

博士論文

論文題目 動脈硬化形成におけるリゾホスファチジル
 セリンのマクロファージに対する作用の解明

氏名 西川 真子

【目次】

要旨	_____	1
略号リスト	_____	2
序文	_____	3
方法	_____	13
結果	_____	22
考察	_____	37
謝辞	_____	47
文献	_____	48

【要旨】

リゾホスファチジルセリン(LysoPS)の動脈硬化形成における作用はよくわかっていない。そこで LysoPS のコレステロール蓄積と炎症に関する作用を RAW 264.7 細胞とマウス腹腔マクロファージを用いて解析した。両方の実験モデルで、LysoPS はコレステロール蓄積量を増加させ、RAW 264.7 細胞において関与するスカベンジャー受容体の発現を増加させた。炎症に関しては、LysoPS は炎症性メディエーターの発現を抑制し、RAW 264.7 細胞において小胞体ストレスを抑制することが示唆された。これらの結果より、LysoPS は動脈硬化形成において催動脈硬化/抗動脈硬化の作用をもつと考えられた。

【略号リスト】

LDL : low-density lipoprotein

LysoPA : lysophosphatidic acid

S1P : sphingosine 1-phosphate

LysoPS : lysophosphatidylserine

oxLDL : oxidized low-density lipoprotein

ACS : acute coronary syndromes

MPMs : mouse peritoneal macrophages

LPS : lipopolysaccharide

MSR1 : macrophage scavenger receptor 1

LOX1 : oxidized low-density lipoprotein receptor 1

TLR4 : Toll-like receptor 4

P2Y10 : purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 10

MMP-2 : matrix metalloproteinase 2

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

XBP-1 : X-box binding protein-1

PS : phosphatidylserine

【序文】

動脈硬化性疾患、特に心筋梗塞を中心とする心血管系疾患と脳梗塞・脳卒中を中心とする脳血管障害は、世界的にみて全死亡率の 22%を占める、頻度の高い疾患である[1, 2]。わが国は、1980 年の WHO の MONICA(心血管系疾患の傾向とリスク因子のモニタリング) project では、冠動脈疾患の発症頻度が最も少ない国であったが、生活習慣の欧米化が肥満、脂質異常症、糖尿病の増加をもたらし、冠動脈疾患の発症頻度も増加してきている。脳卒中に関しては、食塩制限という食習慣介入と高血圧管理により脳出血の頻度は減少したものの、アテローム血栓性脳梗塞の割合が増加している。2002 年の死因統計では、悪性腫瘍が第一位であるが、脳卒中と心疾患による死因は悪性腫瘍と並んで大きな位置を占め、約 30%に及んでいる。動脈硬化病変の形成、イベント発症に数十年かかること、また更なる高齢化の進行を考えると、今後いっそう、動脈硬化性疾患の発症頻度は高くなることが予想される。

動脈硬化の発症・進展は様々な危険因子の重複によって引き起こされることが証明されており、なかでも「脂質」は大きく関与する因子と考えられている。その代表例が低比重リポ蛋白(LDL)コレステロールであり、LDL コレステロールは、動脈硬化性疾患の古典的リスクファクターとしてその地位が確立し、また、LDL コレステロールを低下させる HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)は動脈

硬化性疾患を低下させることが疫学的に証明されている。その一方で、スタチンで LDL コレステロールを健常人と同程度にまで低下させても、冠動脈疾患を 40%ほどしか低下させることができない、という残存リスクの問題が残っている。この問題を解決するため、動脈硬化性疾患に対する新しいバイオマーカーや治療ターゲットの発見が待ち望まれており、多数の研究が行なわれている。

さて、脂質はその役割により大別すると栄養脂質、構造脂質、生理活性脂質に分けられる。このうち、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどに代表される生理活性脂質は、細胞が刺激を受けた際に、生体膜の構成成分であるリン脂質から産生・放出される、シグナル伝達能をもつ脂質である。また、生理活性脂質は、その役割により、細胞の内側にシグナルを発するものと、産生された細胞から放出され細胞の外側にシグナルを発するものに分けられる。細胞外へのシグナルは、標的細胞上に発現する細胞膜 7 回貫通型の G 蛋白質共役受容体に作用することにより細胞応答を惹起する。この受容体は 1 つのリガンドに対して多種存在することや、さまざまな条件下において大きく発現量が変化することが分かっており、さまざまな疾患の病態形成との関連が考えられている。

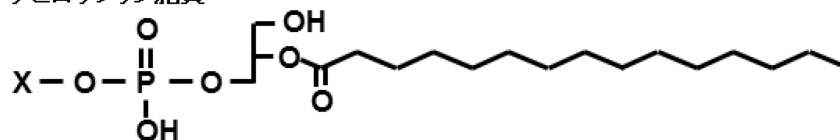
プロスタグランジン、ロイコトリエンなどの生理活性脂質は、「第一世代の生理活性脂質」として、その地位が確固たるものとなっている。既にその一部は薬剤にも応用されており、プロスタグランジン、トロンボキサンの産生を抑制



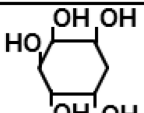
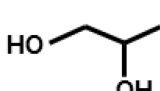

する COX 阻害薬であるアスピリンは解熱剤、消炎鎮痛剤、抗血栓薬として、ロイコトリエン D₄ 受容体システニルロイコトリエン 1 の拮抗薬(プラニルカスト、モンテルカスト、ザフィルルカスト)は気管支喘息やアレルギー性鼻炎に、用いられている。これらに加え、リゾリン脂質とよばれる脂質グループが、「第二世代の生理活性脂質」として、最近注目されてきている。リゾリン脂質とは、グリセロール骨格あるいはスフィンゴシン骨格に、リン酸を含む極性頭部(親水性)と一本の脂肪酸鎖(疎水性)をもつ脂質のことである(図 1)。その物理化学的性質上、生体膜の脂質二重層に侵入しやすく、容易に膜間移動することが可能であり、シグナル分子として機能する可能性が考えられてきた。ゲノムに直接コードされないリゾリン脂質の生体内機能を解析することは非常に困難であったが、近年、リゾリン脂質の特異的受容体が次々と発見されてきており、その機能も解明されつつある。特にリゾホスファチジン酸(LysoPA) やスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)は早くから注目され、プロスタグランジン類と同様に特異的受容体を介して脂質メディエーターとしてはたらき、血管生物学、免疫学、さらには脳神経領域などにおいて多彩な細胞応答を示すことがわかっている。

リゾリン脂質の中で、S1P は既に創薬ターゲットとなっている。FTY720(フィンゴリモド)は、生体内で FTY720-P となり、リンパ球上の S1P₁ 受容体にアゴニストとして作用し、S1P₁ 受容体の細胞内取り込みが促進され、リンパ球の細胞

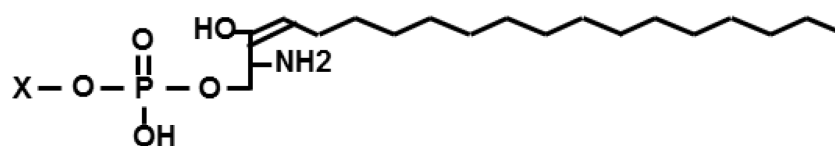
Figure 1

グリセロリポリン脂質



名称	Xの構造
リゾホスファチジン酸(LysoPA)	H
リゾホスファチシルセリン(LysoPS)	HOOC 
リゾホスファチシルコリン(LysoPC)	⁺ (CH ₃) ₃ N 
リゾホスファチシルイノシトール(LysoPI)	
リゾホスファチシルグリセロール(LysoPG)	HO 
リゾホスファチシルエタノールアミン(LysoPE)	H ₂ N 

スフィンゴリン脂質



名称	Xの構造
スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)	H

図1 リゾリン脂質の構造

表面から S1P₁ 受容体が消失する。結果として、リンパ球は S1P に作用できなくなり(脱感作)、胸腺や二次リンパ節における S1P₁ 依存性のリンパ球の移出が阻

害される。このような作用機序により、FTY720 は免疫抑制作用を発揮し、多発性硬化症の治療薬として用いられている。

LysoPA は最も単純な構造のグリセロリゾリン脂質で、生体内では主に、血中に大量に存在するリゾホスファチジルコリン(LysoPC)がオートタキシン(ATX)によって加水分解されることにより、産生される。これまでに 6 種類以上の特異的 G 蛋白質共役受容体が報告されており、受容体ノックアウトマウスを用いた基礎研究によって、脳神経系の形態形成や骨の分化、毛包形成、線維芽細胞の遊走惹起、受精卵の着床、腸管上皮細胞の抗アポトーシスなど、多彩な生理学的作用をもつことがわかっている[3-8]。また、LysoPA の産生酵素である ATX は癌、肝硬変、線維症、妊娠後期などのいくつかの疾患において発現が上昇することが知られており、これらの疾患の新しいバイオマーカーとしても期待されている。

グリセロリゾリン脂質には LysoPA の他にリゾホスファチジルコリン(LysoPC)、リゾホスファチジルセリン(LysoPS)、リゾホスファチジルイノシトール(LysoPI)、リゾホスファチジルグリセロール(LysoPG)、リゾホスファチジルエタノールアミン(LysoPE)などがある。これらは未だに解明されていない部分が多いが、いくつかの生理活性が報告されはじめている。例えば、LysoPC はホスファチジルコリン(PC)からホスホリパーゼ A₂により加水分解され生成される、血液中に最も

多く存在するリゾリン脂質である。酸化低密度リポ蛋白(oxLDL)中に LysoPC が含まれることがわかり、循環血中の oxLDL の生理活性の一部を LysoPC が担っているとの報告がある[9]。また LysoPC 自体もサイトカインの発現増強や、内皮細胞における接着因子の発現誘導などの作用をもつことが報告されている[10]。LysoPS は I 型(即時型)アレルギー反応に関与する主要な細胞であるマスト細胞の脱顆粒反応を促進し[11, 12]、T リンパ球の増殖・分化を抑制し[13]、PC12 細胞の神経突起伸長を促進[14]、線維芽細胞やグリオーマ細胞の遊走を制御[15, 16]、脂肪細胞のグルコース取り込みの調節[17]、チトクローム P450 の活性調節[18]、マクロファージのアポトーシスを起こした細胞の貪食促進[19, 20]などの作用をもつことがわかっている。LysoPI は膵島からのインスリン分泌や形質転換細胞の分泌促進などの活性をもつこと、LysoPG はいくつかの細胞で細胞遊走に関与すること、LysoPE は PC12 細胞の神経分化を促し、卵巣癌細胞の細胞遊走と浸潤を促進することがそれぞれ報告されている[21-25]。また、LysoPA の他のグリセロリゾリン脂質に対する受容体も同定され始めているが、現時点では、未だ不明なところが大きい。

前述のような多彩な生理活性作用の中で、リゾリン脂質は血管生物学の分野でも、潜在的な生理活性を有する脂質メディエーターとしてはたらくことが知られている[26-28]。特に、以下に示すように LysoPA は、いくつかの基礎研究、臨

床研究において、動脈硬化性疾患の発症に重要な役割をはたしていることが明らかとなっている。

病理学的には、LysoPA はヒトの動脈硬化部位のプラークの核となっている脂質コア部に豊富に含まれていることがわかっている[29, 30]。基礎研究においては、血小板の形態変化をおこし、血小板凝集、血小板・単球凝集を促進させ、プラーク部において組織因子の発現を増加させることがわかっている[31-33]。また、内皮細胞において接着分子やケモカインの発現を誘導し[34, 35]、血管平滑筋の遊走や炎症性サイトカインの分泌を促進する[36, 27]。つまり LysoPA は、アテローム性プラークの形成と、急性冠症候群のトリガーであるプラーク破綻に関与することが推察されている。

上述の背景より、LysoPA が動脈硬化性疾患のバイオマーカーである可能性が考えられていたが、今までヒト検体で証明した研究はなかった。そこで、我々のグループは、狭心症患者の心臓カテーテル検査時に大腿動脈に挿入するシースより、大腿動脈血を採取して血漿 LysoPA を測定した。すると、正常冠動脈患者と安定狭心症患者に比べて、急性冠症候群(ACS)患者で有意に LysoPA が高値(約 1.5 倍)であった[37]。しかし、健康成人[38]、慢性肝炎患者[39]、濾胞性リンパ腫患者[40]において、血漿 LysoPA と血清 ATX が強い相関をもつことが分かっているが、ACS 患者においては、血清 ATX は上昇していなかった。そこで、ACS

患者における血漿 LysoPA 値と血清 ATX 値の解離の原因を明らかにするために、狭心症患者の心臓カテーテル検査時の大腿動脈血を用いて、血漿 LysoPA 分子種とともに、LysoPS、LysoPI、LysoPG、LysoPE などの各微量成分リゾリン脂質(以下、マイナーリゾリン脂質)も併せて液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計(LC-MS/MS)で測定し、解析を行なった。正常冠動脈患者と安定狭心症患者に比べて、やはり ACS 患者で有意に血漿 LysoPA が高値であり、特に 18:2 LysoPA、20:4 LysoPA、22:6 LysoPA が高値であった。18:2 LysoPA と 20:4 LysoPA は血清 ATX と相関があったが、22:6 LysoPA の相関は弱かった。また、興味深いことに、LysoPS、LysoPI、LysoPG、LysoPE のマイナーリゾリン脂質も LysoPA と同様に ACS 患者血漿で高値であり、18:2、20:4、22:6 の各分子種ごとの LysoPA との相関は非常に強かった。ATX は血液中に最も多く存在するリゾリン脂質である LysoPC だけでなく、他のマイナーリゾリン脂質にも作用し、LysoPA を産生することが知られている。これらの結果から、マイナーリゾリン脂質が特に ACS 患者における 22:6 LysoPA 産生に関与している可能性が考えられた[41]。

さて、本研究の標的分子である LysoPS の産生経路は、細胞外へ分泌された基質特異的酵素(PS-PLA₁)がホスファチジルセリン(PS)を基質として LysoPS を産生する経路と、細胞内で産生された LysoPS が何らかの機構により細胞外へと放出される経路の二つが想定されているが、現時点で明らかになっている主な産生

経路として、前者（PS-PLA₁を介する経路）がある。通常、細胞内膜側に存在する PS が、活性化血小板では 8 回膜貫通タンパク質の TMEM16F によって[42]、アポトーシス細胞では 6 回膜貫通タンパク質の Xkr8 によって[43]、細胞膜外側に反転され、PS-PLA₁により LysoPS が産生されると考えられている。

我々のグループは、前述のマイナーリゾリン脂質が ACS 患者血漿で高値であったという研究結果を鑑み、心臓カテーテル検査時の大腿動脈血を採取し得た血漿、血清を用いて、血小板活性化のバイオマーカーであるセロトニンと、LysoPS 産生酵素である PS-PLA₁を追加測定した。セロトニンと各リゾリン脂質の相関を調べると、測定したリゾリン脂質の中で LysoPS のみに、有意な正の相関があった[44]。また、PS-PLA₁と LysoPS の相関を調べると、ACS 群でのみ、有意な正の相関があった[44]。これらの結果から、ACS における LysoPS の産生には、血小板の活性化と ACS において活性化した血小板あるいはアポトーシス変化をうけた血管内皮細胞において細胞表面に露出した PS を基質として、PS-PLA₁により LysoPS が産生されることが考えられた。

心臓カテーテル検査時の大腿動脈血を採取し得た血漿 LysoPS 濃度は、正常冠動脈患者群で $0.066 \pm 0.071 \mu\text{M}$ (平均±標準偏差)、ACS 群では $0.213 \pm 0.317 \mu\text{M}$ (平均±標準偏差)であり[44]、血漿検体は、局所で産生された LysoPS が全身の血液により希釈された値であること、および、前述の LysoPS の産生経路を考慮す

ると、アテローム動脈硬化部位の局所においては、LysoPS 濃度はさらに高値であることが考えられる。

現在のところ、LysoPA 以外の、LysoPS、LysoPI、LysoPG、LysoPE などのグリセロリゾリン脂質の動脈硬化性疾患の病態生理への関わりは明らかではないが、これらのマイナーリゾリン脂質は、LysoPA に変換され、動脈硬化の病態形成に関与している可能性とともに、LysoPA 以外のグリセロリゾリン脂質に対する特異的受容体も同定されつつあることを考えると、直接、動脈硬化形成に関与する細胞に働いている可能性も考えられた。

このような背景により、本研究は、動脈硬化の病態生理におけるマイナーリゾリン脂質の関与について調べるため、動脈硬化形成の鍵となる細胞として、特にマクロファージに注目して調べた。マクロファージは酸化低密度リポ蛋白 (oxLDL) からコレステロールを受け取り、細胞内にコレステロールを蓄積し泡沫細胞となり、動脈硬化部位のプラークへ浸潤し、脂質コアを形成する。また、プラークの破綻の原因となる炎症においても、サイトカインを放出して慢性炎症を起こすとともに、プロテアーゼを産生しプラークの不安定化・破綻を引き起こすなど、重要な役割をもつ[45, 46]。以上から、マウス単球系細胞株である RAW 264.7 細胞とマウス腹腔マクロファージ(MPMs)を用いて、コレステロール蓄積と炎症に関する、マイナーリゾリン脂質のマクロファージに対する影響を

研究した。

【方法】

材料

1-Oleoyl (18:1) LysoPS, stearyl (18:0) LysoPS, 18:1 LysoPA, 1-arachidonoyl (20:4) LysoPA, 18:1 LysoPC, 18:1 LysoPE, 18:1 LysoPI(858143P, 858144P, 857130P, 857125P, 845875P, 846725P, 850100P, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), 1-arachidoyl (20:0) LysoPA (L-0204, Echelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, UT)はメタノールに溶解し-30°Cで保管した。使用する直前にメタノールを窒素ガスで飛ばし、無脂肪酸牛血清アルブミン(A8806, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)を1%添加したPBSに再溶解して使用した。リポポリサッカライド(LPS, 124-05151, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)は終濃度が100 ng/mLとなるように調整して添加した。

RAW 264.7 細胞の培養

RAW 264.7 細胞(JCRB0019, ATCC, Manassas, VA)は10%牛胎児血清(FBS, Gibco BRL, Eggstein, Germany)と1%ペニシリン/ストレプトマイシン(15070-063, Gibco, Grand Island, NY)を含むDMEM(D5796, Sigma Aldrich Co.)を培養液とし、

CO₂ インキュベーター内にて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養を行なった。コレステロール取り込み(図 2, 3)、スカベンジャー受容体の発現(図 5)、XBP-1 スプライシングアッセイ(図 9)に関する実験では、6well の培養プレート(3516, Corning, Inc., NY)に 1.5×10⁶ 細胞/well の濃度で RAW 264.7 細胞をまき、24 時間培養後、実験を開始した。炎症性メディエーターの調節(図 6)、LysoPS 受容体の発現(図 10)の実験では、6well の培養プレート(Corning, Inc.)に 2×10⁶ 細胞/well の濃度で RAW 264.7 細胞をまき、培養 24 時間後から解析を行なった。

マウス腹腔マクロファージの精製

6 週齢の雌の C57BL6/J マウスを CLEA Japan (Tokyo, Japan)から購入し、動物実験室にて 12-12 hour light-dark cycle 下、水と通常のマウス飼育食(MF, Oriental Yeast Co, Tokyo, Japan)を自由に摂取できる環境で飼育した。MPMs は、以下のよう
に作成した。

C57BL6/J マウスにチオグリコール酸培地 I (399-00143, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)を 2 ml/body 腹腔内投与して無菌性炎症を起こし 4 日間飼育した。その後、頸椎脱臼にて安楽死させた後に断頭脱血し、腹膜を露出した状態で腹腔内に PBS を 10ml ずつ注入し、攪拌して腹腔マクロファージを浮遊させ、PBS とともに細胞を回収した。PBS で 3 回遠心洗浄(1500rpm、5 分、4°C)

した後に、FBS 無添加 DMEM に 2×10^6 細胞/well の濃度で加え、6well の培養プレート(Corning, Inc.)にまいた。2 時間後にプレートを 3 回 PBS で洗い、接着していない細胞や赤血球を除き、接着細胞のみを FBS 加 DMEM で培養した。その後は、RAW 264.7 細胞と同じ方法で実験を行なった。すべての動物実験は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受け(リゾリン脂質のマクロファージに対する催動脈硬化性に関する修飾についての検討、承認番号：医 - P11 - 060)、東京大学動物実験実施マニュアルを遵守して行なった。

酸化 LDL の精製とリポ蛋白取り込みアッセイ

LDL は健常人ヒト血清から Beckman 90 Ti ローターを用いた標準的逐次超遠心浮遊法で精製した。血清に塩化ナトリウムを加えて 1.019 比重液を作成し、超遠心分離し(4×10^4 rpm、22 時間、14°C)、カイロミクロン、超低比重リポ蛋白、中間低比重リポ蛋白を取り除いた。残りの検体に塩化ナトリウムを加え 1.063 比重液を作成し、超遠心分離(4×10^4 rpm、22 時間、14°C)し、LDL のみを回収した。4°C の PBS(pH7.4)で 48 時間透析し、PBS で 1 mg protein/mL の濃度に調整した LDL に 5 μ M の硫酸銅を加え、37°C の条件で 20 時間反応させ、酸化した。その後、1mM の EDTA を添加し、氷中で冷却して酸化反応を止め、4°C の 1mM EDTA 加 PBS(pH7.4)で再度、24 時間透析した[47]。

リポ蛋白取り込みアッセイではあらかじめ、それぞれの LysoPS 濃度で 24 時間培養した。その後培養液を、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の酸化 LDL と、vehicle(無脂肪酸牛血清アルブミンを 1% 添加した PBS のみ)または LysoPS を加えた FBS 無添加 DMEM に変え、さらに 24 時間培養した。細胞は 2 回 PBS で洗浄し、培養プレートに接着した生細胞のみを Protease inhibitor cocktail(11836153001, Roche, Mannheim, Germany)を入れた蒸留水の中でホモジナイズし、一部は蛋白濃度測定に用い、また一部は以下に示すようにメタノール/クロロホルムを用いての脂質抽出(Bligh-Dyer 法)に使用した。

細胞内総コレステロール量は、酵素法のキット(439-17501, WAKO Pure Chemical Industries, Osaka Japan)を用いて測定した。蛋白量は、Lowry 法(500-0116JA, BioRad, Hercules, CA.)により測定し、細胞内総コレステロール量を細胞の蛋白量によって補正した[48]。

Bligh-Dyer 法 :

0.4N 酢酸を加え、水溶液 : メタノール : クロロホルム = 1 : 2.5 : 1.25 となるようにメタノールとクロロホルムを加えた。室温で 10 分ごとに攪拌しながら 30 分おき、水溶液 : メタノール : クロロホルム = 1 : 1 : 1 となるようにクロロホルム、蒸留水を加えた。遠心(500g, 5min, 25°C)して二層分離し、下層のみを回収した。回収効率を上げるために、上層部分とクロロホルムが 1 : 1 となるように再度ク

クロロホルムを加え、遠心し下層のみを回収した。窒素ガスでクロロホルムを飛ばし、析出したコレステロールを、10% TritonX-100 を含む 2-プロパノールに再溶解した。

リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量の解析

スカベンジャー受容体の発現(図 5)を評価するために、細胞を vehicle または 1 μ M の LysoPS であらかじめ 24 時間培養した。その後培養液を、vehicle または 1 μ M の LysoPS を加えた FBS 無添加 DMEM に変えた。また、LysoPS 受容体の発現の評価(図 10)では、細胞を LPS 添加または無添加の FBS 無添加 DMEM で培養した。培養 24 時間後に、細胞の RNA を GenElute mammalian total RNA miniprep kit (RTN70-IKT, Sigma-Aldrich Co.)を用いて抽出した後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (FSQ-201, TOYOBO Co., LTD, Osaka, Japan)を用いて逆転写し cDNA を得た。リアルタイム PCR 法は 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA)を用いて施行した。リアルタイム法に用いたハイブリダイゼーションプローブとプライマーは Taqman (Applied Biosystems)で購入した、以下のものを用いた : CD36 (Mm00432403_m1), Macrophage scavenger receptor 1 (MSR1, Mm00446214_m1), oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX1, Mm00454586_m1), Toll-like receptor 4 (TLR4, Mm00445273_m1), purinergic receptor

P2Y, G-protein coupled 10 (P2Y10, Mm02620706_s1), GPR34 (Mm02620221_s1), A630033H20 (Mm01955903_u1), GPR174 (Mm01238430_m1), G2A (Mm02620285_s1). 内在性コントロールとしては GAPDH (Mm 99999915_g1) を使用した。

炎症性メディエーターの発現の評価では、細胞を LPS 添加または無添加の、vehicle または 10 μ M の LysoPS を加えた FBS 無添加 DMEM で培養した。培養 4 時間後に、前述のように細胞の RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行なった。用いたハイブリダイゼーションプローブとプライマーは Taqman より購入した以下のものを使用した : IL-6 (Mm00446190_m1), TNF α (Mm00443260_g1), matrix metalloproteinase 2(MMP-2, Mm00439498_m1), MMP-9 (Mm00442991_m1), Monocyte chemotactic protein-1(MCP-1, Mm00441242_m1). 内在性コントロールとしては 18S (Mm03928990_g1) を使用した。

マクロファージの活性化の評価では、MPMs を LPS 添加または無添加の、vehicle または 10 μ M の LysoPS を加えた FBS 無添加 DMEM で培養した。培養 4 時間後に、前述のように細胞の RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行なった。用いたハイブリダイゼーションプローブとプライマーは Taqman より購入した以下のものを使用した : CD86(Mm00444543_ml), CD163(Mm00474091_ml). 内在性コントロールとしては、マクロファージの共通マーカーである

Emr1(F4/80, Mm00802529_ml)を使用した。

PCR 法による LysoPS 受容体発現の解析

前述のようにして作成した cDNA を、表のプライマーを用いて PCR 法で増幅した後、1%アガロースゲルにて電気泳動した。増幅の条件は、P2Y10、A630033H20、G2A は熱変性：98°C10 秒、アニーリング：64°C30 秒、相補鎖の合成：68°C30 秒を 45 サイクル、GPR34、GPR174、GAPDH は、熱変性：98°C10 秒、アニーリング：58°C30 秒、相補鎖の合成：68°C30 秒を 45 サイクルの条件で行なった。内在性コントロールとして GAPDH を使用した。

Table

Oligonucleotide		Sequence
P2Y10	forward	5' CAGACCTTGCTCATATCCTGTCCTT 3'
	reverse	5' AACGAGTAACAGAGCTTCCATGACG 3'
GPR34	forward	5' TTGGAAACATCATTGCCCTC 3'
	reverse	5' CTTCTGCTTGCTTCACTTTG 3'
A630033H20	forward	5' ATTTTCATATTCATCCCGGGTCTC 3'
	reverse	5' GGATCAAGACAGCAATTCAGATTTG 3'
GPR174	forward	5' TTGTGCCAGGTCTTATAGGG 3'
	reverse	5' CTCTTCTGGCAAAGCAACTC 3'
G2A	forward	5' ATCCTCTTGCTCTGCTGCATTTTC 3'
	reverse	5' ATGTGTTTCAAAGCTCTGTGGGC 3'
GAPDH	forward	5' GCGACTTCAACAGCAACTC 3'
	reverse	5' TGGTCCAGGGTTTCTTACTC 3'

表 使用したプライマーの塩基配列

ウエスタンブロット法による NFκB の活性化の解析

細胞を vehicle または 1 μM、10 μM の LysoPS を加えた FBS 無添加 DMEM で 4 時間培養した。その後、培養プレートを PBS で 2 回洗い、接着している生細胞のみを RIPA バッファー(1M Tris-HCL(pH 7.6), 1% NP40, 10% SDS, 4M NaCl, 0.5% Sodium Deoxycholate, 1mM NaV₃, 2mM PMSF, protease inhibitor cocktail)中にてホモジナイズし、 1×10^4 g で 15 分間遠心して、上清を細胞の全成分の蛋白サンプルとした。RAW 264.7 細胞サンプルは 20 μg、MPMs サンプルは 10 μg を用い、2×サンプルバッファー(0.125M Tris-HCl(pH 6.8), 10% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS, 10% Sucrose, Bromophenol blue)と等量ずつ混ぜた後、90 度で 5 分間加熱することで変性させ、アクリルアミドゲルを用いて分離した後、セミドライ式ブロッキング(15V、20 分間の条件)にてニトロセルロース膜に蛋白を転写した。その後、1 晩 Block-Ace(UK-B80, DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan)でブロッキングし、以下の一次抗体を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1(NKB-201, TOYOBO Co., Ltd, Osaka, Japan)にそれぞれ 1/1000 に希釈して、24 時間反応させた。

一次抗体 : anti-Phospho-NFκB p65 (pSer 536) antibody, anti- NFκB p65 antibody (SAB4504490, SAB4502610, Sigma-Aldrich Co.), anti-Phospho-IκB-α (Ser 32) antibody, anti- IκB-α antibody (#2859S3, #9242, Cell Signaling Technology, Danvers,

MA), and anti- β -actin antibody (PM053, MBL, Nagoya, Japan).

その後、二次抗体：anti-Rabbit IgG antibody(70745, Cell Signaling Technology)を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2(NKB-301, TOYOBO Co.)に 1/1000 に希釈して 3 時間反応させ、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(WBKLS0500, Millipore Co., Bedford, MA)を用いた化学発光法にて、蛋白を ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare Life Science)で検出した。

X-box binding protein-1(XBP-1)スプライシングアッセイ

細胞を vehicle または 1 μ M の LysoPS であらかじめ 24 時間培養した。その後培養液を、vehicle または 1 μ M の LysoPS を加えた FBS 無添加 DMEM に置換した。培養 24 時間後に、細胞の RNA を抽出した後、前述のようにして逆転写して cDNA を作成した。

この cDNA をもとに、プライマー (forward: 5' AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC 3'、 reverse: 5' GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGTTG 3')を用いて、小胞体ストレスによってスプライシングを受ける部位を含む XBP-1 cDNA の一部を PCR にて増幅した後、制限酵素 PstI (1073A, Takara)を加えて 37°C で 6 時間インキュベートした。その後、1%アガロースゲルにて電気泳動した。スプライシングを受けて

いる XBP-1 由来の PCR 産物は制限酵素による切断を受けず(Pst(-))、スプライシングを受けていない XBP-1 由来の PCR 産物は制限酵素により切断される (Pst(+))[48, 49]。よって、Pst(-)は小胞体ストレスがかかっているバンド、Pst(+)は小胞体ストレスがないバンドを意味する。切断されたバンドと切断されていないバンドの比を算出して、XBP-1 のスプライシングの程度について検討した。

統計学的解析

全てのデータは、平均±標準偏差で示した。各データは、2 群間の比較は Student's t 検定で行い、3 群以上の間では、one-way ANOVA を用いて比較し、相違があった場合、多重比較にて各群間を比較した。P < 0.05 であるデータを、統計学的有意差を有するものとみなした(†P < 0.05, *P < 0.01)。

【結果】

LysoPS による RAW 264.7 細胞における oxLDL の細胞内への取り込みについて

リゾリン脂質のマクロファージの泡沫化に対する影響を評価するために、各種 18:1 リゾリン脂質(LysoPA, LysoPC, LysoPE, LysoPS, LysoPI)が細胞内への oxLDL の取り込みにどのような影響を与えるかについて、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞を用いて検討した。図 2A に示すとおり、oxLDL とともに 18:1

LysoPS を投与した群のみ、oxLDL 単独群と比べて、有意に細胞内総コレステロール量が増加した。催動脈硬化作用が報告されている LysoPA よりも、LysoPSの方が有意な細胞内総コレステロール増加量であった。疎水基の種類や結合部位の異なる LysoPA 分子種により薬理作用や受容体活性化作用が異なることから[50, 51]、入手し得た各分子種 LysoPA(18:1 LysoPA, 20:0 LysoPA, 20:4 LysoPA)でも同様に、細胞内総コレステロール量を測定したが、差はみられなかった(図2B)。本研究では、LPS で活性化していない RAW 264.7 細胞での検討はおこなっていない。

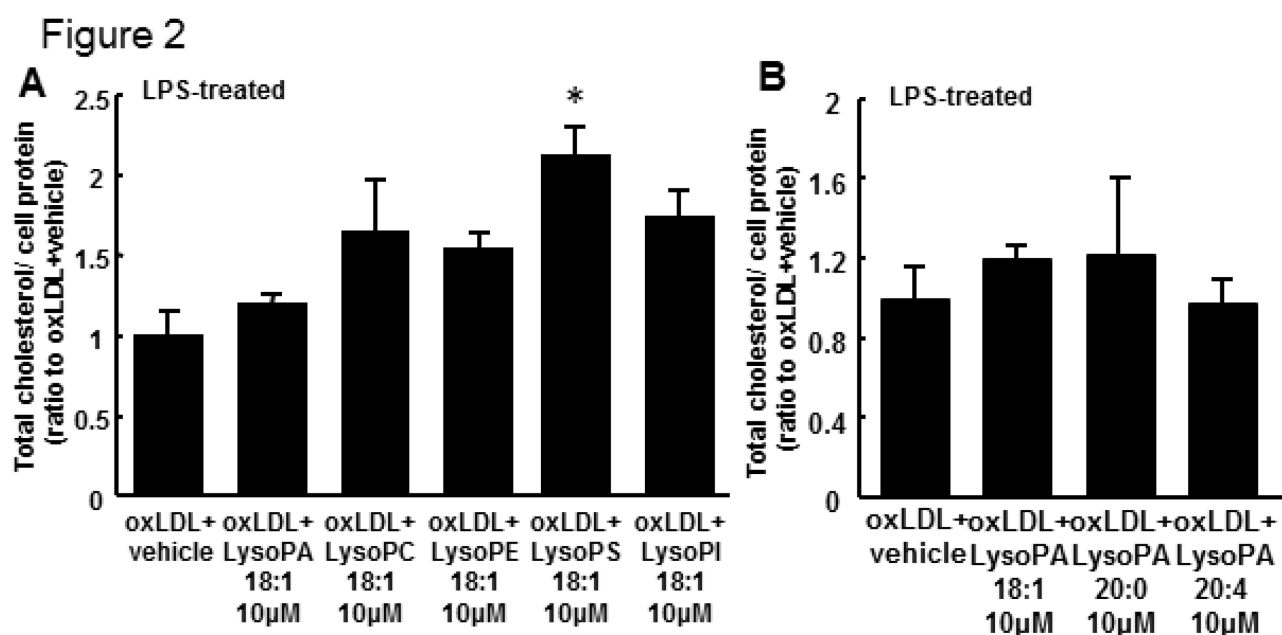


図2 リゾリン脂質投与による、RAW 264.7 細胞における細胞内総コレステロール量について

RAW 264.7 細胞に各種リゾリン脂質 10µM または vehicle(無脂肪酸牛血清アルブミン 1% を添加した PBS のみ) を投与して 24 時間培養し、その後培養液を各種リゾリン脂質または vehicle と、終濃度 100 µg/mL の酸化 LDL を加えた FBS 無添加 DMEM に変えた。24 時間培養後に、細胞内脂質をメタノール/クロロホルムを用いて抽出し、細胞内総コレステロール量を酵素法で測定し、細胞の蛋白量

によって補正した(n=4-6/各群)。A : 酸化 LDL を加えた、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞の細胞内総コレステロールに対する各種 18:1 リゾリン脂質の効果。多重比較により * $P < 0.01$ vs. oxLDL+vehicle. B : 酸化 LDL を加えた、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞の細胞内総コレステロールに対する各分子種 LysoPA の効果。

この結果を受け、以下は、マイナーリゾリン脂質のうち LysoPS に着目して、マクロファージの泡沫化に対する影響を追検討した。図 3A に示すとおり、oxLDL とともに 18:1 LysoPS を投与した群は、oxLDL 単独群と比べて、細胞内の総コレステロール量が有意に増加した。また、細胞内の総コレステロール量の増加は 18:1 LysoPS の容量依存的であった(図 3B)。細胞を LPS で活性化し同様に検討したところ、LysoPS 1 μ M 以上でコレステロール量が増加した(図 3C)。

一方で、RAW 264.7 細胞に oxLDL を加えず、18:1 LysoPS のみを投与した場合には、細胞内の総コレステロール量は変わらなかった(図 3D)。これらの結果から、RAW 264.7 細胞に oxLDL とともに 18:1 LysoPS を加えてみられた細胞内総コレステロール量の増加は、コレステロールの細胞内における合成ではなく、oxLDL の取り込みの増加によるものと考えられた。

18:1 LysoPS のリポ蛋白取り込み効果が oxLDL に特異的かを確認するために、RAW 264.7 細胞に酸化していない LDL を加えて同様に検討した。図 3E に示すとおり、LDL 単独群と LDL とともに 18:1 LysoPS を加えた群に、細胞内コレステロール量の変化はみられなかった。以上より、LysoPS が RAW 264.7 細胞のリ

が蛋白全般に対する貪食能を増強する可能性は除外され、oxLDL 特異的な取り込みを増強することが示唆された。また、LysoPA と同様に、LysoPS にも複数の分子種が存在するため、飽和 LysoPS である 18:0LysoPS についても検討したが、18:0 LysoPS と 18:1 LysoPS では、相違はみられなかった (図 3F)

Figure 3

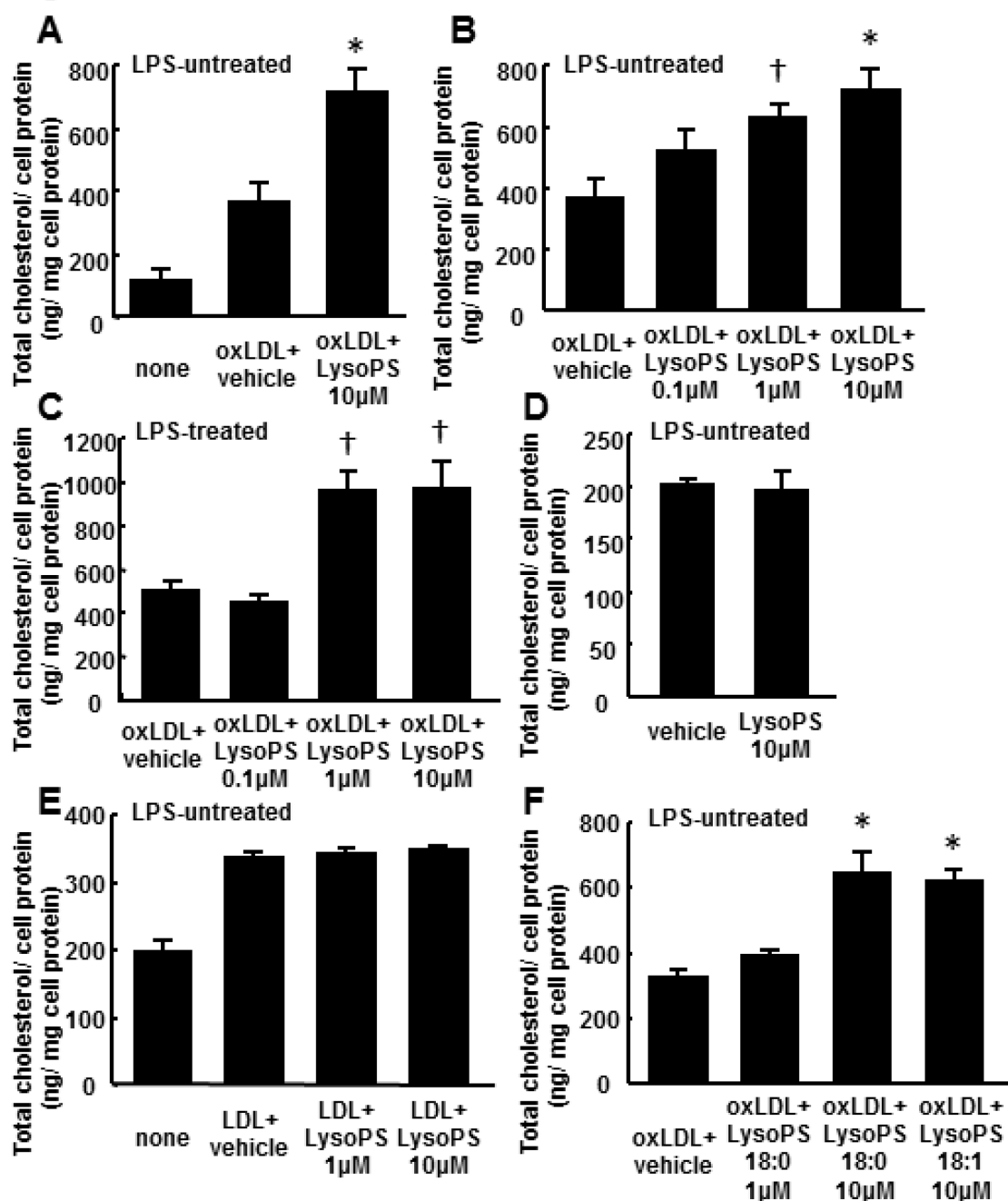


図3 LysoPS による RAW 264.7 細胞における oxLDL の細胞内への取り込みについて

RAW 264.7 細胞に LysoPS または vehicle を投与して 24 時間培養し、その後培養液を LysoPS と、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の酸化 LDL または酸化していない LDL、vehicle のみを含む FBS 無添加 DMEM に変えた。24 時間培養後に細胞内脂質を抽出し、細胞内総コレステロール量を測定し、細胞の蛋白量によって補正した ($n=4-6$ /各群)。A, B: 酸化 LDL を加えた、LPS で活性化していない RAW 264.7 細胞の細胞内総コレステロールに対する LysoPS の効果。“none”は酸化 LDL を加えない、vehicle のみの群をしめす。多重比較により $*P < 0.01$ vs. oxLDL+vehicle, $\dagger P < 0.05$ vs. oxLDL + vehicle. C: 酸化 LDL を加えた、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞の細胞内総コレステロールに対する LysoPS の効果。多重比較により $\dagger P < 0.05$ vs. oxLDL + vehicle. D: 酸化 LDL を加えない条件下で、RAW 264.7 細胞の細胞内総コレステロールに対する LysoPS の効果。E: 酸化していない LDL を加えた、RAW 264.7 細胞の細胞内総コレステロールに対する LysoPS の効果。“none”は LDL を加えない群をしめす。F: 酸化 LDL を加えた、RAW 264.7 細胞の細胞内総コレステロールに対する 18:0 LysoPS と 18:1 LysoPS の効果。多重比較により $*P < 0.01$ vs. oxLDL+vehicle.

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2015;22(5):518-26. より許可を得て転載

LysoPS による MPMs における oxLDL の細胞内への取り込みについて

次に、MPMs を用いて、LysoPS の泡沫化に対する影響を検討した。図 4A に示すとおり、LysoPS を加えると細胞内の総コレステロール量が有意に増加した。細胞を LPS で活性化し、同様に検討したところ、細胞内の総コレステロール量は有意に増加した(図 4B)。以上より、LysoPS は RAW 264.7 細胞と同様に MPMs でも、oxLDL の取り込みを増強させると考えられた。

Figure 4

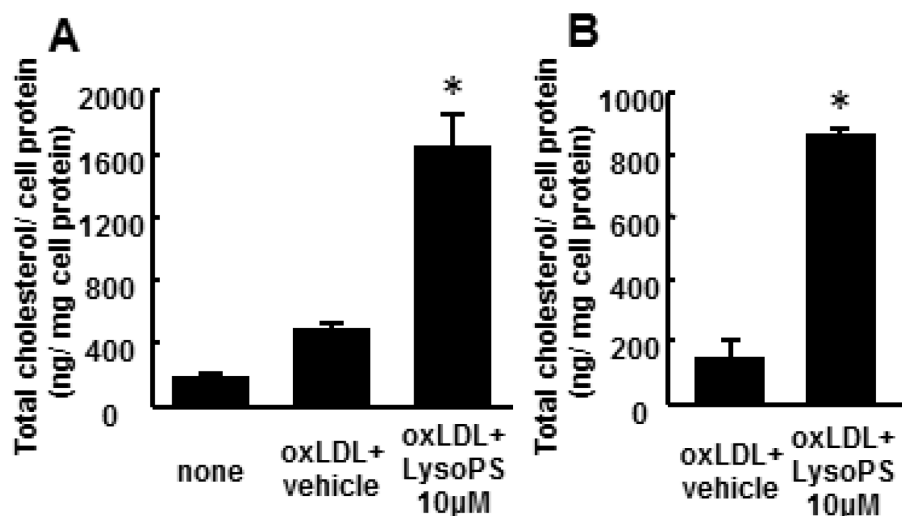


図4 LysoPSによるMPMsにおけるoxLDLの細胞内への取り込みについて
MPMsにvehicleまたはLysoPS 10 µMを投与して24時間培養し、その後培養液を終濃度100 µg/mLの酸化LDLとLysoPS、またはvehicleを加えたFBS無添加DMEMに変えた。24時間培養後に細胞内脂質をメタノール/クロロホルムを用いて抽出した。細胞内総コレステロール量を酵素法で測定し、細胞の蛋白量によって補正した(n=6-9/各群)。A: 酸化LDLを加えた、LPSで活性化していないMPMsの細胞内総コレステロールに対するLysoPSの効果。“none”は酸化LDLを加えない、vehicleのみの群をしめす。多重比較により* $P < 0.01$ vs. oxLDL+vehicle。B: 酸化LDLを加えた、LPSで活性化したMPMsの細胞内総コレステロールに対するLysoPSの効果。Student's t検定により* $P < 0.01$ vs. oxLDL+vehicle。
Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2015;22(5):518-26.より許可を得て転載

LysoPSによるスカベンジャー受容体の発現について

マクロファージが、CD36、MSR1、LOX-1、CXCL16、TLR4/MD-2などのスカベンジャー受容体を介して、細胞内にコレステロールを取り込むことは確立している[45]。従って、LysoPSによるCD36、MSR1、LOX-1、TLR4の発現の調節を、リアルタイムPCR法を用いて調べた。RAW 264.7細胞にLysoPSを加える

と、すべての受容体の発現が、有意に増加することが確認された(図 5)。一方、本研究では、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞や MPMs のスカベンジャー受容体の発現については検討していない。以上より、LysoPS はスカベンジャー受容体の発現を増加させることにより、oxLDL の取り込みを増加させることが示唆された。

Figure 5

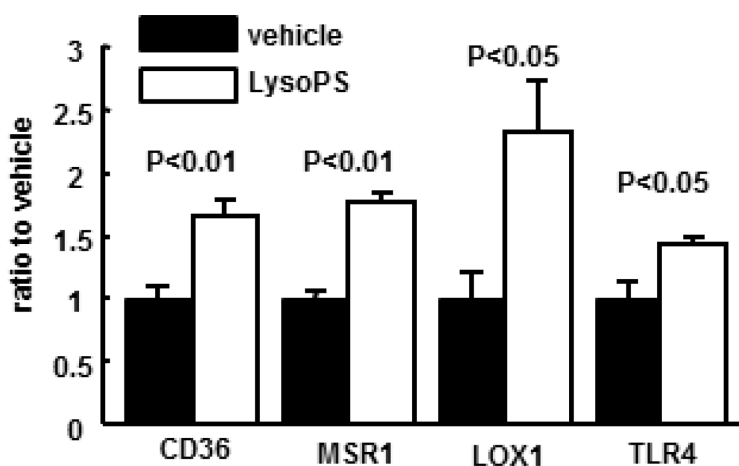


図 5 LysoPS による oxLDL のスカベンジャー受容体の発現について

RAW 264.7 細胞に vehicle または LysoPS 1 μ M を投与して 24 時間培養し、その後培養液を vehicle または LysoPS 1 μ M を加えた FBS 無添加 DMEM に変えた。24 時間後に mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、CD36、MSR1、LOX-1、TLR4 の発現量を解析した。GAPDH を内部性コントロールとして使用した。(n=4/各群)

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2015;22(5):518-26.より許可を得て転載

LysoPS による炎症性メディエーターの mRNA 量の調節について

マクロファージはスカベンジャー受容体を介するコレステロールの取り込み

に加えて、動脈硬化の発症に関与する炎症に対しても重要な役割を果たしている。したがって次に、RAW 264.7 細胞と MPMs を用いて、LysoPS による炎症性メディエーター(IL-6, TNF α , MMP-2, MMP-9, MCP-1)の発現の調節を調べた。LPS で活性化した RAW 264.7 細胞と、LPS で活性化した MPMs で TNF α と MMP-9 の発現が有意に減少し(図 6B, D)、LPS で活性化した MPMs ではさらに、IL-6 と MCP-1 の発現も有意に減少していた(図 6D)。

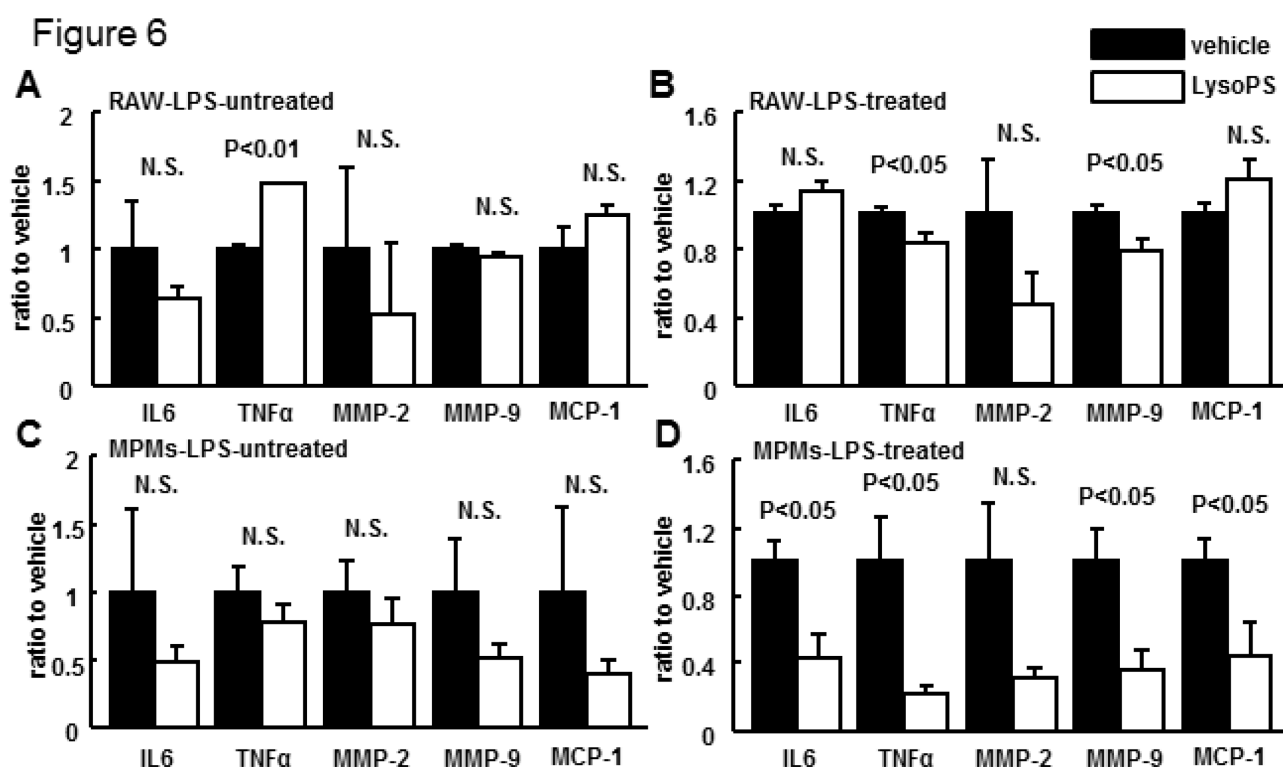


図 6 RAW 264.7 細胞と MPMs における、LysoPS による炎症性メディエーター発現量の調節

LPS で活性化していない RAW 264.7 細胞(A)、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞(B)、LPS で活性化していない MPMs(C)、LPS で活性化した MPMs(D)を vehicle または LysoPS 10 μ M を加えた FBS 無添加 DMEM で培養した。4 時間後に mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、IL-6、TNF α 、MMP-2、MMP-9、MCP-1 の発現量を解析した。18S を内部性コントロールとして使用した。各群間の比較は、Student's t 検定により行った(n=5-6/各群)。

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2015;22(5):518-26.より許可を得て転載

***LysoPS* による NFκB 活性への抑制について**

転写因子 NFκB はさまざまな炎症反応で重要な役割を果たしていることが知られている。p65(RelA)と p50 のヘテロ二量体からなる NFκB は細胞質内で IκB-α と結合することで不活化されている。LPS などの刺激により IκB-α がリン酸化され分解されることにより、NFκB は活性化される。P65 のリン酸化により NFκB はさらに活性化し、核に移行して IL-6、TNFα などの標的遺伝子を発現させる[52, 53]。そこで次に、RAW 264.7 細胞と MPMs を用いて、NFκB 活性に対する LysoPS の効果を調べるために、p65 の Ser536 と IκB-α の Ser32 のリン酸化を調べた。LPS で活性化した RAW 264.7 細胞と MPMs の両方で、LysoPS が p65 と IκB-α のリン酸化を抑制することが確認された(図 7A, B)。したがって、LysoPS が NFκB 活性を抑制することが示唆された。LPS で活性化しない RAW 264.7 細胞、MPMs では、p65 と IκB-α のリン酸化は検出できなかった(data not shown)。

Figure 7

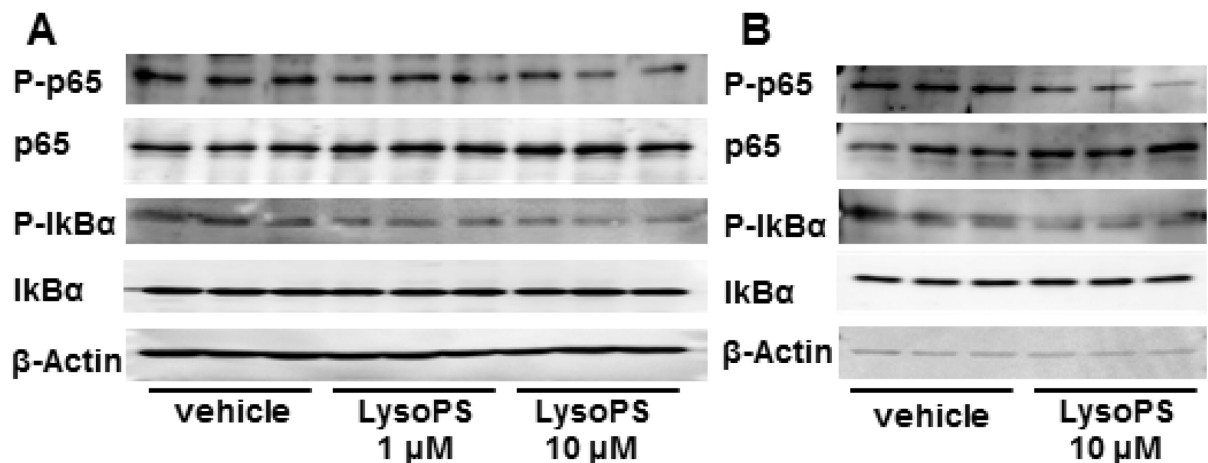


図7 LysoPSによるNFκB活性への抑制について

LPSで活性化したRAW 264.7細胞(A)とLPSで活性化したMPMs(B)にvehicle、LysoPS 1 μMまたはLysoPS 10 μMを加えたFBS無添加DMEMで培養した。4時間後に細胞の蛋白成分を抽出し、ウエスタンブロット法を用いてphospho-p65(Ser536)、p65、phospho-IκB-α(Ser32)、IκB-α、β-アクチンを検出した。(n=3/各群)

LysoPSによるLPSで活性化したMPMsにおける、M2様マクロファージマーカーのmRNA量増加について

LPSで活性化したMPMsにおいて、LysoPSの投与により炎症性メディエーターのmRNA量が有意に減少していた。このことから、LysoPSが抗炎症性に働く新規活性化マクロファージ(M2様マクロファージ)の発現に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、MPMsを用いて、LysoPSによるマクロファージマーカー(CD86:M1様マクロファージマーカー、CD163:M2様マクロファージマーカー)の発現の調節を調べたところ、LPSで活性化したMPMsでM2様マクロ

ファージマーカーである CD163 の発現が有意に増加していた(図 8)。

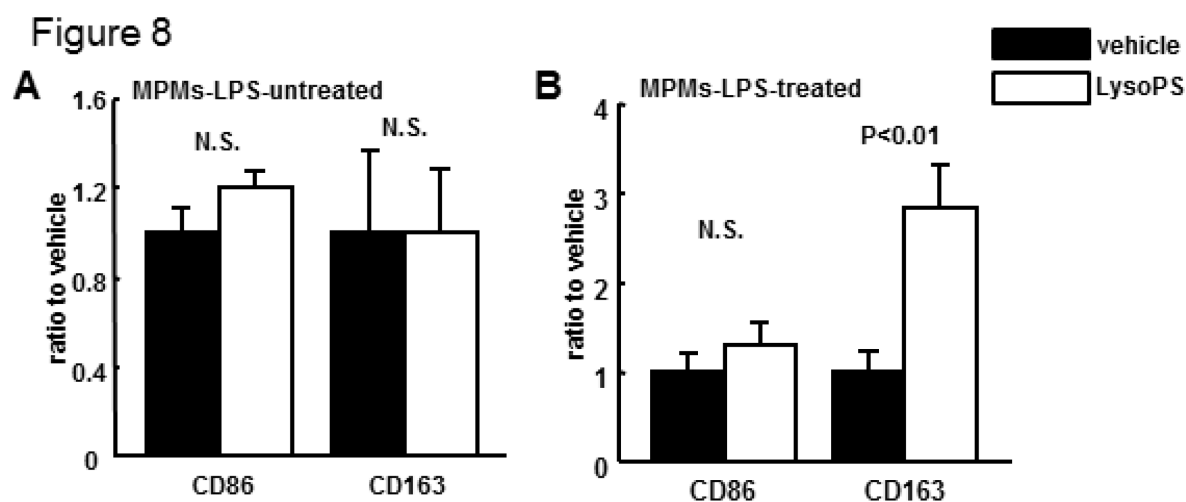


図 8 LysoPS による LPS で活性化した MPMs における、M2 様マクロファージマーカーの mRNA 量増加について

LPS で活性化していない MPMs(A)、LPS で活性化した MPMs(B)を vehicle または LysoPS 10 μ M を加えた FBS 無添加 DMEM で培養し、4 時間後に mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、CD86 : M1 様マクロファージマーカー、CD163 : M2 様マクロファージマーカーの発現量を解析した。マクロファージの共通マーカーである Emr1(F4/80)を内部性コントロールとして使用した。各群間の比較は、Student's t 検定により行った。(n=6/各群)

LysoPS による RAW 264.7 細胞における小胞体ストレス抑制について

最近、小胞体ストレスが、マクロファージによる動脈硬化の発症に関与することが明らかとなった[54]。また、S1P などの一部のリゾリン脂質は小胞体ストレスを変化させると言われている[55]。したがって、RAW 264.7 細胞と MPMs を用いて、LysoPS が小胞体ストレスに与える影響について検討した。RAW 264.7 細胞では、LysoPS 投与により、小胞体ストレスのないバンドの比率が増加した

(図 9)。つまり、LysoPS が RAW 264.7 細胞において小胞体ストレスを抑制することが示唆された。MPMs では、各群間で相違を認めなかった。

Figure 9

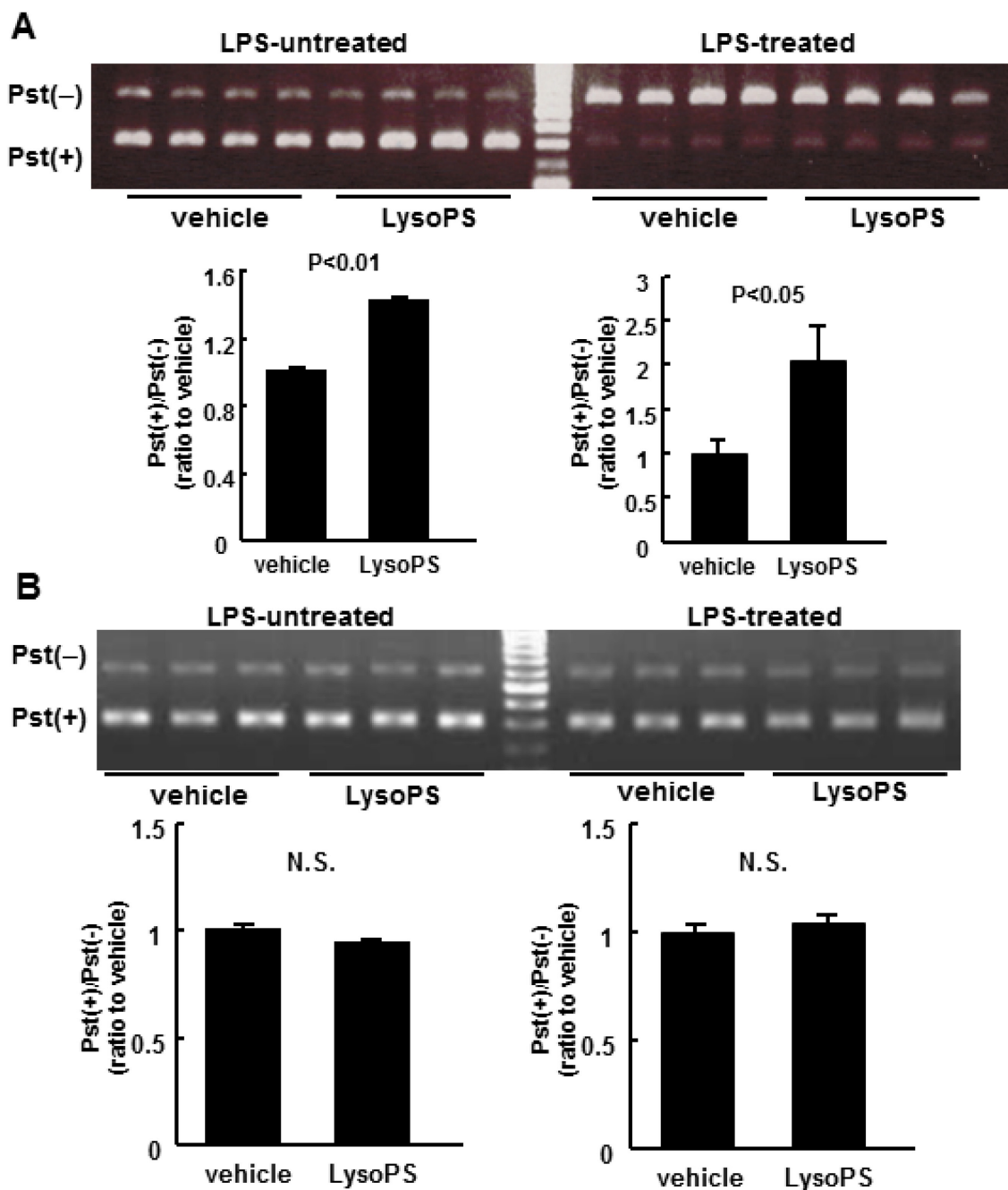


図 9 LysoPS による RAW 264.7 細胞における小胞体ストレス抑制について RAW 264.7 細胞(A)と MPMs(B)に、vehicle または LysoPS 1 μ M を投与して 24 時間培養し、その後培養液を vehicle または LysoPS 1 μ M を加えた FBS 無添加 DMEM に変えた。24 時間後に mRNA を抽出し、LysoPS による ER ストレスの

調節を調べた。Pst(-)は小胞体ストレスがかかり、スプライシングを受ける XBP-1 mRNA 由来のバンドをしめす。Pst(+)は小胞体ストレスがなく、スプライシングを受けていない XBP-1 mRNA 由来のバンドをしめす。左：LPS で活性化していない細胞、右：LPS で活性化した細胞。各群間の比較は、Student's t 検定により行った。(n=3-4/各群)

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2015;22(5):518-26.より一部改変

LPS を投与していない RAW 264.7 細胞、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞、または MPMs における LysoPS 受容体の発現について

上述のとおり、oxLDL 取り込みの増加は、LPS を投与していない RAW 264.7 細胞、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞、LPS を投与していない MPMs、LPS で活性化した MPMs の実験モデルすべてにおいて確認されたが、炎症性サイトカイン、小胞体ストレスに対する効果は実験モデル間で異なっていた。

この実験モデル間の LysoPS の異なる反応を解明するために、それぞれの実験モデルで LysoPS 受容体の発現パターンが異なる可能性について調べた。LPS を投与していない RAW 264.7 細胞、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞、LPS を投与していない MPMs で LysoPS 受容体の発現を調べた。まず、今までに報告されている LysoPS 受容体(P2Y10, GPR34, A630033H20, GPR174)と、LysoPS により活性化しマクロファージの貪食を促進することが報告されている G 蛋白質共役受容体の G2A のすべてが、RAW 264.7 細胞と MPMs の両方で発現していることを確認した(図 10A, B) [56, 57]。次に、LysoPS 受容体の発現をリアルタイム PCR 法

を用いて調べ、受容体の発現量が実験モデル間で大きく異なることが判明した。LPS で活性化した RAW 264.7 細胞では、LPS を投与しない RAW 264.7 細胞と比べて、P2Y10 と GPR174 の mRNA 量は著しく上昇していた一方で、GPR34 と G2A の mRNA 量は著しく低下していた(図 10C, D)。MPMs でも、P2Y10 と GPR174 の mRNA 量は著しく上昇していた一方で、GPR34 と G2A の mRNA 量は著しく低下していた(図 10C, D)。これらの結果より、本研究では LPS で活性化した MPMs の LysoPS 受容体の発現は検討していないが、実験モデル間でみられる LysoPS のさまざまな生物学的効果の違いが、LysoPS 受容体の発現パターンの違いによるものである可能性が考えられた。

Figure 10

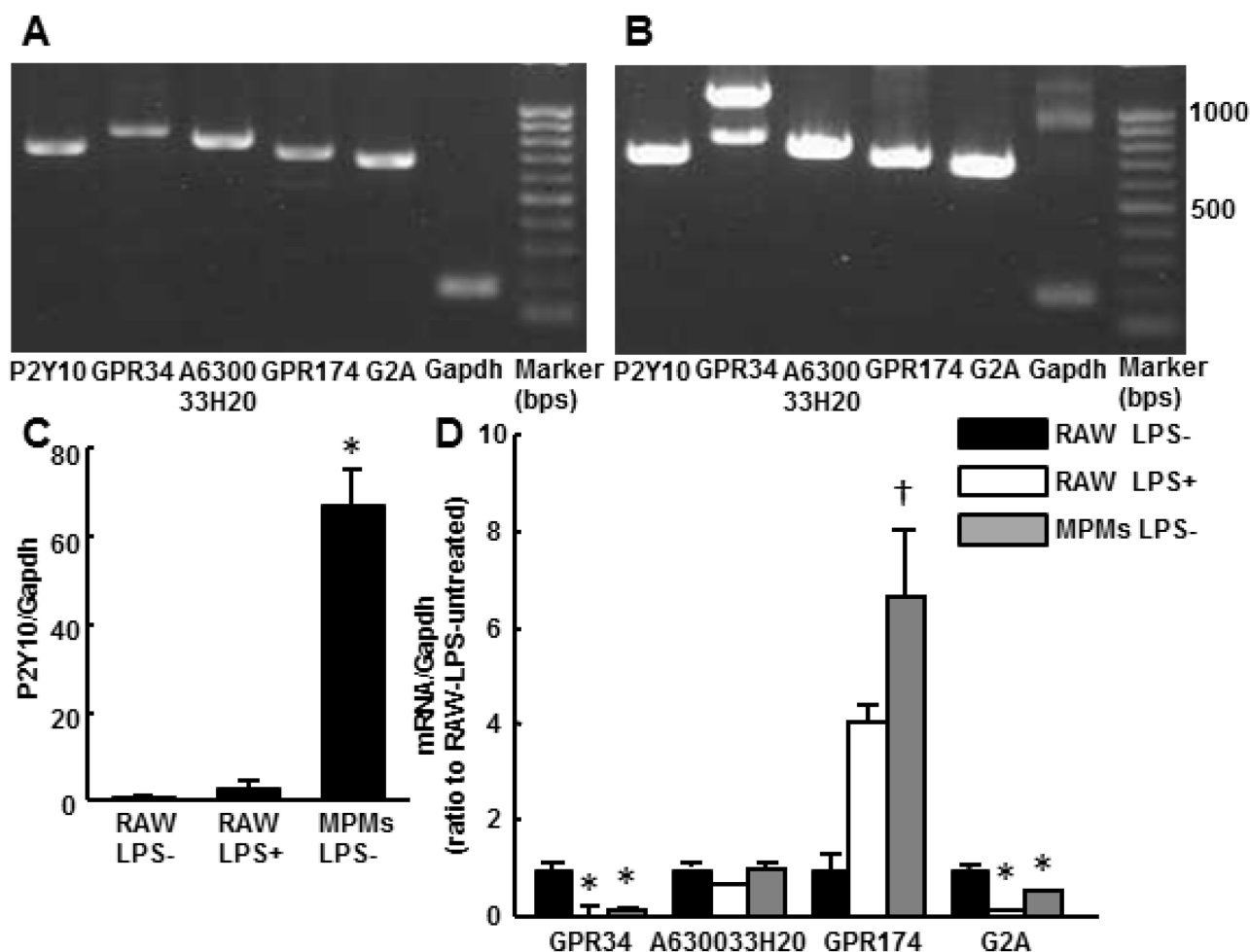


図 10 実験モデルにおける LysoPS 受容体の発現について

RAW 264.7 細胞と MPMs を vehicle または LPS を加えた FBS 無添加 DMEM で 24 時間培養し、mRNA を抽出してリアルタイム PCR 解析を行なった。A : RAW264.7 細胞における既知の LysoPS 受容体(P2Y10、GPR34、A630033H20、GPR174)と G2A の発現。B : MPMs における LysoPS 受容体の発現。C、D : LPS を投与していない RAW 264.7 細胞、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞、LPS を投与していない MPMs の P2Y10 の発現量(C)と、GPR34、A630033H20、GPR174、G2A の発現量(D)。GAPDH を内部性コントロールとして使用した(n=4-6/各群)。多重比較により* $P < 0.01$ vs. LPS-untreated RAW 264.7 cells, † $P < 0.05$ vs. LPS-untreated RAW 264.7 cells.

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2015;22(5):518-26.より許可を得て転載

【考察】

本研究では、動脈硬化の発症に関与するさまざまな要因に対する LysoPS の効果を検討した。そして、(1)LysoPS は oxLDL の取り込みを増強する、(2)LysoPS は LPS で活性化した RAW 264.7 細胞における炎症性メディエーター(TNF α 、MMP-9)の発現、LPS で活性化した MPMs における炎症性メディエーター(IL-6、TNF α 、MMP-9、MCP-1)の発現を抑制する、(3)LysoPS は LPS で活性化した RAW 264.7 細胞と LPS で活性化した MPMs において NF κ B 活性を抑制する、(4)LysoPS は RAW 264.7 細胞において小胞体ストレスを抑制する、ことが示唆された。これらの結果は、LysoPS は泡沫細胞形成に関して催動脈硬化作用を有し、炎症に関しては抗動脈硬化作用を有することを示唆している。

泡沫細胞形成に関して、この研究の結果は、LysoPS がプラーク形成を促進することを示唆している。LysoPS は、G 蛋白質共役受容体のひとつである G2A 受容体を介して、MPMs のアポトーシス細胞の食作用を増強するという報告があるが[20]、本研究では、LysoPS は酸化していない LDL の取り込みは増強しなかった。このことから、LysoPS は単にマクロファージの貪食能を増加するのではなく、受容体を介した oxLDL の取り込みを増強させると考えられた。リゾリン脂質と oxLDL の取り込みに関しては、LysoPA は PPAR の活性化を介して CD36 の発現を増加し、泡沫細胞形成を促進することが知られている[58]。本研究におい

ても、LysoPS は他のスカベンジャー受容体とともに CD36 の発現を増加させた
が(図 5)、CD36 の増加量は LysoPS が直接、潜在的な PPAR アゴニストとして働
く場合に考えられるほど大きくはなく、他のシグナル経路を介している可能性
もある。また、LysoPS が LysoPA に変換され、LysoPA が CD36 の発現を増加さ
せている可能性も考えられたが、LysoPS 添加後の培養液の LysoPA 濃度は、感
度以下であった。

MPMs の実験では、LPS 投与群の方が oxLDL と LysoPS の投与による細胞内
コレステロール含有量の増加が小さいように見えるが、各検討は、同時に行な
ったわけではなく、LDL を採取した健常人の違いによる oxLDL のコレステロー
ル含有量の相違や、マウスの個体差など、実験条件が全く同じではないため、
各実験間で、細胞内総コレステロールの絶対量は比較できない。また、LPS で
活性化した RAW 264.7 細胞や MPMs においては、LysoPS 投与による oxLDL 受
容体の発現の調節はわかっていない。ただし、各実験系において複数回検討を
行い、再現性を得ているため、LysoPS が oxLDL の取り込みを増強させると考え
られる。LPS 投与が、oxLDL の細胞内への取り込みや oxLDL 受容体の発現に対
して、どう作用しているかは、今後の検討課題である。

上述のように LysoPS は催動脈硬化性を有しているが、一方で、LysoPS は炎症
性メディエーターの発現と NFκB 活性、小胞体ストレスを抑制することが示唆

されており、LysoPS のさまざまな抗動脈硬化性の側面も観察された。マクロファージに対する炎症性メディエーターと NF κ B 活性、小胞体ストレスへの LysoPS の影響を調べた既報はないが、動脈硬化性疾患に関与する他の細胞において、炎症性サイトカインや小胞体ストレスに対する LysoPA や LysoPC の影響を調べた報告は複数ある。例えば、LysoPA がケモカイン CXCL1 の放出を促進し、動脈硬化部位の内皮細胞にマクロファージを集積させる[26, 59]。また、LysoPC が催炎症、催接着作用を有するケモカインである IL-8 の発現を促進する[60]、などの報告がある。小胞体ストレスに関しては、LysoPA はマウス間葉性幹細胞において、小胞体ストレスと、小胞体ストレスに関連したアポトーシスを抑制することが報告されている[61]。小胞体ストレス、NF κ B 活性に対する LysoPS の作用に関しても、これから追検討する予定である。

マクロファージはサイトカインにより活性化し、さらに炎症を惹起すると考えられてきたが、現在は抗炎症作用を有するマクロファージの存在が報告されている[62, 63]。マクロファージの活性化には複数種類存在し、既知の IFN- γ や LPS、TNF による古典的活性化経路と、最近わかってきた IL-4 や IL-10、IL-13 による新規活性化経路がある。それぞれの経路で活性化されたマクロファージは異なる作用を有しており、それぞれ M1 様マクロファージ、M2 様マクロファージと呼ばれている。M2 様マクロファージへの LysoPS の影響を調べた既報は

ないが、S1PはMPMsにおいてIL-4を介してM2様マクロファージを増加させるという報告がある[64]。本研究では、LysoPSの投与によりLPSで活性化したMPMsにおいて、M2様マクロファージマーカーのmRNA量が増加した。これは、LysoPSの抗炎症性効果に合致する結果だった。さらに、プラーク形成初期において、M2様マクロファージはM1様マクロファージに比べてより多くのリポ蛋白を取り込む、またM2様マクロファージへの分化によりCD36などのスカベンジャー受容体の発現が上昇する、という報告もあり[65, 66]、本研究の泡沫細胞形成の促進に関しても、M2様マクロファージマーカーのmRNA増加が影響を与えている可能性も考えられる。

LysoPSは、LysoPAやS1Pと同じように、潜在的な脂質メディエーターとして働くと考えられているが[67]、生体内での機能や作用機序に関しては、不明な点が多い。しかし最近、LysoPSの産生酵素や受容体の一部が同定され、遺伝子欠損マウスを用いた実験などからLysoPSの生体内での役割が徐々にわかりつつある。

近年、LysoPS特異的G蛋白質共役受容体が報告され、発見順にLysoPS₁/GPR34、LysoPS₂/P2Y10、LysoPS_{2L}/A630033H20、LysoPS₃/GPR174とよばれている。GPR34は2006年にLysoPSに対して応答性を示すことが報告された受容体で[68]、GPR34ノックアウトマウスにおいて、遅延型過敏症反応の亢進や真菌に対する

易感染性、マクロファージや好中球の遊走異常などを認めることが報告されている[69]。P2Y10、A630033H20、GPR174 は 2012 年に TGF α 切断アッセイ(G 蛋白質共役受容体の活性化を TGF α の切り出しで評価する系)を用いて同定された受容体で[56]、P2Y10 は胸腺や脾臓などの免疫組織に発現が限局しており、活性化 T 細胞において発現が上昇することがわかっている。A630033H20 はヒトを含む霊長類には機能していないが、げっ歯類においては P2Y10 と相同性が高く、発現部位も近いことから、P2Y10 と相補的に機能していると考えられている。GPR174 は特に制御性 T 細胞で発現が高く、T 細胞の増殖抑制や制御性 T 細胞への分化抑制に関与することが示されている[70]。

G2A は 1988 年に報告された受容体で、LysoPS により活性化し、マクロファージのアポトーシス細胞の貪食を促進することが報告されているが[20]、G2A は酸化遊離脂肪酸全体をリガンドとする受容体との報告もあり[71]、最近では LysoPS 特異的受容体ではないと考えられている。

また、LysoPS 受容体特異的アゴニスト、アンタゴニストも開発されてきている。リゾホスファチジルスレオニン(LysoPT : LysoPS のセリンにメチル基を一つ多く持つ、LysoPS の誘導体)の誘導体が合成され、先述の TGF α 切断アッセイの評価を用いて、LysoPS₂ アゴニスト、LysoPS₃ アゴニストとして作用するアナログが見出された[72]。さらに、LysoPS の構造活性相関の解析により、各 LysoPS₁₋₃

を活性化する構造の解明や、各 LysoPS₁₋₃ 選択的アゴニスト活性をしめすケミカルモジュレーターの開発が進められている[73]。S1P₁ と S1P₂ が細胞遊走において拮抗する作用を発揮するなど[74]、各受容体が相反する生理機能を有する可能性があるため、LysoPS そのものの制御ではなく、LysoPS 受容体特異的アゴニスト、アンタゴニストが臨床応用される可能性が考えられている。

LysoPS は以前、活性化血小板やラット腹腔細胞に検出されることが報告されたが、現在は様々な組織や体液に存在することが明らかとなっている。LysoPS の産生経路として、序文で述べたように、細胞外へ分泌された基質特異的酵素 (PS-PLA₁) がホスファチジルセリン(PS) を基質として LysoPS を産生する経路と、細胞内で産生された LysoPS が何らかの機構により細胞外へと放出される経路の二つが想定されている。

通常、PS は細胞内膜側に存在するが、アポトーシス時に外膜へ移行して “eat me” シグナルとして機能し、PS 受容体を介してマクロファージなどに貪食されることが知られている。アポトーシス時の PS スクランブルには、C 末端の細胞内領域がカスパーゼに切断されることで活性化される、6 回膜貫通タンパク質の Xkr8 の関与が報告された[43]。また、PS は活性化血小板の外膜側に露出することもよく知られており、8 回膜貫通タンパク質の TMEM16F がカルシウム依存的スクランブラーゼとして働き、活性化血小板における PS の細胞外露出を促進さ

せることが報告された[42]。PS が細胞外膜側に露出する意義として、細胞貪食の促進と、血液凝固因子の活性化の促進、PS-PLA₁ を介した LysoPS の産生が考えられる。

一方、細胞内で LysoPS が産生される機序については、マウス脳における PS を加水分解する PS リパーゼ活性の本体として ABHD16A が報告された[75]。ABHD16A 欠損マウスにおいて著明な LysoPS 量の減少が認められ、ABHD16A が LysoPS 産生を担う酵素である可能性が考えられた。ABHD16A は膜貫通型タンパク質であり、活性中心は細胞質側を向いていることから、細胞内で PS から LysoPS が産生されることが予想されるが、細胞外への LysoPS の放出機構などは全く分かっていない。

LysoPS の分解経路については、ABHD12 の関与や[75]、前述の LysoPS 産生酵素である PS-PLA₁ が特定の分子種に対するリゾホスホリパーゼ活性を示し、LysoPS の分解に関係している可能性も想定されている[76]。

ヒト検体において、動脈硬化性疾患への LysoPS の関与を評価した研究はほとんどなく、また、ヒト/マウス血漿、血清の LysoPS 濃度に関するデータを入手することは困難である。我々のグループの予備検討では、マウス血漿の LysoPS 値は 30~50 nM、血小板が活性化された状態であるマウス血清の LysoPS 値は 200~300 nM であり、我々が以前報告した S1P でのデータ[77]と同様に、血清の

方が血漿より高値であった。このことは血小板の活性化が、ヒトにおいても、LysoPS 産生と関与している可能性を示唆する。これらの実験結果は、序文で述べた我々が行なった心臓カテーテル検査時の大腿動脈血を採取し得た血漿、血清を用いた臨床研究（血漿 LysoPS 濃度と血漿セロトニン濃度が、有意な正の相関があり、また、ACS 群でのみ、血漿 LysoPS 濃度と血清 PS-PLA₁ 値が有意な正の相関があった。）の結果と矛盾しない。よって、血小板が活性化し、泡沫細胞や血管平滑筋、血管内皮細胞がアポトーシスを受けるアテローム動脈硬化部位の局所における LysoPS 濃度がかなり高値であることが示唆される。さらに、前述の臨床研究で得られた血漿 LysoPS 濃度は、正常冠動脈患者群で 0.066 ± 0.071 μM (平均±標準偏差)、安定狭心症患者では、 0.104 ± 0.110 μM (平均±標準偏差)、ACS 群では 0.213 ± 0.317 μM (平均±標準偏差)であり、アテローム動脈硬化部位の局所においてはさらに LysoPS 濃度が高値であると考えられることから、本研究で用いた LysoPS 濃度(0.1~10 μM)は考えられる範囲の濃度であっただろう。

動脈硬化部位における LysoPS のマクロファージに対する作用は、比較的 LysoPS 濃度の低いプラーク形成期では泡沫細胞形成の促進を、さらに LysoPS が高濃度となるプラーク破綻期では抗炎症をと、LysoPS 濃度や動脈硬化形成の局面により、作用が異なるとも考えられるが、正常冠動脈患者群の LysoPS 濃度が、LysoPS が生物学的活性を持つ濃度に比べて低いこと、正常冠動脈群と安定

狭心症患者間で LysoPS 濃度が変わらないことを考えると、LysoPS は、ACS の病態において主に炎症抑制的（抗動脈硬化的）に働いているものと考察できる。

本研究の限界としては、各検討において検討できていない実験モデルがあり、特に LPS の有無での比較ができない点、原因となる機序の解明にはまだ至っていない点、動脈硬化の発症・進展には様々な因子が関与しているため、動脈硬化形成における断片を見ているにすぎず、血管内皮細胞や平滑筋細胞への影響や、生体内での動脈硬化との関連は不明である点などがあげられる。また、機序まではまだ明らかにできていないが、興味深い発見として、LysoPS の炎症性メディエーターと小胞体ストレスへの影響が、実験モデルによって異なることがわかった。LPS で活性化した MPMs では検討していないが、実験モデル(LPS を投与していない RAW 264.7 細胞、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞、LPS を投与していない MPMs)による LysoPS 受容体の発現パターンの大きな違いが、関与している可能性が考えられるだろう。

本研究によって新たに明らかになった LysoPS の作用や、それぞれの LysoPS 受容体の生理学的役割に関する研究が今後さらに進められることによって、LysoPS 受容体特異的アゴニスト、アンタゴニストの臨床的応用や、疾患バイオマーカーとしての LysoPS の臨床検査への導入が期待される。

まとめると、LysoPS はマクロファージにおいて、泡沫細胞形成を促進する催

動脈硬化作用を有する一方で、炎症性メディエーターの発現や NFκB 活性、小胞体ストレスを抑制し、炎症に関しては抗動脈硬化作用をもつことが示唆された。

最後に、本研究より明らかとなった、動脈硬化部位における、LysoPS のマクロファージに対する作用を図 11 にまとめる。

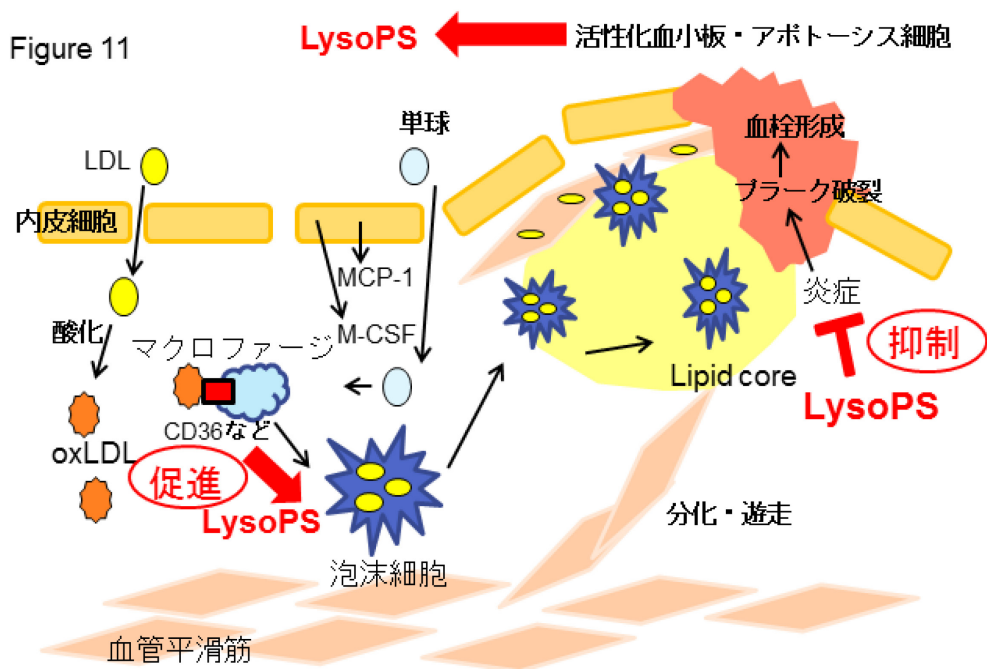


図 11 動脈硬化部位における、LysoPS のマクロファージに対する作用のシエーマ

LysoPS は CD36 を介したマクロファージの泡沫化を促進させるとともに、マクロファージにおける、プラーク破綻の原因となる炎症(炎症性メディエーター・NFκB 活性・ER ストレス)を抑制することが示唆される。

謝辞

本研究に関しまして終始一貫ご指導を賜りました東京大学大学院内科学専攻病態診断医学講座臨床病態検査医学分野 矢富 裕 教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり直接のご指導をいただき、また本論文をまとめるにあたり終始ご指導下さいました東京大学病院検査部 蔵野 信 先生に深く感謝申し上げます。

そして、本研究を進めるにあたり、有益なご指導、貴重なご助言をいただきました東京大学病院検査部 池田 均 先生、東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 青木 淳賢 先生に深く感謝申し上げます。

【引用文献】

1. Dahlof, B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *The American journal of cardiology* 105, 3A-9A (2010).
2. Lloyd-Jones, D.M. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation* 121, 1768-1777 (2010).
3. Contos, J.J., Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D. & Chun, J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13384-13389 (2000).
4. Gennero, I. *et al.* Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone* 49, 395-403 (2011).
5. Inoue, A. *et al.* LPA-producing enzyme PA-PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *The EMBO journal* 30, 4248-4260 (2011).
6. Lee, Z. *et al.* Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Molecular biology of the cell* 19, 5435-5445 (2008).
7. Hama, K. & Aoki, J. LPA(3), a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Progress in lipid research* 49, 335-342 (2010).
8. Deng, W. *et al.* The lysophosphatidic acid type 2 receptor is required for protection against radiation-induced intestinal injury. *Gastroenterology* 132, 1834-1851 (2007).
9. Kita, T. *et al.* Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5928-5931 (1987).
10. Schilling, T. & Eder, C. Importance of lipid rafts for lysophosphatidylcholine-induced caspase-1 activation and reactive oxygen species generation. *Cellular immunology* 265, 87-90 (2010).
11. Martin, T.W. & Lagunoff, D. Interactions of lysophospholipids and mast cells. *Nature* 279, 250-252 (1979).
12. Smith, G.A., Hesketh, T.R., Plumb, R.W. & Metcalfe, J.C. The exogenous lipid requirement for histamine release from rat peritoneal mast cells stimulated by concanavalin A. *FEBS letters* 105, 58-62 (1979).
13. Bellini, F. & Bruni, A. Role of a serum phospholipase A1 in the phosphatidylserine-induced T cell inhibition. *FEBS letters* 316, 1-4 (1993).
14. Lourenssen, S. & Blennerhassett, M.G. Lysophosphatidylserine potentiates

- nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Neuroscience letters* 248, 77-80 (1998).
15. Lee, S.Y. *et al.* Lysophosphatidylserine stimulates chemotactic migration in U87 human glioma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 374, 147-151 (2008).
 16. Park, K.S. *et al.* Lysophosphatidylserine stimulates L2071 mouse fibroblast chemotactic migration via a process involving pertussis toxin-sensitive trimeric G-proteins. *Molecular pharmacology* 69, 1066-1073 (2006).
 17. Yea, K. *et al.* Lysophosphatidylserine regulates blood glucose by enhancing glucose transport in myotubes and adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 378, 783-788 (2009).
 18. Cho, E.Y., Yun, C.H., Chae, H.Z., Chae, H.J. & Ahn, T. Lysophosphatidylserine-induced functional switch of human cytochrome P450 1A2 and 2E1 from monooxygenase to phospholipase D. *Biochemical and biophysical research communications* 376, 584-589 (2008).
 19. Frasch, S.C. *et al.* Signaling via macrophage G2A enhances efferocytosis of dying neutrophils by augmentation of Rac activity. *The Journal of biological chemistry* 286, 12108-12122 (2011).
 20. Frasch, S.C. *et al.* Neutrophils regulate tissue Neutrophilia in inflammation via the oxidant-modified lipid lysophosphatidylserine. *The Journal of biological chemistry* 288, 4583-4593 (2013).
 21. Henstridge, C.M. *et al.* Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 25, 1835-1848 (2011).
 22. Jo, S.H. *et al.* Lysophosphatidylglycerol stimulates chemotactic migration in human natural killer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 147-151 (2008).
 23. Lee, S.Y., Lee, H.Y., Kim, S.D., Shim, J.W. & Bae, Y.S. Lysophosphatidylglycerol stimulates chemotactic migration and tube formation in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 363, 490-494 (2007).
 24. Nishina, A. *et al.* Lysophosphatidylethanolamine in *Grifola frondosa* as a neurotrophic activator via activation of MAPK. *Journal of lipid research* 47, 1434-1443 (2006).
 25. Park, K.S. *et al.* Lysophosphatidylethanolamine stimulates chemotactic migration and cellular invasion in SK-OV3 human ovarian cancer cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptor. *FEBS*

- letters 581, 4411-4416 (2007).
26. Schober, A. & Siess, W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *British journal of pharmacology* 167, 465-482 (2012).
 27. Siess, W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta* 1582, 204-215 (2002).
 28. Yatomi, Y. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 606-611 (2008).
 29. Rother, E. *et al.* Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108, 741-747 (2003).
 30. Bot, M. *et al.* Atherosclerotic lesion progression changes lysophosphatidic acid homeostasis to favor its accumulation. *The American journal of pathology* 176, 3073-3084 (2010).
 31. Siess, W. & Tigyi, G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *Journal of cellular biochemistry* 92, 1086-1094 (2004).
 32. Haseruck, N. *et al.* The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* 103, 2585-2592 (2004).
 33. Pamuklar, Z. *et al.* Individual heterogeneity in platelet response to lysophosphatidic acid: evidence for a novel inhibitory pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 555-561 (2008).
 34. Rizza, C. *et al.* Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79, 1227-1235 (1999).
 35. Lin, C.I. *et al.* Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA1 and LPA3. *Biochemical and biophysical research communications* 363, 1001-1008 (2007).
 36. Tigyi, G. Physiological responses to lysophosphatidic acid and related glycerophospholipids. *Prostaglandins* 64, 47-62 (2001).
 37. Dohi, T. *et al.* Increased circulating plasma lysophosphatidic acid in patients with acute coronary syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 413, 207-212 (2012).
 38. Hosogaya, S. *et al.* Measurement of plasma lysophosphatidic acid concentration in healthy subjects: strong correlation with lysophospholipase D activity. *Annals of clinical biochemistry* 45, 364-368 (2008).
 39. Watanabe, N. *et al.* Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *Journal of clinical gastroenterology*

- 41, 616-623 (2007).
40. Masuda, A. *et al.* Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma. *British journal of haematology* 143, 60-70 (2008).
 41. Kurano, M. *et al.* Possible involvement of minor lysophospholipids in the increase in plasma lysophosphatidic acid in acute coronary syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35, 463-470 (2015).
 42. Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J. & Nagata, S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834-838 (2010).
 43. Suzuki, J., Denning, D.P., Imanishi, E., Horvitz, H.R. & Nagata, S. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science (New York, N.Y.)* 341, 403-406 (2013).
 44. Kurano, M. *et al.* Blood levels of serotonin are specifically correlated with plasma lysophosphatidylserine among the glycerol-lysophospholipids. *BBA Clinical* 4, 92-98 (2015).
 45. Ley, K., Miller, Y.I. & Hedrick, C.C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 1506-1516 (2011).
 46. Woollard, K.J. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clinical science (London, England : 1979)* 125, 221-235 (2013).
 47. Aviram, M. & Vaya, J. Markers for low-density lipoprotein oxidation. *Methods in enzymology* 335, 244-256 (2001).
 48. Kurano, M. *et al.* Plant sterols increased IL-6 and TNF-alpha secretion from macrophages, but to a lesser extent than cholesterol. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 18, 373-383 (2011).
 49. Kurano, M. *et al.* Modulation of lipid metabolism with the overexpression of NPC1L1 in mouse liver. *Journal of lipid research* 53, 2275-2285 (2012).
 50. Yoshida, K. *et al.* Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation* 108, 1746-1752 (2003).
 51. Yanagida, K. *et al.* Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *The Journal of biological chemistry* 284, 17731-17741 (2009).
 52. Brasier, A.R. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovascular research* 86, 211-218 (2010).
 53. Majdalawieh, A. & Ro, H.S. Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators of inflammation* 2010, 823821 (2010).

54. Tabas, I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circulation research* 107, 839-850 (2010).
55. Lepine, S. *et al.* Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell death and differentiation* 18, 350-361 (2011).
56. Inoue, A. *et al.* TGFalpha shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nature methods* 9, 1021-1029 (2012).
57. Frasnich, S.C. & Bratton, D.L. Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation. *Progress in lipid research* 51, 199-207 (2012).
58. McIntyre, T.M. *et al.* Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 131-136 (2003).
59. Cui, M.Z. Lysophosphatidic acid effects on atherosclerosis and thrombosis. *Clinical lipidology* 6, 413-426 (2011).
60. Riederer, M. *et al.* Endothelial lipase (EL) and EL-generated lysophosphatidylcholines promote IL-8 expression in endothelial cells. *Atherosclerosis* 214, 338-344 (2011).
61. Li, Z. *et al.* LPA rescues ER stress-associated apoptosis in hypoxia and serum deprivation-stimulated mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* 111, 811-820 (2010).
62. Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* 73, 209-212 (2003).
63. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686 (2004).
64. Park, S.J. *et al.* Sphingosine 1-phosphate induced anti-atherogenic and atheroprotective M2 macrophage polarization through IL-4. *Cellular signalling* 26, 2249-2258 (2014).
65. van Tits, L.J. *et al.* Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis* 214, 345-349 (2011).
66. Oh, J. *et al.* Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation. *The Journal of biological chemistry* 287, 11629-11641 (2012).
67. Makide, K., Kitamura, H., Sato, Y., Okutani, M. & Aoki, J. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins & other lipid mediators* 89, 135-139 (2009).

68. Sugo, T. *et al.* Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells. *Biochemical and biophysical research communications* 341, 1078-1087 (2006).
69. Liebscher, I. *et al.* Altered immune response in mice deficient for the G protein-coupled receptor GPR34. *The Journal of biological chemistry* 286, 2101-2110 (2011).
70. Barnes, M.J. *et al.* The lysophosphatidylserine receptor GPR174 constrains regulatory T cell development and function. *The Journal of experimental medicine* 212, 1011-1020 (2015).
71. Obinata, H., Hattori, T., Nakane, S., Tatei, K. & Izumi, T. Identification of 9-hydroxyoctadecadienoic acid and other oxidized free fatty acids as ligands of the G protein-coupled receptor G2A. *The Journal of biological chemistry* 280, 40676-40683 (2005).
72. Uwamizu, A. *et al.* Lysophosphatidylserine analogues differentially activate three LysoPS receptors. *Journal of biochemistry* 157, 151-160 (2015).
73. Ikubo, M. *et al.* Structure-activity relationships of lysophosphatidylserine analogs as agonists of G-protein-coupled receptors GPR34, P2Y10, and GPR174. *Journal of medicinal chemistry* 58, 4204-4219 (2015).
74. Kihara, A., Mitsutake, S., Mizutani, Y. & Igarashi, Y. Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Progress in lipid research* 46, 126-144 (2007).
75. Kamat, S.S. *et al.* Immunomodulatory lysophosphatidylserines are regulated by ABHD16A and ABHD12 interplay. *Nature chemical biology* 11, 164-171 (2015).
76. Kelleher, J.A. & Sun, G.Y. Enzymic hydrolysis of arachidonoyl-phospholipids by rat brain synaptosomes. *Neurochemistry international* 7, 825-831 (1985).
77. Ono, Y. *et al.* Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration. *Lipids in health and disease* 12, 20 (2013).