

平成30年6月12日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18870

研究課題名(和文) リゾホスファチジン酸受容体LPA3による新規迷走神経制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of novel LPA3-mediated activation of vagal afferent nerve

研究代表者

可野 邦行 (Kano, Kuniyuki)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：50636404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Imaging MS、LC-MS/MS解析から、心筋梗塞時に梗塞部位特異的にドコサヘキサエン酸(DHA)型LPAが産生されることが明らかとなった。このDHA-LPAの産生は既存のLPA産生酵素であるオートタキシン(ATX)には依らない機構であり、新たなLPA産生機構の存在が示唆された。LPA3受容体による迷走神経を介した機能として、これまでに見出した心抑制に加え、呼吸機能の制御を明らかにした。また、その過程で、LPA3作動薬の迷走神経に依存しない様々な薬理作用を見出した。これによって個体における新たなLPA3の生理機能が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Imaging MS and LC-MS/MS analysis revealed that lysophosphatidic acid (LPA) containing docosahexaenoic acid (DHA (22:6)) was selectively elevated in the ischemic heart. Administration of autotaxin (ATX) inhibitor did not affect the increase of DHA-LPA, suggesting that DHA-LPA was produced in ATX-independent manner. LPA3 agonist induced a transient apnea and a prolonged hypopnea, which is resulted from activation of vagus nerve. We also found novel pharmacological action of LPA3 agonist independent on vagus nerve.

研究分野：生理活性脂質

キーワード：リゾホスファチジン酸 迷走神経 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

迷走神経は抹消組織における何らかの異変を感知し、反射反応によって定常時の組織機能の恒常性を維持している。迷走神経は様々な疾患時においても機能しており、炎症性疾患時には抗炎症作用を誘導する。また、迷走神経の活動には個人差があり、例えば、迷走神経の活動が活発でないと、心筋梗塞後の予後が悪いことが報告されている。このような知見から近年、様々な疾患に対して迷走神経を刺激する治療戦略に関心が高まっており (*Nature News* 2014)、心筋梗塞やてんかんの治療に埋め込み型電極による迷走神経を刺激する電気パルス療法が実用化されつつある。一方で、病態時の末梢組織では何らかの内因性分子が迷走神経末端を刺激すると考えられるが、その内在性因子の実態は不明な点が多く残されている。申請者は最近、脂質メディエーターの一つであるリゾホスファチジン酸 (LPA) が新規迷走神経制御因子であることを見出した。

LPA は代表的なリゾリン脂質であり、オータコイド性の生理活性脂質・脂質メディエーターとして細胞膜上の 6 種類の LPA 受容体 (LPA₁₋₆) を介し様々な生命現象に関与する。研究代表者は、LPA₃ 受容体の生理機能を解析する過程で、マウスに LPA₃ 作動薬を静注すると、降圧・徐脈といった、迷走神経興奮時に見られる典型的な作用が誘導されることを見出した。この作用は LPA₃ ノックアウト (KO) マウスでは全く観察されず、迷走神経の外科的切断及び求心性神経の不活化によっても消失したことから、末梢において LPA₃ の活性化は迷走神経興奮を促すことが明らかとなった。

一方、これまでに研究代表者のグループは、質量分析計を駆使したリゾリン脂質の高感度一斉分析系を確立し (*J. Lipid Res.* 2014)、東京大学病院検査部矢富裕教授らとの共同研究によって、様々な疾患患者検体の解析を行ってきた (*ATVB* 2014, *BBA Clin.* 2015)。最近、研究代表者は、心筋梗塞を主とする急性冠症候群患者血液の網羅的な脂質解析から、不飽和型 LPA、特にドコサヘキサエン酸 (DHA) が結合している LPA が血中で顕著に増加することを見出した (*ATVB* 2014)。また、左冠動脈結紮によるマウス心筋梗塞モデルにおいても、虚血による心筋壊死が生じている部位で DHA 型 LPA が著しく上昇することがわかった。興味深いことに、不飽和型 LPA は LPA₃ 受容体を強力に活性化させるリガンドであった。そこで次に、LPA₃ KO マウスに心筋梗塞を発症させたところ、KO マウスでは心筋梗塞後の壊死面積が有意に増加することが分かった。さらに LPA₃ 作動薬の投与は迷走神経依存的に壊死面積を顕著に減少させた。

