

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09661

研究課題名(和文)新規脂質代謝酵素に注目した気管支喘息の病態解析

研究課題名(英文)New phospholipase A2 and pathophysiology of asthma

研究代表者

井上 博雅(Inoue, Hiromasa)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30264039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：重症の気管支喘息など難治性アレルギー疾患の病態解明と新規治療法の開発は急務である。本研究の目的は、抗喘息薬の創薬に繋がる脂質の新機能を解明することである。生理活性脂質を動員するボトルネック酵素であるホスホリパーゼA2(PLA2)分子群の中で、肺における作用が明らかでない分泌性PLA2の一つPLA2G3に注目し、喘息の病態における役割を解析した。PLA2G3はリソリン脂質メディエーターを動員して、喘息の病態に保護的に作用していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息病態において、脂質メディエーター代謝酵素である分泌性ホスホリパーゼA2のひとつPLA2g3の関与が明らかとなり、新たな喘息のメカニズムが解明されたと同時に、現存する治療薬を用いてもコントロール不良の重症喘息に対して、新規治療薬の開発への応用展開が期待され、重要な研究成果となった。

研究成果の概要(英文)：Although lipids are converted to a wide variety of metabolites including bioactive lipid mediators, their roles in bronchial asthma still remain incompletely understood. The aim of this study is to clarify the novel roles of lipid pathways in asthma focusing on PLA2G3, a mammalian homolog of anaphylactic bee venom PLA2. We found that PLA2G3 was predominantly expressed in airway epithelial cells, and PLA2G3 negatively regulated asthmatic responses through producing a lysophospholipid mediator. We propose that the PLA2G3-driven lipid pathway could be a new drug target of asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 脂質メディエーター 気道上皮

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の治療は大きく進歩したが、高用量吸入ステロイド薬に加え、長時間作用性2刺激薬やロイコトリエン受容体拮抗薬などの併用薬、さらには抗体医療などの治療を用いてもコントロール不良な患者が存在し、重症/難治性喘息の病態解明や新たな治療法の開発は急務である。

アラキドン酸代謝経路を介して産生されるロイコトリエン C4/D4/E4 やプロスタグランジンなどの脂質メディエーターは、ステロイド抵抗性の病態に重要な役割を担っていると考えられている。本研究代表者らは、ロイコトリエン B4 第2受容体とその新規脂質リガンド12-HHTがIL-13産生を制御してアレルギー性炎症を抑制すること(*FASEB J*27:3306, 2013)などを報告してきた。

脂質は多彩な機能を有し、生活習慣病の他にも、アレルギー疾患や慢性炎症の病態、癌の進展などに関与する。リン脂質の加水分解酵素であるホスホリパーゼA2(PLA2)は、脂質メディエーター生合成の初発段階を制御する。これまでPLA2に関しては、細胞内に存在する細胞質型PLA2(cPLA2)を介するメディエーター生合成の重要性が強調されてきた。生体には、細胞質型PLA2以外に、細胞外に放出される分泌性PLA2(sPLA2)も存在するが、その機能の多くは未だ不明である。分泌性PLA2は、全細胞に普遍的に発現する細胞質型PLA2と異なり、特有の組織・細胞分布を示し、リン脂質とは異なる脂質を基質とするものもある。

喘息とsPLA2との関連については、喘息の病態においてsPLA2g5が気道内のマクロファージを活性化しアレルギー性気道炎症に関わることやsPLA2g10が気道内の好酸球浸潤に関わることなどが示されている。また、sPLA2g3はアナフィラキシーへの関与が示されており、sPLA2g5やsPLA2g10と同様にアレルギー疾患である喘息の病態に関わる可能性はあるが明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、呼吸器領域での機能が不明である新規脂質メディエーター代謝酵素sPLA2g3に注目し、喘息の病態におけるsPLA2g3の役割とその作用機序を解析することにより、新しい観点からの喘息の病態解明と新規治療の開発への応用を目指すものである。

3. 研究の方法

sPLA2g3遺伝子欠損マウスと野生型マウスに抗原感作のために卵白アルブミンOVA 10 μ gを腹腔内投与し、感作成立後に1%OVAをネブライザーにて3日間吸入させ、喘息モデルを作成した。最終のOVAネブライザー吸入から24時間後に気管支肺胞洗浄液および肺組織を採取し解析した。

気道過敏性を測定のため、最終のネブライザー吸入24時間後に気管挿管を行い、Flexivent(SCIREQ, Montreal, Canada)を用いて、メサコリン吸入投与による呼吸抵抗の変化を評価した。

気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数、細胞種類を測定し、2型サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)レベル、IgEの濃度をELISAで測定した。また、肺組織での2型サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)の発現を定量PCRで測定した。

肺における sPLA2g3 の発現細胞を同定するために、肺組織の免疫組織染色を行い、sPLA2g3 の発現部位、発現細胞の同定を行った。さらに OVA 投与前後における sPLA2g3 の mRNA 発現量の変化についても検討した。

sPLA2g3 遺伝子欠損マウスでの変化の責任細胞が血球系細胞か非血球系細胞かを明らかにするために、骨髄キメラマウスを作成し、OVA 感作曝露による喘息モデルを用いて同様に気道過敏性や炎症細胞数を測定した。

肺組織における脂質メディエーター、代謝産物を定量するために、マウス肺組織より脂質を抽出し、リポドミクス解析を行った。

4. 研究成果

野生型マウスの肺組織では、喘息病態への関与についてこれまで報告のある sPLA2g5 や sPLA2g10 と比較して sPLA2g3 の発現が高く、特に気道上皮細胞において sPLA2g3 の高発現が認められた。

sPLA2g3 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して気道上皮細胞における sPLA2g3 の発現が低下していることを、免疫組織染色を用いて確認した。

sPLA2g3 遺伝子欠損マウスを用いた OVA 感作曝露による喘息モデルマウスでは、野生型マウスの喘息モデルと比較して気道過敏性が亢進しており、好酸球性気道炎症が増強していた。また、肺における 2 型サイトカイン IL-5、IL-13 の発現も増加していた。

この OVA 感作曝露後の sPLA2g3 遺伝子欠損マウスでの変化の責任細胞が、血球系細胞か非血球系細胞かを明らかにするために、骨髄キメラマウスを用いて OVA 感作曝露による喘息モデルを解析した。sPLA2g3 遺伝子欠損マウスの骨髄を移植した野生型マウスでは、喘息反応の悪化は認めず、野生型マウスの骨髄を移植した sPLA2g3 遺伝子欠損マウスでは、喘息反応の悪化を認めた。

マウス肺を用いたリポドミクス解析では、sPLA2g3 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して OVA 感作曝露によるリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) の増加を認めなかった。また、sPLA2g3 遺伝子欠損マウスを用いた OVA 感作曝露喘息モデルに LPA アゴニストを気道内投与することで、気道過敏性や好酸球性炎症が抑制された。

本研究により、気道上皮細胞に発現している sPLA2g3 が、LPA の産生を介して気管支喘息の病態に関与していることが明らかになった。この研究はステロイド抵抗性喘息など重症喘息の発症メカニズム解明や新規治療法の開発につながる可能性があり、重要な研究成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 A Tanoue, Y. Taketomi, A. Uchida, T. Matsuyama, M. Murakami, H. Inoue
2. 発表標題 The role of group III-secreted phospholipase A2 in allergic asthma
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上博雅
2. 発表標題 重症喘息の分子病態と制御
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takagi K, Taketomi Y, Tanoue A, Matsuyama T, Sakaue K, Machida K, Murakami M, Inoue H
2. 発表標題 PLA2G3-driven lysophospholipid pathway protects against allergic asthma
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takagi K, Machida K, Inoue H	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 13 in 189
3. 書名 Advances in Asthma; Cellular Mechanisms of Allergic Airway Inflammation	

〔産業財産権〕

[その他]

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	渡辺 正樹 (WATANABE Masaki) (90398298)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究 協力者	松山 崇弘 (MATSUYAMA Takahiro)		
研究 協力者	田上 あさ子 (TANOUE Asako)		