

令和元年5月28日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09572

研究課題名(和文) 肺サーファクタントの脂肪酸バランスが呼吸器疾患の病態形成に及ぼす役割

研究課題名(英文) Pathophysiological effect of fatty acid composition in pulmonary surfactant on lung diseases

研究代表者

松井 弘樹 (Matsui, Hiroki)

群馬大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号：20431710

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)：肺サーファクタントは肺胞の安定性を維持する界面活性物質で、約9割が脂質、1割がタンパク質で構成されているが、この脂質組成の変化と肺の病態との関連性に関してはほとんど明らかにされていない。我々は脂肪酸の鎖長伸長に關与するElovl6を欠損させたマウスにおいて、喫煙曝露に伴う肺気腫病変が増悪することを見出した。さらにこのマウスでは、肺サーファクタントの脂質組成に關わる酵素や肺気腫病変の形成を左右するタンパクの発現が著明に減少しており、Elovl6の発現変化による脂肪酸組成の不均衡が肺気腫病変の形成に重要な役割をしていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺サーファクタントの合成・機能異常により、肺気腫を呈することが報告されているが、これまで肺サーファクタントタンパクを中心に研究が進んでおり、脂質の病態意義に関しては明らかにされてこなかった。我々の結果から、喫煙刺激によってElovl6の発現や活性が変化し、その変化に伴って肺局所の脂肪酸組成が変化し、肺気腫の病態に影響することから、新たな病態機序の解明や創薬、治療応用へつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary surfactant is essential for the maintenance of proper pulmonary function. It consists of approximately 90 percent of lipids and 10 percent of proteins. However, little is known about the change of lipid composition in the pathogenesis of lung diseases. Then, we focused on the elongase of long chain fatty acids 6, Elovl6, which catalyzes the elongation of long-chain fatty acid. Our data showed deterioration of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in Elovl6-deficient mice. These mice also showed decrease in expression of catalytic enzyme that regulate lipid composition of pulmonary surfactant, or decrease in expression of protein that regulate development of pulmonary emphysema. Our results suggest that deranged fatty acid composition modulated by Elovl6 has a key role in the development of pulmonary emphysema.

研究分野：脂質代謝学

キーワード：脂肪酸組成 肺気腫 喫煙 触媒酵素

## 1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患は肺炎や肺線維症、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) など多彩な病気から成り立っており、いずれの疾患も近年、増加の傾向をたどっている。また、それぞれの疾患に対する効果的な予防・治療法などが確立されていないことから、速やかな病態機序の解明が望まれる。肺サーファクタントは肺胞の安定性を維持する重要な界面活性物質で、約 9 割が脂質、残りの 1 割がタンパク質で構成されており、その脂質の構成成分となるのが脂肪酸である。この肺サーファクタントの合成・機能異常により、肺線維症や肺気腫を呈することが報告されているが、肺サーファクタントに関しては、サーファクタントプロテインなどのタンパク質と病態との関わりを中心に研究が進んでおり、脂質の病態意義に関してはほとんど明らかにされてこなかった。

本研究室ではこれまで、生体内の主要な脂肪酸の成分である炭素数 16・18 の脂肪酸組成と、その組成を調節する酵素として、飽和脂肪酸を一価不飽和脂肪酸へ変換する Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) [図 1]、飽和・不飽和脂肪酸の鎖長を伸長させる役割を持つ Elongation of long-chain fatty acids family member 6 (Elovl6) [図 1] の病態意義に関して研究を行ってきた。我々の研究成果から、肺サーファクタントの合成場所である Ⅱ型肺胞上皮細胞において SCD1、Elovl6 が強く発現しており、特発性肺線維症患者では Elovl6 の発現が著明に減弱していた。また、Elovl6 欠損マウスにプレオマイシンの気管内投与を行うと、肺における脂肪酸バランスの変化により、酸化ストレスやアポトーシスが誘導され、野生型マウスに比べて著明な肺線維症の増悪を呈することを明らかにした (Sunaga H, Matsui H, et al. *Nat. Commun.* 2013)。以上の結果から、肺における脂肪酸の量的・質的バランスの不均衡が呼吸器疾患の病態形成に重要な役割をしていることが示唆された。

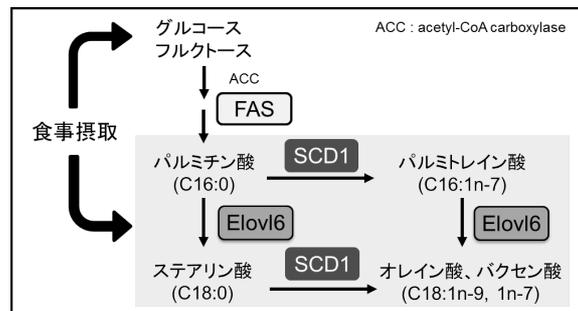


図1 脂肪酸合成系における各酵素の役割

## 2. 研究の目的

本研究では肺気腫などの呼吸器疾患における、脂肪酸含量や組成などの量的・質的バランスの変化と、脂肪酸触媒酵素である Elovl6 の発現・酵素活性を比較検討することで、呼吸器疾患における新たな病態メカニズムの解明と、その予防・治療戦略を開発することを目的とする。具体的には、以下の 4 つの課題を主目的に研究を進めていく。

- (1) 呼吸器疾患の病態モデル動物を作成し、肺機能の変化や病理学的変化などを検討するとともに、肺における脂肪酸含量・組成と機能的変化を検討する
- (2) Elovl6 欠損マウスを用いて、同様の病態モデル動物を作成し、病態形成に違いが認められるか比較検討する
- (3) 呼吸器疾患患者の肺組織および血液中の脂肪酸組成を検討する
- (4) Ⅱ型肺胞上皮細胞における適切な脂肪酸含量・組成を検討し、呼吸器疾患の新規予防・治療戦略の開発を検討する

## 3. 研究の方法

野生型および Elovl6 欠損マウスにマウス用喫煙装置を用いてフィルターレスの実験用タバコ(ケンタッキー大学)を 1 日 2 本ずつ、週 6 日で 2 ヶ月もしくは 6 ヶ月間喫煙させることで、肺気腫モデルを作成した。病態モデルおよび COPD(慢性閉塞性肺疾患)患者の剖検標本から薄切標本を作成し、Elovl6 の発現局在を免疫組織化学染色によって検討した。また、Bligh and Dyer の方法に従って肺組織から脂質を抽出し、脂肪酸分画をガスクロマトグラフィー法にて測定した。さらに、培養 Ⅱ型肺胞上皮細胞 (LA-4) 細胞に siRNA を用いて Elovl6 をノックダウンまたは脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸 各 250 $\mu$ M)を添加することで、病態に関与する遺伝子群の発現を比較検討した。

## 4. 研究成果

我々は、Elovl6 欠損マウスの肺組織において肺胞腔径の著明な拡大や弾性線維の破壊など、気腫化を自然発症していることを見出した[図 2]。X 線 CT 装置による解析から、低吸収領域 (LAA) の割合が大きく、肺気腫病変が進行している傾向が確認された。また、このマウスの肺では野生型マウスと比較して、アポトーシス促進因子 Bax の発現上昇とアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現減少を認めた。さらに、肺気腫の発症に関与すること

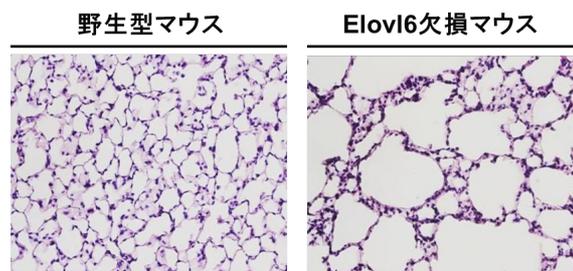


図2 Elovl6 欠損マウスにおける気腫化

が報告されている炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  やマトリックスメタロプロテアーゼ 9 の産生上昇を認めた。

次に、野生型マウスに対して、マウス用喫煙曝露装置により 2 ヶ月および 6 ヶ月間、喫煙曝露を行うことで、肺気腫モデルマウスを作成し、このマウスにおける Elovl6 の発現と脂肪酸組成について検討を行った。免疫組織化学染色の結果から、喫煙曝露 2 ヶ月の標本では、型肺胞上皮細胞における Elovl6 の明らかな発現増加が認められたが、喫煙曝露 6 ヶ月の標本では、2 ヶ月の標本と比較すると発現は減少し、喫煙無処置の標本とほぼ同等の Elovl6 の発現レベルであった。定量的 PCR 法により、Elovl6 mRNA の発現変化を検討したところ、2 ヶ月の喫煙曝露により Elovl6 の発現は 2.7 倍と有意に増加していた一方、6 ヶ月の喫煙曝露では Elovl6 の発現は 0.9 倍と、発現レベルに明らかな差は認められなかった。また、型肺胞上皮細胞のマーカーである SP-C の発現に関しては、喫煙無処置、2 ヶ月、6 ヶ月の標本で顕著な変化は認められなかった。

次に、Elovl6 の発現変化に伴い、肺における脂肪酸組成に変化が認められるか検討したところ、2 ヶ月の喫煙曝露によりパルミチン酸 (C16:0) およびステアリン酸 (C18:0) の有意な減少と、パルミトオレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1n-9) の有意な増加が確認された。しかし、6 ヶ月の喫煙曝露では、いずれの脂肪酸分画においても両群間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、肺気腫の初期段階では、肺組織の型肺胞上皮細胞での Elovl6 の発現が増加することで脂肪酸の鎖長伸長が進み、炭素数 16 の脂肪酸が減少、炭素数 18 の脂肪酸が増加することで、肺気腫の病態に影響することが推察された。一方、肺気腫の慢性期では、肺組織の型肺胞上皮細胞における Elovl6 は肺気腫発症前の発現レベルに戻り、肺組織における脂肪酸組成にも変化が認められないことが示唆された。

肺気腫の病態形成の段階で Elovl6 の発現変化が認められることから、Elovl6 欠損マウスに喫煙曝露させ、肺気腫病変の程度を比較検討してみたところ、野生型マウスと比較して肺胞腔の拡大、弾性線維の破壊など気腫化病変が増悪している傾向が認められた。両群のマウスにおける脂肪酸組成を比較検討してみたところ、Elovl6 欠損マウスでパルミチン酸分画の増加、オレイン酸分画の減少を認めたが、喫煙のあり・なしではほとんど差を認めなかった。そこで、詳細な脂質組成を検討するため、肺サーファクタントのリン脂質に着目した。肺サーファクタントは飽和脂肪酸であるパルミチン酸が 2 つ結合したジパルミトイルリン脂質 (DPPE)、パルミチン酸と一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸が結合したパルミトオレイルリン脂質 (POPE) が主成分である。このリン脂質の生合成に関与する酵素として、リゾフォスファチジルコリン (LPC) に脂肪酸-CoA を添加して、様々な脂肪酸種のついた PC の生成に関与する LPCAT に着目し、特に C16:0 を基質としている LPCAT1、C18:1 を基質としている LPCAT4 について検討した。この LPCAT1、LPCAT4 は発現低下に伴い、肺傷害が増悪することが報告されている (Harayama T, et al. *Cell Metab.* 2014)。そこで我々のモデルマウスにおいても、肺における発現を検討した結果、喫煙曝露させた Elovl6 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、LPCAT1、LPCAT4 の発現が著明に低下していることを見出した。Elovl6 欠損マウスでは脂肪酸の鎖長伸長が行われず、飽和脂肪酸が増加、一価不飽和脂肪酸が減少するが、LPCAT1 の発現量は減少、LPCAT4 も減少するという結果になり、飽和脂肪酸ホスファチジルコリンと一価不飽和脂肪酸ホスファチジルコリン、どちらの合成量も減少する可能性が示唆され、これが肺気腫病変の悪化に関係している可能性が示唆された。

さらに我々は、Elovl6 欠損マウスで喫煙曝露による肺気腫が増悪するメカニズムを詳細に明らかにするため、RNA シークエンスを行ったところ、肺気腫病変の形成を左右するタンパク X が著明に減少していることを明らかにした [図 3]。現在、このタンパク X を標的として、動物モデルへの遺伝子導入による病態解析を行っており、タンパク X を制御する責任脂質を標的とした新規の創薬、予防・治療応用への可能性を検討中である。

以上より、我々は肺における飽和・不飽和脂肪酸組成の不均衡が肺線維症や肺気腫の病態形成に重要な役割をしており、その組成を調節している Elovl6 は呼吸器疾患の重要な標的因子であることを明らかにした。これらの結果から、食事の脂肪酸の組成やバランス、肥満や痩せ、糖尿病などに伴う体内の脂肪酸組成の変化が病態発症に関わる可能性が考えられ、今後は臨床研究や疫学調査などからその因果関係を解明していく。さらに、脂肪酸組成の変化に伴う肺サーファクタントの量的・質的变化と肺線維症・肺気腫との関わりや、Elovl6 の発現や活性を制御する食事成分、薬剤の解明など、呼吸器疾患予防・治療の新しいアプローチの可能性を検討していきたい。

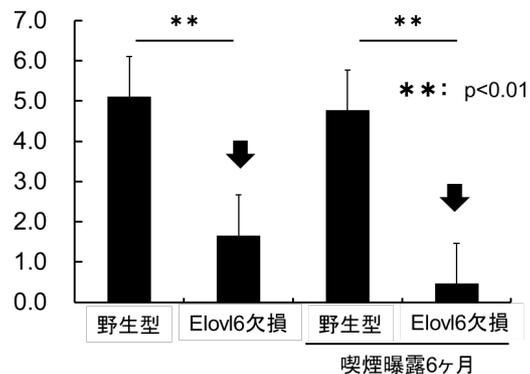


図 3 各マウスにおける血中 X タンパクの濃度

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Masubuchi H, Matsui H. (他 10 名, 7 番目) Reduced transient receptor potential vanilloid 2 expression in alveolar macrophages causes COPD in mice through impaired phagocytic activity. *BMC Pulmonary Medicine* 査読有 19:70. 2019. doi: 10.1186/s12890-019-0821-y
2. Iso T, Matsui H. (他 8 名, 5 番目) Exercise endurance capacity is markedly reduced due to impaired energy homeostasis during prolonged fasting in FABP4/5 deficient mice. *BMC Physiology*. 査読有 19:1 2019. doi: 10.1186/s12899-019-0038-6
3. Obokata M, Matsui H. (他 8 名, 5 番目) Early increase in serum fatty acid binding protein 4 levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 査読有 7(6) 561-9. 2018 doi: 10.1177/2048872616683635
4. Iso T, Matsui H. (他 12 名, 4 番目) CD36 is indispensable for nutrient homeostasis and endurance exercise capacity during prolonged fasting. *Physiol Rep*. 査読有 6(19):e13884. 2018. doi: 10.14814/phy2.13884
5. Umbarawan Y, Matsui H. (他 13 名, 11 番目) Myocardial fatty acid uptake through CD36 is indispensable for sufficient bioenergetic metabolism to prevent progression of pressure overload-induced heart failure. *Sci Rep*. 査読有 8(1):12035. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-30616-1
6. Umbarawan Y, Matsui H. (他 14 名, 11 番目) Glucose is preferentially utilized for biomass synthesis in pressure-overloaded heart: Evidence from fatty acid binding protein-4 and -5 knockout mice. *Cardiovasc Res*. 査読有 114(8):1132-1144. 2018. doi: org/10.1093/cvr/cvy063
7. Makino T, Matsui H. (他 14 名, 3 番目) Health science students' attitudes towards healthcare teams: A comparison between two universities. *J Interprof Care*. 査読有 32(2):196-202. 2018. doi: 10.1080/13561820.2017.1372396
8. Iso T, Matsui H. (他 10 名, 3 番目) Serum levels of fatty acid binding protein 4 and fat metabolic markers in relation to catecholamines following exercise. *Clinical Biochemistry*. 査読有 50, 896-902, 2017. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.05.021
9. Umbarawan Y, Matsui H. (他 15 名, 6 番目) Robust suppression of cardiac energy catabolism with marked accumulation of energy substrates during lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in mice. *Metabolism*. 査読有 pii: S0026-0495(17)30233-0. 2017. doi: 10.1016/j.metabol.2017.09.003.
10. Sunaga H, Matsui H. (他 8 名, 2 番目) Elovl6-driven Fatty Acid Metabolism Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype through AMPK/KLF4 Signaling. *J Am Heart Assoc*. 査読有 5(12). pii: e004014. 2016. doi: 10.1161/JAHA.116.004014
11. Nakahara T, Matsui H. (他 7 名, 3 番目) Fibroblast growth factor 23 inhibits osteoblastic gene expression and induces osteoprotegerin in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 査読有 253:102-110. 2016. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.010.
12. Lee B, Matsui H. (他 7 名, 6 番目) A plan for embedding an interprofessional education initiative into an existing program in a Southeast Asian university. *J Interprof Care*. 査読有 30(3):401-3. 2016. doi: 10.3109/13561820.2016.1149156.

[学会発表](計 17 件)

1. Furukawa S, Matsui H. Genetic deletion of fatty acid synthase in vascular smooth muscle cell ameliorates monocrotaline-induced PAH in mice. 第 83 回日本循環器学会総会・学術集会. 2019
2. Tadaki S, Matsui H. Deranged fatty acid composition by Elovl6 regulates cardiac inflammation and fibrosis after pressure overload in mice. 第 83 回日本循環器学会総会・学術集会. 2019
3. Kon Y, Matsui H. AMPK-KLF4 signaling activated by the change of intracellular FA composition regulates mitochondrial integrity. 第 83 回日本循環器学会総会・学術集会. 2019
4. Matsui H. Genetic deletion of Elovl6 in cardiac myocytes suppresses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and remodeling through activation of AMPK-KLF4 signaling. American Heart Association Scientific Session 2018.
5. 松井 弘樹. 脂肪酸組成および脂肪酸伸長酵素 Elovl6 が心肥大・心不全の病態に及ぼす影響. 第 25 回日本未病システム学会学術総会 2018
6. Sunaga H, Matsui H. Elovl6-driven fatty acid metabolism regulates hypertrophic response in the heart subjected to pressure overload in mice. 第 82 回日本循環器学会総会・学術集会 2018
7. Matsui H. Inhibition of fatty acid synthase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation: potential therapeutic target in atherosclerosis. 第 82 回日本循環器学会総会・学術集会 2018

8. 須永 浩章, 松井 弘樹. 脂肪酸伸長酵素 Elovl6 により調節される脂肪酸代謝は圧負荷誘導性の心肥大を制御する. 第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2017
9. 松井 弘樹. 脂肪酸合成酵素 FAS は血管平滑筋細胞の増殖と新生内膜肥厚の形成に重要である. 第 25 回日本血管生物医学会学術集会. 2017
10. 松井 弘樹. 肺気腫病変にもたらず脂肪酸組成と調節酵素 Elovl6 の病態意義. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会 2017
11. 松井 弘樹. 喫煙曝露の肺における脂肪酸組成および Elovl6 の発現変化と病態意義. 第 24 回日本未病システム学会学術総会 2017
12. 松井 弘樹. 脂肪酸の量と質の変化から未病を考える. 第 57 回 日本臨床化学会年次学術集会 シンポジウム 3 「複雑系疾患と未病対策」 2017
13. 松井 弘樹. 肺線維症・肺気腫の発症における脂質バランス異常の意義. 第 53 回サーファクタント関連医学会 教育講演. 2017
14. Oshima N, Matsui H. Genetic deletion of fatty acid synthase in vascular smooth muscle cell suppresses injury-induced neointima formation in mice. 第 81 回日本循環器学会総会・学術集会 2017
15. Oshima N, Matsui H. Inhibition of fatty acid synthase plays a protective role in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. American Heart Association Scientific Session 2016
16. Matsui H. Intracellular fatty acid balance regulated by Elovl6 plays a notable phenotypic response of vascular smooth muscle cells via AMPK-KLF4-dependent signaling. American Heart Association Scientific Session 2016
17. 松井 弘樹. 脂肪酸合成酵素 FAS は動脈硬化の初期病変である新生内膜肥厚の形成に重要である. 第 23 回日本未病システム学会学術総会 2016

〔図書〕(計 1 件)

1. 小池 弘人, 山本 広高, 松井 弘樹. 平成出版. 医の智の会話 ジャングルカンファレンス 実践編 2017 年 50~67 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学大学院保健学研究科  
 生体情報検査科学講座 横山・松井研究室  
<http://heart.health.gunma-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：横山 知行  
 ローマ字氏名：YOKOYAMA TOMOYUKI  
 所属研究機関名：群馬大学  
 部局名：大学院保健学研究科  
 職名：教授  
 研究者番号(8桁)：70312890

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：倉林 正彦  
 ローマ字氏名：KURABAYASHI MASAHIKO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。