以上の結果から申請者は、心筋梗塞時に産生される不飽和型 LPA は LPA₃ を介して迷走

神経を興奮させることで心臓を保護するという、生理活性リゾリン脂質 LPA の迷走神経制御因子としての新たな機能を提唱するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、LPA₃ による迷走神経活性制御機構における、主に以下の未解決な点を明らかにすることを目的とした。

(1) 心筋梗塞における不飽和型 LPA の産生機構の解析

心筋梗塞時に、いつ、どこで不飽和型 LPA が産生されるのか、更に産生酵素を明らかにする。

(2) LPA₃ によって制御される新たな迷走神経機能の解明

迷走神経はほぼ全ての全身の臓器を支配する神経であることから、LPA₃ によって活性化される迷走神経は心臓以外にも影響を与える可能性がある。従って、迷走神経における LPA₃ の発現解析を行い、さらに LPA₃ 作動薬を用いることで、LPA₃ によって制御される新たな迷走神経機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心筋梗塞モデルマウスの作成

虚血性心疾患モデルとしてマウスの左前下行枝結紮による心筋梗塞モデルを用いた。三種混合麻酔下においてマウスを開胸し、冠動脈を結紮、一定時間後に心臓を回収し、LC-MS/MS 解析または imaging MS 解析を行った。再灌流モデルの場合は結紮 45 分後に虚血を解放し、一定時間後に心臓を回収した。

(2) LC-MS/MS 解析、imaging MS 解析

リン脂質の LC-MS/MS 解析には、TSQ-Quantiva (トリプル四重極 MS) と U3000 (LC) を組み合わせたシステムに対し、ODS カラムを用いた。心臓組織をメタノール中で破碎し、その上清をフィルター処理したものをサンプルとして解析を行った。結果は、内部標準物質に対するピークエリア値の比を、サンプル重量で補正して解析をした。

Imaging 解析には、Q-Exactive (orbitrap 型 MS) と AP-SMALDI II (MALDI 用レーザーユニット) を組み合わせたシステムを用いた。凍結切片に対して、4-nitroaniline を suncollect オートマチックスプレイヤーにて噴霧し、その後、fullscan mode にて MALDI-imaging 解析を行った。

(3) in situ hybridization

LPA₃ mRNA の検出には RNA scope による in situ hybridization 法を用いた。4% PFA 固定した組織から凍結切片を作成し、RNA probe は、

Mm-Lpar3, Mm-Polr2a, DapB を、発色には RNAscope 2.5 HD Reagent Kit- RED をそれぞれ使い、定法に従って検出を行った。

(4) LPA₃ 作動薬の薬理作用の検討

LPA₃ 作動薬は T13 (EMBO J. 36(14):2146-2160) を用い、静脈内投与、腹腔内投与、子宮内投与および精巣内投与といった様々な経路で投与した。迷走神経依存性の確認は、マウス頸部の迷走神経を両側性に切断することで行った。

4. 研究成果

(1) 心筋梗塞における不飽和型 LPA の産生機構の解析

まず組織切片における脂質の局在を可視化するため、MALDI-imaging MS 法によるリゾリン脂質の明瞭な検出方法を検討した。その結果、4-nitroaniline をマトリクスとして用いることで LPA や LysoPS といった存在量が少ないリゾリン脂質も検出可能となった。そこで、マウス心筋梗塞モデルを作成し、24 時間後の心臓を用いて imaging MS 解析を行ったところ、様々な LPA 分子種の中でも、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 結合型の LPA が、虚血部位特異的に蓄積していることを新たに見出した。また、その他の DHA 含有リゾリン脂質も同様に虚血部位における顕著な増加がイメージングできた。そこで次に LC-MS/MS 解析によって定量的な評価を行ったところ、心臓虚血時間依存的に、DHA-LPA レベルが上昇していき、この上昇は非虚血部位では全く認められなかった。更に、同様の DHA-LPA の変動が、虚血再灌流モデルにおいても観察された。また、心臓組織を単離し、培地中でインキュベートしたところ、それだけで DHA-LPA の上昇が認められたことから、心筋細胞において何らかの機構で DHA-LPA が産生されることが示唆された。一方、ヒト疾患患者との相違として、マウス心筋梗塞モデルでは、血中 LPA レベルは有意な変動は認められなかった。

次に主要な LPA 産生酵素として知られているオートタキシン (ATX) が虚血心臓における DHA-LPA の産生に關与するかを検討するため、ATX 阻害剤の投与を行った。ATX 阻害剤によって血中 LPA レベルは顕著に低下した一方で、興味深いことに、虚血部位の DHA-LPA レベルは全く変化しないことを見出した。また、腓リパーゼファミリーを広く阻害するオルリスタットの投与によっても虚血時に DHA-LPA が上昇することから、この DHA-LPA 産生はこれまでに報告されている LPA 産生機構とは異なる新しい機構によるものと考えられた。

そこで LC-MS/MS 解析によって、虚血心臓のリン脂質を網羅的に解析したところ、

DHA-LPA の増加と類似した時間軸で、DHA 含有型ホスファチジン酸 (PA) が劇的に増加することが明らかとなった。興味深いことに、PA 分子種の中でも DHA 型以外の分子種は変動しないか、あるいは逆に減少していた。また、PA 以外のジアシルリン脂質においては DHA 結合型の変化は全く認められなかった。以上の結果から、心筋細胞では虚血刺激によって DHA 含有 PA の代謝が変化し、引き続く何らかのホスホリパーゼによって DHA-LPA が産生する可能性が示唆された。今後は細胞内における DHA-PA の代謝機構に焦点をあて、虚血時における変化を解析する必要がある。

(2) LPA₃ によって制御される新たな迷走神経機能の解明

まず求心性迷走神経のどのようなポピュレーションに LPA₃ が発現しているのかを明らかにするため、迷走神経の細胞体が存在する nodose ganglion (NG) に対して RNA scope を用いた in situ hybridization を行った。その結果、NG の半数程度の細胞に LPA₃ のシグナルが観察され、さらにその極一部では非常に高い発現であることが明らかとなった。従って LPA₃ は全ての迷走神経ではなく、心臓をはじめとしたある特定の臓器を支配する迷走神経を強く制御していることが示唆された。現在、NG の細胞体における更なる詳細なポピュレーション解析を進めている。

次にマウスに LPA₃ 作動薬を投与することで誘導される様々な薬理作用を指標に、新たな機能の推定を行った。その結果、呼吸機能の抑制 (一過性の無呼吸、呼吸回数低下)、炎症性・抗炎症性サイトカインの産生変動を見出した。また、LPA₃ 作動薬を局所投与することで子宮の肥厚や精巣構造の変化といった薬理効果も迷走神経とは関係なく誘導することを発見した。

LPA₃ 作動薬による呼吸機能の抑制に関しては、LPA₃ KO マウスおよび迷走神経切除術によってその作用がほとんど認められなくなることから、LPA₃ による迷走神経興奮の結果であることが確認できた。これらの作用の生理・病理的な意義を解明するため、様々な呼吸器疾患マウスモデルの肺または肺胞洗浄液中の LPA の解析を LC-MS で行ったところ、プレオマイシン肺線維化モデルや塩酸投与モデル等で LPA レベルの亢進が認められた。従って今後は、これら病態モデルにおける LPA₃ と迷走神経を介した呼吸機能制御を検討する必要性が生じた。

一方で、LPA₃ 作動薬によるサイトカインレベルの変動は、予想外なことに、LPA₃ KO マウスへ作動薬を投与した際にも認められることから、他の LPA 受容体が主に關与していることが明らかとなった。当初の目的とは異なった結果が得られたが、興味深い知見と考えて研究を進めた結果、責任受容体と細胞の同定に至った。現在、敗血症モデルにおける

