、G タンパク質共役型の 7 回膜貫通型の受容体を介して細胞増殖、細胞運動制御、形態変化など多彩な生理作用を示す。これらはそれぞれの受容体に共役する 3 量体 G 蛋白質とその下流のシグナル伝達経路の活性変化の結果生じたものである。これまでに S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> および S1P<sub>5</sub> が報告されており、それぞれの受容体について機能解析が行われている。これら受容体のうち S1P<sub>4</sub> は、特に免疫系組織および血液系細胞に発現している。しかしながら、S1P<sub>4</sub> についてはその情報伝達系について殆ど明らかにされていない。そこで本研究では、S1P 受容体 S1P<sub>4</sub> の情報伝達系の解析および低分子量 G タンパク質を介した細胞運動の制御、ならびに S1P 受容体アゴニストによる免疫制御機構について検討した。

S1P<sub>4</sub> の下流シグナルを明らかにするために、S1P<sub>4</sub> を安定に発現する CHO 細胞を用いて、S1P 刺激による MAPK 活性化におよぼす作用について検討した。その結果、S1P および S1P 受容体アゴニストである FTY720 リン酸刺激によって ERK のリン酸化が誘導されることを確認した。次に S1P 刺激による低分子量 G タンパク質活性化におよぼす作用について検討した結果、遊走能の亢進と S1P 刺激後 3 分をピークとした一過性の Cdc42 の活性化を確認した。つづいて、マウス Th2 細胞株である D10.G4.1 およびマウスリンパ腫細胞株である EL4 細胞を用いて S1P の細胞運動におよぼす影響について検討した。RT-PCR 法により D10.G4.1 細胞および EL4 細胞における各種 S1P 受容体 mRNA の発現を確認したところ、S1P<sub>1</sub> および S1P<sub>4</sub> の発現を認めた。これらの細胞はともに S1P に対する遊走能を示した。また、S1P は D10.G4.1 細胞および EL4 細胞の Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rac および Cdc42 を活性化した。以上より、S1P<sub>4</sub> の下流において ERK および Cdc42 は S1P の刺激により活性化することが明らかとなった。リンパ球に存在する内因性 S1P<sub>4</sub> は Cdc42 を介して S1P<sub>1</sub> とともにリンパ球の細胞運動に関与していると考えられた。

C 末端に HA タグを付加した S1P<sub>1</sub> を安定に発現する CHO 細胞に N 末端に FLAG タグを付加した S1P<sub>4</sub> を、また C 末端に HA タグを付加した S1P<sub>4</sub> を安定に発現する CHO 細

胞に N 末端に FLAG タグを付加した S1P<sub>1</sub> をそれぞれ一過性に発現させた後、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体を用いて間接蛍光抗体染色を行った。その結果、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット法により、S1P<sub>1</sub> および S1P<sub>4</sub> の免疫共沈降を確認した。また、間接蛍光抗体染色により S1P<sub>1</sub> および S1P<sub>4</sub> の細胞表面上における共局在が確認された。今回の検討により、S1P<sub>1</sub> および S1P<sub>4</sub> は共局在することによってその情報伝達系に何らかの影響をおよぼしているものと推測された。

FTY720 はシクロスポリンおよびタクロリムスとは異なる作用機序を有する強力な免疫抑制薬であり、海外および国内においても腎移植を対象とした臨床試験が進行中である。FTY720 は各種モデル動物において末梢血循環リンパ球を二次リンパ組織および胸腺中に隔離し、末梢血中のリンパ球数を減少させることによって免疫抑制作用を示すことが報告されている。近年、FTY720 は生体内において二次リンパ系組織に存在するスフィンゴシンキナーゼ 2 によって FTY720 リン酸に変換され、S1P<sub>2</sub> を除く S1P 受容体に対してアゴニストとして作用することが報告された。そこで、FTY720 リン酸の細胞応答におよぼす作用について検討した。S1P<sub>1</sub> は S1P 刺激により細胞内へ移行し、刺激後 2～3 時間においてその一部の受容体が再び細胞表面上へ発現することが報告されている。FTY720 リン酸の S1P<sub>1</sub> に対する細胞内移行について検討したところ、S1P 刺激時とは異なり、より長時間の細胞内移行を誘導することを確認した。マウス CD4 T 細胞の S1P に対する遊走能におよぼす FTY720 リン酸の作用を確認したところ、FTY720 リン酸の前処理によってマウス CD4 T 細胞の S1P に対する遊走は FTY720 リン酸の濃度依存的に阻害されることを確認した。以上より、FTY720 による末梢血リンパ球数の減少作用は、生体内において生成された FTY720 リン酸による S1P<sub>1</sub> の細胞内移行に伴う、S1P / S1P<sub>1</sub> 依存性の二次リンパ組織および胸腺からのリンパ球の移出の阻害によるものと推察された。

本研究では、これまで未解明であった S1P<sub>4</sub> のシグナル経路の同定を行い、さらに免疫系において発現している 2 つの S1P 受容体 S1P<sub>1</sub> と S1P<sub>4</sub> のクロストークを明らかにした。また、臨床応用の可能性の高い FTY720 の分子メカニズムに対する知見を得ている。よって、申請者は博士（薬学）の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた。