

令和元年5月21日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09234

研究課題名(和文)急性肺傷害におけるリゾリン脂質の解析と同アシル基転移酵素遺伝子導入の効果

研究課題名(英文) Analysis of lysophospholipids in acute lung injury and effect of gene delivery of lysophospholipid acyltransferase

研究代表者

長内 和弘 (OSANAI, Kazuhiro)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70221158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は治療法の少ない、死亡率の高い呼吸器疾患である。その病態生理は急性肺傷害であり、炎症細胞由来の各種炎症惹起性リゾリン脂質が産生される。本研究は生体への抗原性の乏しく遺伝子導入に優れているとされるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、ARDSにおけるリゾリン脂質の役割を明らかにすることを目的とした。今回我々は肺細胞への親和性の高いとされる血清型AAV6.2を新たに作成し、リゾリン脂質アシル基転移酵素遺伝子導入を細胞レベル、動物個体レベルで行った。その結果、リポポリサッカライドによるA549細胞を改善すること、ラット肺への遺伝子導入が可能であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は治療法の少ない、死亡率の高い呼吸器疾患である。本研究は生体への抗原性の乏しく遺伝子導入に優れているとされるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、ARDSにおけるリゾリン脂質の役割を明らかにするとともに、ARDSに新たな治療法の可能性を提供することを目的とした。今回我々は肺細胞への親和性の高いとされる血清型AAV6.2を新たに作成し、リゾリン脂質アシル基転移酵素遺伝子導入を細胞レベル、動物個体レベルで行った。その結果、ARDS細胞モデルで改善が得られること、およびラット肺への遺伝子導入も可能であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is less treatable and highly lethal respiratory disease. The pathophysiology is acute lung injury, in which various proinflammatory lyso-phospholipids are generated from inflammatory cells. The purpose of this study is to clarify role of lyso-phospholipids in ARDS using less antigenic adeno-associated virus (AAV) vector. We have newly made a AAV6.2 serotype which presumably has higher affinity for lung cells and carried out gene delivery of lyso-phospholipid acyltransferase in vitro cell and in vivo animal experiments. We showed that the treatment improve A549 cell injury induced by lipopolysaccharide, and that the AAV vector can deliver the gene of interest into rat lungs.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：急性肺傷害
リゾリン脂質アシル基転移酵素 アデノ随伴ウイルスベクター 遺伝子導入 リポポリサッカライド

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)はいまだに高い死亡率(40-60)%を示す予後不良の重症疾患であり、長年の研究にもかかわらず、低換気量による人工呼吸管理法以外に十分にエビデンスのある有効性を示す治療は開発されていない。薬物療法としてステロイド、好中球エラスターゼ阻害薬、サーファクタント補充療法、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、気管支拡張薬、スタチンなどが試みられたがいずれも十分な治療効果を示すまでにいたらなかった(1)。ARDSの病態生理の主役は肺組織に集積した肺マクロファージや好中球より産生される各種のプロテアーゼ、フリーラジカル、活性脂質などによって引き起こされる急性肺傷害である(1)。

ホスホオリパーゼ A₂ (PLA₂) はグリセロリン脂質を sn-2 位の脂肪酸とリゾリン脂質に加水分解する酵素であり、いくつかのサブファミリーより構成される酵素群を形成している。細胞質型 PLA₂ は細胞膜リン脂質よりリゾリン脂質とアラキドン酸を切り出す。アラキドン酸はさらにリポオキシゲナーゼやサイクロオキシゲナーゼなどによる分解を経てロイコトリエンやプロスタグランジンなど種々の生理活性脂質メディエーター群を産生し、種々の細胞応答や炎症の増悪、消褪に関与する。炎症やストレスにより肺マクロファージなどから分泌型 PLA₂ が分泌され脂肪酸とリゾリン脂質を産生する。急性肺傷害では肺組織に大量に動員された分泌型 PLA₂ が病態形成に重要な役割を担っていることが推定されている(2)。

分泌型 PLA₂ により産生される細胞外リゾリン脂質群は強力な炎症惹起性活性脂質メディエーターである。その中でもリゾホスファチジルコリン(LPC)は他のリゾリン脂質より大量に産生され、経気道的に投与されると急性肺傷害を引き起こすことが知られている。LPC は輸血による急性肺傷害、虚血性脳損傷、虚血性心疾患、消化性潰瘍、肝炎などの多くの臓器障害に関与していることが知られている(3)。われわれは以前より肺サーファクタントと肺Ⅱ型上皮細胞(Ⅱ型細胞)を研究対象にしてきており、ブレオマイシン肺傷害やオレイン酸肺傷害において LPC が増加することをすでに報告している(4, 5)。リゾリン脂質はリゾリン脂質アシル基転移酵素(LPLAT)により再びリン脂質に再合成される。LPC に特異的な LPLAT は、Ⅱ型細胞に特異的に高発現している LPC アシル基転移酵素 1(LPCAT1)であり、肺サーファクタントの主成分であるホスファチジルコリン(PC)の代謝に深く関与しているだけでなくリゾ血小板活性化因子(リゾ PAF)を PAF に変換する lysoPAFAT 活性も発揮する。

2. 研究の目的

肺は肺サーファクタントを合成・分泌し、再利用・分解する特異的臓器であり、リン脂質の代謝が盛んな臓器である。肺サーファクタントの主成分はグリセロリン脂質の PC である。PC はまた細胞膜リン脂質の主要な構成成分でもある。サーファクタント PC はⅡ型細胞でコリンを前駆体にして de novo 経路で合成される。PLA₂ の作用で脂肪酸と LPC に分解されるが、LPCAT1 により LPC から PC へ再合成されるリモデリング経路によっても合成される。急性肺傷害モデルでは PLA₂ 活性が増加し LPCAT 活性が低下するため PC が低下し LPC が増加するが、肺サーファクタント PC が LPC 増加の供給源であることが知られている(6)。

われわれはラット肺にアデノベクターを用いて LPCAT1 を発現させると LPC が減少するとともにオレイン酸肺傷害が抑制されることを報告した(5)。しかし、アデノウイルスは遺伝子導入効率には優れているが肺に無視できない炎症を惹起する欠点がある。またオレイン酸肺傷害は ARDS の主要な原因ではないことから、この結果だけを用いて ARDS における LPCAT1 の役割を外挿することには注意が必要である。アデノ随伴ウイルス(AAV)は臨床試験でも用いられており、炎症をほとんど伴わない長所を持つベクターとして知られている。また ARDS で最も多い原因はエンドトキシン敗血症である。以上より、今回われわれはエンドトキシン肺傷害モデルを作成し、AAV を用いた LPLAT の遺伝子導入の効果を検討することで ARDS におけるリゾリン脂質とその LPLAT の役割を明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

(1) アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター作成

- ・プラスミッドベクター作成：Agilent 社、AAV Helper Free System キットを購入して用いる。これまでの研究でマウス LPCAT1 (N 末端に 6xHis タグを付加) および lacZ 遺伝子を組み込んだアデノベクターを作成済みである。この際に作成した pDC516 プラスミッドより両 cDNA を制限酵素で切り出し、DNA リガーゼで AAV ベクター作成用の pAAV-MCS プラスミッドに組み込む。
- ・組み換えウイルス作成：AAV ウイルスには各種血清型が存在し、それぞれ異なる臓器親和性を示す。

- 市販の AAV ウイルスベクターのなかでは AAV 6 血清型の肺親和性が比較的高いと報告されている(7)。われわれはさらに肺親和性が高いと報告されている AAV6.2 血清型を作成するため、TAKARA 社の PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて AAV6 ベクターに DNA 変異を導入し pRC6.2(F129L) を作成する。pAAV-LPCAT1、pAAV-lacZ(コントロール)のいずれかを pHelper、pRC6.2 プラスミッドとともに AAV-293 細胞に共トランスフェクションする。72 時間後、培養上清を回収する。AAVanced Concentration Reagent (SBI 社、CA、USA)を用いて AAV ウイルス濃縮液サンプルを回収する。AAV ウイルスタイター(vector genome, vg)は Real Time PCR 法にて測定し、使用時まで -80°C で保存する。
- 目的タンパク質発現測定：組み換え AAV ウイルスを感染させた AAV-293 細胞を継時的に回収し、細胞溶解タンパク質について抗 6×ヒスチジン抗体でウェスタンブロットを施行し、目的タンパク質の発現期間を評価する。またコントロール AAV ウイルスは X-gal を基質に lacZ アッセイで確認する。

(2) 肺胞 II 型上皮細胞単離と細胞アッセイ

- ラット II 型細胞単離・培養：II 型細胞株や培養ディッシュに培養した単離 II 型細胞は脱分化し、肺サーファクタントの研究には適していない。そこで Sprague-Dawley (SD)ラットからエラスターゼ消化およびメトリザマイド密度勾配遠心法にて II 型細胞を単離し、これをインサートウェルの内側底側マトリゲル膜上に培養し、途中から上皮側を気相にして、II 型細胞を培養する。この方法により II 型細胞は長期間サーファクタント発現などの分化機能を維持すると報告されている(8)。分化機能は SP-A、SP-B、SP-D の発現をリアルタイム PCR とウェスタンブロットで確認する。
- リゾリン脂質アシル基転移(LPLAT)活性測定：培養 II 型細胞にリコンビナント AAV ウイルスを感染させ、ホモジナイズしマイクロソーム分画を単離する。マイクロソームタンパク質、リゾ PC、 $[1-^{14}\text{C}]$ palmitoyl-CoA を加え 30°C 、5 分間インキュベートし、脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにて PC 画分を回収しシンチレーションカウンターで活性測定する。
- オキシダント(ROS)およびリポポリサッカライド(LPS：エンドトキシン)による II 型細胞ストレス：過酸化水素あるいは LPS の段階的濃度上昇による培養 II 型細胞のアポトーシスを TUNEL 法で解析し、これに及ぼす AAV-LPCAT 1 の効果を観察する。この際、細胞内 LPLAT 1 活性・mRNA 量、細胞内リゾリン脂質量などを測定する。リゾリン脂質は薄層クロマトグラフィー法および液体クロマトグラフ/質量分析計で測定する。

(3) 急性肺傷害実験動物モデル作成

- 6 - 10 週令雄 Sprague-Dawley ラットを用いる。ペントバルビタール腹腔麻酔下に血管用カニューレを気管挿管し、 10^9 pfu に相当する Adenovector-lacZ あるいは 10^9 - 10^{12} vg の AAV-lacZ を注入する。1 日後、3 日後、7 日後に屠殺し、肺を摘出し、左肺を気管支肺胞洗浄(BAL)、右肺上葉をヘマトキシリン・エオジン染色に供し、Adenovector と AAV ベクターによる肺炎症の程度を比較し、AAV ベクターによる炎症惹起性を評価する。また右肺中下葉を用いて X-gal・lacZ 染色を行い Adenovector と AAV ベクターによる lacZ 遺伝子発現の程度を比較する。
- 上記と同様にラットを処置し、気管挿管した後、経気管的に LPS を投与する。24 時間後に左肺で BAL を施行し炎症細胞の程度を評価する。また右肺は乾湿重量比を測定する。いずれか炎症のもっとも強い処置時間を選び以後の実験に用いる。

(4) リゾリン脂質アシル基転移酵素遺伝子導入の実験急性肺傷害へ及ぼす効果

- 上記 3 で得た結果をもとにラットに AAV6.2-LPCAT1 あるいは AAV6.2-lacZ を経気管的に投与する。7 日後、LPS を経気管投与し一定時間後に屠殺し、肺を摘出する。左肺、右肺中下葉、右肺上葉を外科糸で区分して解析に用いる。
- 左肺は気管支肺胞洗浄(BAL)後に切離し急速凍結、BAL 上清液は各種サイトカイン測定(CINC1, TNF α , IL-1 β , RANTES, IL-6 等)、細胞沈査より肺胞腔に浸出した炎症細胞数をカウントする。
- 右肺中下葉は切離し乾湿重量比測定、右肺上葉は 10%中性ホルマリン液で固定する。
- 気管カニューレ挿入後に自発呼吸数測定、動脈血を採取する(直ちに血液ガス分析に使用)。その後、圧量曲線を測定し肺コンプライアンスを計算する。
- 市販のキットを用い肺組織ホモジネートについて各種炎症マーカー(酸素/窒素ラジカル測定、PLA2 活性測定、ミエロペルオキシダーゼなど)を測定する。
- 肺組織より総リン脂質抽出後、リン脂質濃度測定、さらにリン脂質分画を 2 次元薄層クロマトグラフィーにて測定する。
- 右上葉固定肺より組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施行してから急性肺傷害スコアを計測。また別の組織切片に対し TUNEL 法で染色し、アポトーシス細胞を計測する。

4. 研究成果

1) 肺組織親和性の高い血清型 AAV ベクターの構築

pAAV-lacZ (または pAAV-LPCAT1) , pRC6.2, pHelper の各プラスミドを 293 細胞にリン酸 Ca 法を用いて共トランスフェクションした。図 1 下段は pAAV-lacZ, pRC6.2, pHelper をトランスフェクションし 2 日後の 293 細胞、上段はコントロール 293 細胞であり、lacZ アッセイを施行

したものである。下段では約 80%の細胞が lacZ を発現していることが分かる。図 2 は同様にトランスフェクションした 293 細胞とコントロール細胞を蛍光試薬 (SPiDER -βGal) と反応させた後、1:1 で混合しフローサイトメトリーで分析したものである。細胞数と蛍光のピークが 2 つの山に別れ、lacZ を発現している細胞群をコントロール群と区別することが可能である。図 3 はウェスタンブロットである。pAAV-lacZ (または pAAV-LPCAT1) , pRC6.2, pHelper の各プラスミドを同様にトランスフェクションした細胞を溶解液で処理し、一定タンパク量を SDS-PAGE で電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、1 次抗体として抗 His タグ抗体、2 次抗体として HRP-標識抗体を用いた。lacZ を発現させたコントロール細胞に対して LPCAT1 を発現させた 293 細胞溶解液では約 60kDa の抗 His タグ抗体に反応する LPCAT1 と推定されるタンパクの発現がみられる (矢印)。

図 1

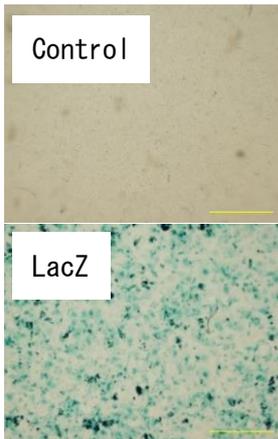


図 2

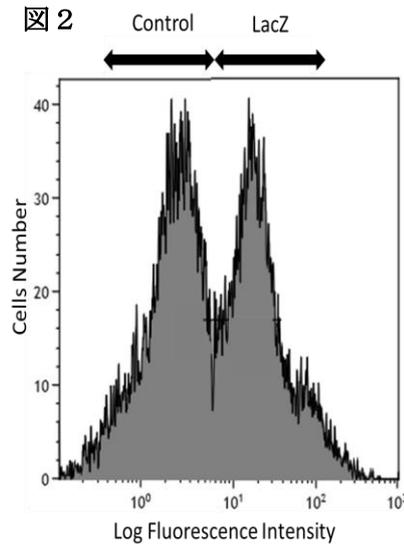
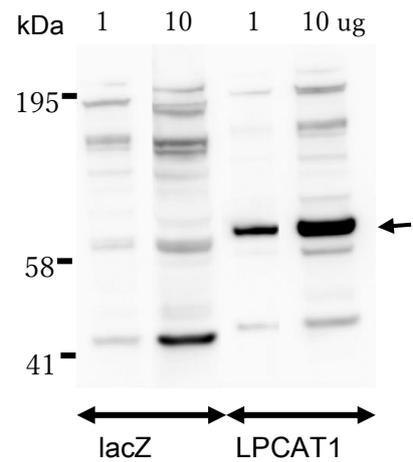


図 3



2) AAV ベクターを用いた LPCAT1 遺伝子導入はリポポリサッカライドによる肺胞 II 型上皮細胞株の細胞障害を抑制する。

図 4 は 48well-plastic plate に培養したヒト肺胞 II 型上皮細胞株 (A549 細胞) (5000 個/well) に 10,000vg/cell の値で AAV6.2-lacZ を感染させ 1 時間培養した。その後段階的に濃度差のある LPS を添加して 4 時間培養した後の細胞障害を CellQuanti-MTT Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) で測定した。図のように 100 ug/ml の LPS で有意な細胞障害が発現することが判明した。次に LPS 200 ug/ml 濃度においてコントロール、AAV6.2-lacZ, AAV6.2-LPCAT1 感染細胞の 3 群間での細胞障害を比較したところ、図 5 のように AAV6.2-LPCAT1 は他の細胞群に対して有意に細胞障害が抑制されることが判明した。すなわち LPCAT1 の遺伝子導入により A549 細胞は LPS による細胞障害が抑制されることが明らかになった。

図 4

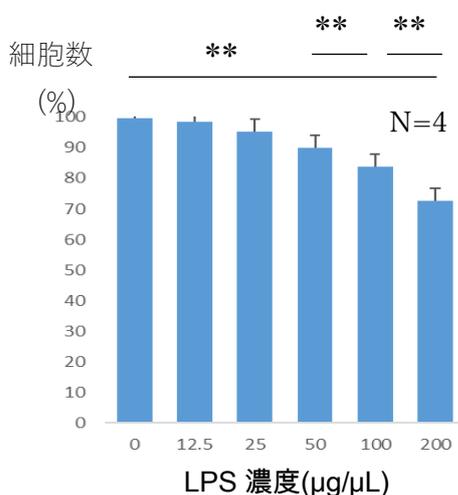
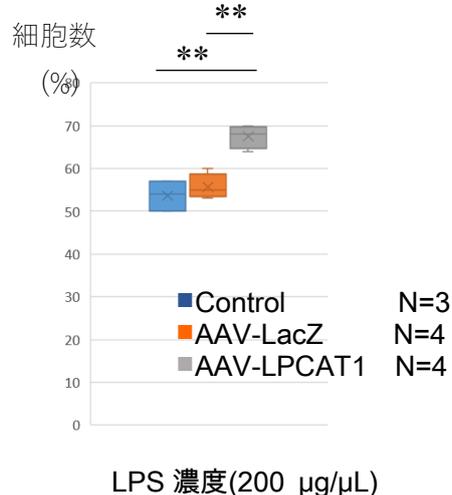


図 5



3) ラット肺への AAV6.2-lacZ を用いた経気管支遺伝子導入効率の解析

図 6 は 6 週令オス Sprague-Dawley ラットに対し、麻酔下気管挿管後に AAV6.2-lacZ を一回注入

7日後に屠殺し心肺を摘出後、経気管的に lacZ アッセイを行った。陽性コントロールとして同様にアデノウイルスベクター-lacZ を投与したものを用意した。アデノウイルスベクター-lacZ 群では 5×10^9 pfu、 5×10^{10} pfu 量とも両肺全体に lacZ の発現がみられる。一方、AAV6.2-lacZ では 10^9 vg では一部肺に lacZ が発現しているが 10^{10} vg では発現範囲の拡大がみられる。アデノウイルスベクターに比し AAV6.2 ウイルスベクターによる lacZ 遺伝子導入効率は低いことが分かった。図7は同様にウイルスベクターを経気管投与7日後に気管支肺胞洗浄を施行し、細胞成分を解析したものである。アデノウイルスベクター投与群では総細胞数が約3倍に増加しており、肺胞マクロファージ、リンパ球、好中球の順が細胞が増加していた。一方、AAV ウイルスベクター投与群ではコントロール群と有意差はみられず、肺内での炎症は起きていないことが判明した。 10^{10-11} vg の AAV ベクターを経気道的に1回投与7日目に 5mg/kg 体重の LPS を経気道投与した。2日後に気管支肺胞洗浄を施行し、肺内への炎症細胞の浸潤を評価した。図8にみるように総細胞数とくに好中球の浸潤が著明にみられたが、AAV6.2-lacZ 投与群と AAV6.2-LPCAT1 投与群の間に有意差はみられなかった。この理由として AAV ベクターによる肺細胞への遺伝子導入効率がアデノウイルスベクターに比して低いところから十分な LPCAT1 の発現が得られていないことが推測される。アデノウイルスベクターに比して AAV ベクターは 293 細胞内で自律的増殖がみられず組換え体そのものしか収穫できない。 10^{11} vg を得るためには 20 ml 培養液/150-mm dish, 約 10 枚分が必要であり、著しく非効率である。今回 AAV ウイルスは肺炎惹起性の少ない優れた *in vivo* 遺伝子導入ベクターであることが分かったが、遺伝子導入効率は十分でないことも判明した。

図6

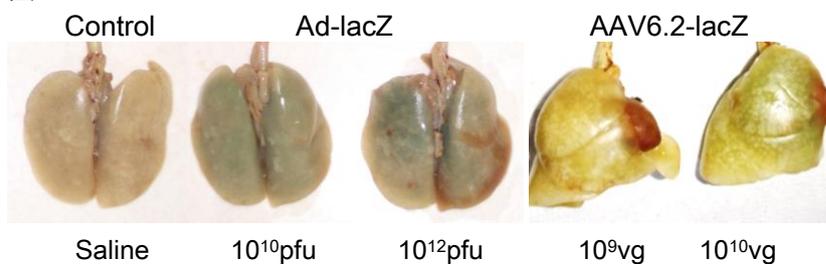


図7

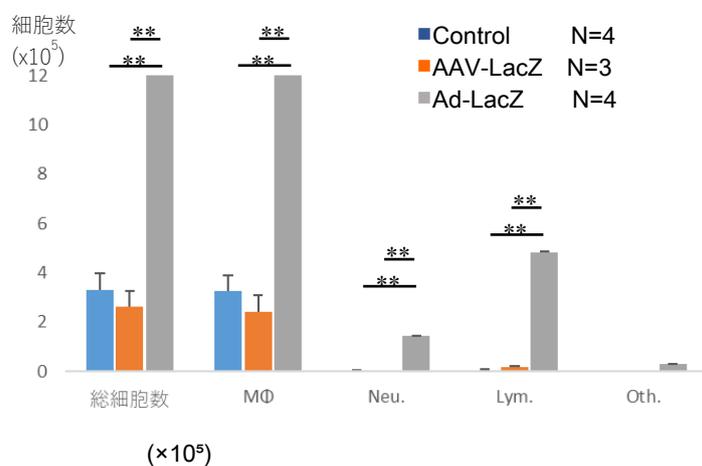
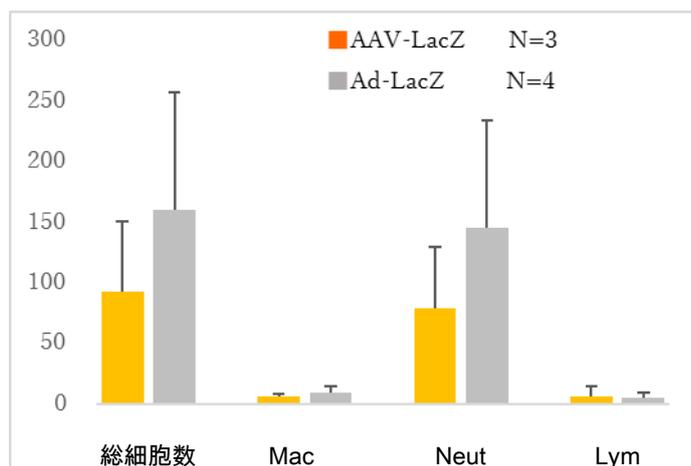


図8



文献

- (1) Matthay MA, et al. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 122:2731-40, 2012.
- (2) Touqui L, et al. A role for phospholipase A2 in ARDS pathogenesis. *Mol Med Today.*5:244-9, 1999.
- (3) Sevastou I, et al. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta.* 1831:2731-40, 2013.
- (4) Osanai K, et al. Changes of lung surfactant and pressure-volume curve in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Appl Physiol.* 70:1300-8, 1991.
- (5) Zhou M, Osanai K, et al. Adenovector-Mediated Gene Transfer of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 1 Attenuates Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Critical Care Medicine*, in press, 2014.
- (6) Arbibe L, et al. Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* 102: 1152-1160, 1998.
- (7) Strobel B, Duechs MJ, Schmid R, Stierstorfer BE, Bucher H, Quast K, Stiller D, Hildebrandt T, Mennerich D, Gantner F, Erb KJ, Kreuz S. Modeling Pulmonary Disease Pathways Using Recombinant Adeno-Associated Virus 6.2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015 53:291-302, 2015.
- (8) Mason RJ, Pan T, Edeen KE, Nielsen LD, Zhang F, Longphre M, Eckart MR, Neben S. Keratinocyte growth factor and the transcription factors C/EBP alpha, C/EBP delta, and SREBP-1c regulate fatty acid synthesis in alveolar type II cells. *J Clin Invest.* 112:244-55, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Kazuhiro Osanai, Keisuke Nakase, Takashi Sakuma, Kazuaki Nishiki, Masafumi Nojiri, Ryo Kato, Masatoshi Saito, Yuki Fujimoto, Shiro Mizuno and Hirohisa Toga. Exogenous gene transfer of Rab38 small GTPase ameliorates aberrant lung surfactant homeostasis in Ruby rats. *Respiratory Research* 査読有 18:70, 2017. DOI 10.1186/s12931-017-0549-2
2. Mizuno S, Ishizaki T, Kadowaki M, Akai M, Shiozaki K, Iguchi M, Oikawa T, Nakagawa K, Osanai K, Toga H, Gomez-Arroyo J, Kraskauskas, Cool CD, Bogaard HJ, Voelkel NF. P53 signaling pathway polymorphisms associated with emphysematous changes in patients with COPD. *Chest* 査読有 152 : 58-69、2017
3. Kato R, Mizuno S, Kadowaki M, Shiozaki K, Akai M, Nakagawa K, Oikawa T, Iguchi M, Osanai K, Ishizaki T, Voelkel NF, Toga H. Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patientw with chronic obstructive pulmonary disease. *Resp Res.* 査読有 17, 139-, 2016
4. Cheng S, Chen H, Wang A, Xie M, Xie J, Osanai K, Zhao J, Xu Y, Xiong W, Zhou M. Lentiviral vector-mediated delivery of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 attenuates airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthmatic mice. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 査読有 33, 320-329, 2015

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. Osanai K, Zhou M, Sakuma T, Nakase K, Nojiri M, Mizuno S, Toga H. Exogenous expression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 attenuates oleic acid-induced acute lung injury in rats 2017 FASEB SRC(New Orleans, USA) (国際学会) 2017年8月
2. 長内和弘 肺サーファクタントの産生・輸送とその異常による疾患 第53回日本肺サーファクタント関連(界面)医学学会学術研究会 2017 新潟市
3. 長内和弘 肺サーファクタント研究の軌跡 — ラブ、チョコレート、ルビーの日々 — 第52回日本肺サーファクタント・界面医学学会学術研究会 2016 石川県内灘町
4. Osanai K, Zhou M, Nojiri M, Nakase K, Kato R, Kobayashi M, Oikawa T, Nakagawa K, Mizuno S, Toga H. Exogenous expression of LPCAT1 attenuates alveolar type II cell apoptosis in oleic acid-induced acute lung injury in rats. *ATS 2015 International Conference.* 2015年5月
5. Osanai K, Nakase K, Nojiri M, Katoh R, Nishiki K, Higashino M, Shinomiya S, Takahara Y, Saitoh M, Fujimoto Y, Kojima K, Nakagawa K, Oikawa T, Mizuno S, Toga H. Exogenous expression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 protect alveolar type II cells from oxidant-induced cell injury. 第51回日本肺サーファクタント・界面医学学会学術研究会 2015 大阪市

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 小林 誠

ローマ字氏名 : KOBAYASHI, Makoto

所属研究機関名 : 金沢医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 助教

研究者番号 (8桁) : 20460355