本システムの病理的意義の解明を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件) 全て査読あり

1) Different Origins of Lysophospholipid Mediators between Coronary and Peripheral Arteries in Acute Coronary Syndrome. Kurano M, Kano K, Dohi T, et al., J Lipid Res. 58(2):433-442 (2017)

doi: 10.1194/jlr.P071803

2) Autotaxin-lysophosphatidic acid-LPA3 signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways. Aikawa S, Kano K et al., EMBO J. 36(14):2146-2160, (2017)

doi: 10.15252/embj.201696290

[学会発表](計 16 件)

1) 可野邦行 心筋梗塞における DHA 型リゾホスファチジン酸の産生とその病理的意義の解析 第 2 回酸素生物学・ダイニングコード合同若手会 2018.1.30-2.1 宮城

2) Jiao Wang, Kuniyuki Kano, Junken Aoki Lysophosphatidic acid stimulates IL-10 production from murine peritoneal macrophage ConBio2017, 2017.12.6-9. 兵庫

3) 菅原拓海、可野邦行、青木淳賢 LPA3 選択的アゴニストを用いた精巢における LPA3 の機能の解析 ConBio2017, 2017.12.6-9. 兵庫

4) 大前直樹、大藤瞳、可野邦行、青木淳賢 新規特発性肺線維症急性増悪モデルにおける LPA3 の保護作用 ConBio2017, 2017.12.6-9. 兵庫

5) 大藤瞳、大前直樹、可野邦行、青木淳賢 肺線維症モデルにおけるリゾホスファチジン酸受容体・産生酵素の発現解析 ConBio2017, 2017.12.6-9. 兵庫

6) Kurano, M., Kano, K., Dohi, T., Ikeda, H., Aoki, J., and Yatomi Y, Possible involvement of glycerol-lysophospholipids in the pathogenesis of ACS, revealed by an LC/MS technique. The 29th WASPaLM, 2017.11.15-17. 京都

7) Kuniyuki Kano, Daisuke Saigusa and Junken Aoki, Imaging MS analysis of lysophospholipids using AP-MALDI-MS, 15th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases,

2017.10.22-27. Mexico

8) Kuniyuki Kano, Junken Aoki, An emerging role of DHA-containing LPA in myocardial infarction, International Conference on Lipoquality (シンポジウム講演), 2017.9.22. 東京

9) Kuniyuki Kano, Daisuke Saigusa and Junken Aoki, Imaging MS analysis of lysophospholipids using AP-MALDI-MS, FASEB Science Research Conference, 2017.8.20-27. USA

10) Naoki Omae, Kuniyuki Kano, Junken Aoki, Preventive and alleviative effects of LPA3 signaling in a novel mouse model of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis FASEB Science Research Conference, 2017.8.20-27. USA

11) 可野邦行 イメージング質量分析法によるリゾリン脂質の局在とその生理的意義の解析、リポクオリティ第一回若手研究発表会、2017.5.16. 東京

12) 可野邦行 東北大化合物ライブラリーを用いた創薬スクリーニング(シンポジウム講演)、日本薬学会第 137 年会会、2017.3.24-27. 宮城

13) Kuniyuki Kano, Daisuke Saigusa and Junken Aoki, Imaging MS analysis of lysophospholipids using AP-MALDI-MS, Keystone symposia, 2017.2.26-3.2. USA

14) Jiao Wang, Kuniyuki Kano, Kyoko Satake, Junken Aoki Lysophosphatidic acid enhances IL-10 production in a mouse LPS model Keystone symposia, 2017.2.26-3.2. USA

15) Jiao Wang, 可野邦行、青木淳賢 マウス敗血症モデルにおける LPA3 の抗炎症機能の解析 第 89 回日本生化学会、2016.9.25-27. 宮城

16) 可野邦行 リゾリン脂質メデーターリゾホスファチジン酸の新規迷走神経刺激因子としての機能 日本薬学会東北支部若手研究者セミナー(招待講演)2016.7.23. 宮城

[図書](計 1 件)

1) 可野邦行、青木淳賢 リン脂質のイメージング 医学のあゆみ(医歯薬出版)262(5), 496-500 (2017)

[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

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H28/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

可野 邦行 (Kano Kuniyuki)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50636404

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし