

令和 3 年 5 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：2018～2020

課題番号：18K08180

研究課題名（和文）呼吸器疾患難治化におけるホスホリパーゼA2/リゾリン脂質ネットワークの役割の解析

研究課題名（英文）The role of phospholipase A2/lysophospholipids in the pathogenesis of refractory respiratory diseases

研究代表者

渡辺 正樹（WATANABE, Masaki）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90398298

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：分泌型ホスホリパーゼA2は、リン脂質を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。本研究は、脂質代謝を始動する酵素であるホスホリパーゼA2ファミリーの中で、これまで肺における作用を報告されていないD型ホスホリパーゼA2とその代謝産物の受容体であるロイコトリエンB4第二受容体に着目して、難治性呼吸器疾患である急性肺傷害と肺線維症の病態における役割を解析した。本研究から、ロイコトリエンB4第二受容体は急性肺障害の病態を抑制する作用を有する可能性がある。また、D型ホスホリパーゼA2は肺線維症の初期には線維化を促進するが、後期には逆に抑制するユニークな作用を有することも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性呼吸器疾患である急性肺傷害および肺線維症は、詳細な病態機序は不明であり、有効な治療法が確立されていないため、予後は極めて不良である。本研究により、両者の病態におけるD型ホスホリパーゼA2とロイコトリエンB4第二受容体の役割が明らかになった。これまでにない新しい観点に基づく病態理解および新規治療法の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Secreted phospholipases A2 (PlA2) are enzymes that cleaves phospholipids into fatty acids and lysophospholipids. Focusing on PlA2 group D (PlA2g2d) and Leukotriene B4 receptor 2 (BLT2), we studied the potential role in pathogenesis of acute lung injury (ALI) and pulmonary fibrosis (PF). We conclude that BLT2 suppresses ALI. Interestingly, PlA2g2d enhances PF in early phase, but plays a protective role against PF in late phase.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：急性肺傷害 肺線維症 ホスホリパーゼA2 ロイコトリエンB4第二受容体

## 1. 研究開始当初の背景

難治性呼吸器疾患である急性肺傷害 (Acute Lung Injury ; ALI) の病態では、好中球が主要な役割を果たして高度な炎症が生じると考えられている。敗血症などの誘因により、マクロファージ等の炎症細胞が末梢血中にサイトカインや脂質メディエーターを放出すると好中球が活性化される。活性化した好中球が肺内に集積して組織傷害性物質を産生すると、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞の傷害を伴う炎症が生じると推察されている。同じく難治性疾患である肺線維症 (Pulmonary Fibrosis ; PF) も、肺胞上皮細胞と血管内皮細胞の損傷から、炎症メディエーターの放出、好中球や肺胞マクロファージの誘導、血管透過性亢進などを介して不可逆的な肺胞隔壁の線維化に至る。両者ともに詳細な病態機序は不明であり、有効な治療法が確立されていないため予後は極めて不良である。

申請者らは、これまで ALI、PF を始めとする難治性呼吸器疾患の病態解析と新規治療法の開発に取り組んできた。すなわち、臓器再生因子である肝細胞増殖因子の肺胞上皮細胞および血管内皮細胞への選択的遺伝子導入により、効果的に PF を抑制できること (Mol Ther 2005)、血管内皮細胞増殖因子に対するモノクローナル抗体を肺局所で長期間産生するベクターの開発により、透過性肺水腫や転移性肺腫瘍などの発症および進展の抑制に有効であること (Hum Gene Ther 2008, Hum Gene Ther 2009, Gene Ther 2010)、新規 PDE4 阻害薬がシステニールロイコトリエンの産生を抑制して ALI を抑えること (Eur J Pharmacol 2015) アンジオポエチン様因子 2 が PF を抑制する作用を有すること (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2016)、肺癌合併 PF の進行に特定の microRNA が関与していること (J Hum Genet 2016) などを報告してきた。

ホスホリパーゼ A2 はリン脂質を加水分解してリゾリン脂質と脂肪酸を遊離する酵素であり、細胞質型、カルシウム非依存型、分泌型に大別される。これまでホスホリパーゼ A2 に関しては、細胞内に存在する細胞質型を介するメディエーター合成の重要性が強調されてきた。しかし、特有の組織、細胞に分布して細胞外に放出される分泌型ホスホリパーゼ A2 (Secreted phospholipase A2 ; Pla2) においては、その機能の多くが未だ不明である。

Pla2 の代謝産物であるロイコトリエン B<sub>4</sub> (Leukotriene B<sub>4</sub> ; LTB<sub>4</sub>) は、エイコサノイドの一種であり、5-リポキシゲナーゼによりアラキドン酸から生成される脂質メディエーターである。主に白血球や肥満細胞が産生して、好中球や単球/マクロファージを活性化する。LTB<sub>4</sub> の受容体は、ロイコトリエン B<sub>4</sub> 第一受容体 (LTB<sub>4</sub> receptor 1 ; BLT1) とロイコトリエン B<sub>4</sub> 第二受容体 (LTB<sub>4</sub> receptor 2 ; BLT2) が同定されている。両者ともに細胞膜を 7 回貫通する G タンパク質共役受容体で 45% のアミノ酸同一性をもつが、LTB<sub>4</sub> への親和性や特異性、発現細胞は大きく異なる。BLT1 は極めて高親和性で他のリガンドには反応しない。白血球に発現して、他の臓器にはほとんど認めない。一方、BLT2 は親和性が低く、他のリガンドにも反応する。ヒトでは全身の臓器に広く発現している。LTB<sub>4</sub>/BLT1 系の疾患における役割は解明されてきており、呼吸器領域では気管支喘息の病態を促進することなどが知られている。しかし、BLT2 の生理作用は依然として不明な点が多く、呼吸器疾患における役割を検討した報告はほとんどない。

脂質メディエーターは、生活習慣病の他に慢性炎症を基盤とする癌やアレルギーの病態にも関与することが明らかになりつつある。申請者らは、III型 Pla2 遺伝子を欠失した喘息モデルマウスは、気道リモデリングにより病態が増悪することを既に確認している。興味深いことに、気管支喘息と同様に PF も ALI が発端となり、肺胞隔壁に細胞外基質が過剰に沈着するリモデリングにより難治化が進行する。この難治化の機序の詳細は未だ明らかになっておらず、病態解明や新規治療法の開発は喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は、脂質代謝を始動する酵素であるホスホリパーゼ A2 ファミリーの中で、これまで肺における作用が全く検討されていない III 型 Pla2 (Pla2g2d) とその代謝産物の受容体である BLT2 に着目した。難治性呼吸器疾患である ALI、PF の病態における役割を解析することにより、新しい概念による病態解明と治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 疾患モデルと重症度の評価

ALI、PF の病態における脂質メディエーターの役割を明らかにするために、Pla2g2d 遺伝子欠失マウス (Pla2g2d-KO)、BLT2 遺伝子欠失マウス (BLT2-KO) に ALI、PF を誘導して、炎症、線維化の重症度を同腹の野生型と比較した。ALI は、リポ多糖 (Lipopolysaccharide ; LPS) 25 ng をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline ; PBS) 100  $\mu$ l に溶解してマウスの気管内に投与して誘導した。LPS 投与 6 時間後に 24 ゲージカニューレを気管内へ挿入して、PBS 1 ml の注入、吸引を 3 回くり返して気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid ; BALF) を回収した。BALF を集細胞遠心装置 750 rpm で 15 分遠心した後に Wright-Giemsa 染色して、細胞を 200 個計測することにより細胞分画を決定した。BALF 中総蛋白濃度は Bicinchoninic acid protein assay にて測定した。コントロール群は PBS を投与した。PF モデルは、プレオマイシン

75 µg を気管内投与して作製した。線維化の重症度は、2 または 5 週間後に肺内ヒドロキシプロリン量を高速液体クロマトグラフィー法にて定量化した。

#### サイトカイン

LPS 投与 0.5–6 時間後に BALF を採取して 3500 rpm で 5 分遠心した。上清中のサイトカインをサスペンションアレイで測定した。

#### エイコサノイド

LPS 投与 2 時間後に BALF を採取して 3500 rpm で 5 分遠心した。上清中のロイコトリエン、プロスタグランジン、トロンボキサン、12-HHT を高速液体クロマトグラフィー (流速 50 µl/分) で測定した。

### 4. 研究成果

#### ALI モデルにおけるサイトカイン

ALI モデルの病態を解析するために、野生型マウスに LPS を投与して、0.5–6 時間後の BALF 中サイトカインを測定した。LPS 投与により、好中球走化性因子 Keratinocyte chemoattractant (KC)、Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2)、好中球活性化因子 Macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1α)、Macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 β)、炎症性サイトカイン Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)、Interleukin 6 (IL-6)、単球、リンパ球の走化性因子 Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10)、Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) は上昇して 1-2 時間後にピークに達し、6 時間後には低下していた。

#### ALI モデルにおけるエイコサノイド

好中球性気道炎症モデルにおけるエイコサノイドの動向も検討した。LPS 投与群では PBS 投与と比べて、BALF 中の LTB4、Leukotriene E4 (LTE4)、Prostaglandin D2 (PGD2)、Prostaglandin E2 (PGE2)、Thromboxane B2 (TXB2) が増加していた。BLT2 のリガンドであるヒドロキシヘプタデカエイコサテトラエン酸 (12(S)-Hydroxyheptadeca-. 5Z,8E,10E-trienoic acid ;12-HHT) は増加していなかった。

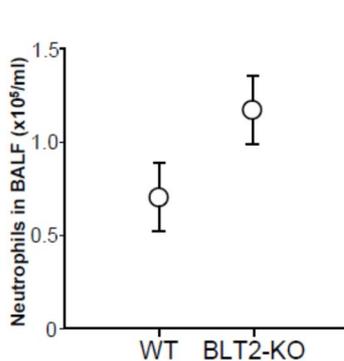
#### BLT2-KO における ALI

BLT2-KO に ALI を誘導すると、野生型と比べて BALF 好中球数が増加していた (図 1)。肺の炎症のマーカーとなる BALF 中総蛋白濃度も BLT2-KO で上昇していた (野生型 356.4 µg/ml vs. BLT2-KO 555.8 µg/ml)。

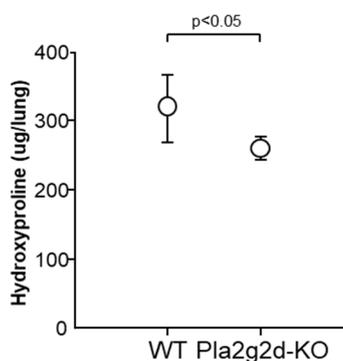
#### Pla2g2d-KO における PF

Pla2g2d-KO に PF を誘導すると、初期 (2 週間後) は、野生型と比べて肺内ヒドロキシプロリン量は低下していた (図 2)。しかし、興味深いことに後期 (5 週間後) になると、野生型と比べて Pla2g2d-KO の方が肺内ヒドロキシプロリン量は高値であった (図 3)。さらに、致死率も高かった (野生型 0% vs. Pla2g2d-KO 30%)。

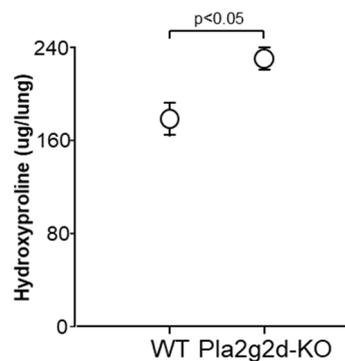
今回の遺伝子欠失マウスを用いた研究にて、BLT2-KO は、野生型と比べて LPS による好中球性気道炎症が重篤になることを確認した。BLT2 を介したシグナルは、ALI の病態を抑制する作用を有する可能性がある。また、Pla2g2d は、PF の初期には、線維化を促進するが、後期には逆に線維化を抑制するユニークな作用を有する可能性があることも見出した。今後、Pla2g2d および BLT2 を介したシグナルの役割が明確になれば、これまででない新しい観点に基づく ALI、PF の病態理解および新規治療法の開発につながる。



(図 1)



(図 2)



(図 3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 井上 博雅<br><br>(INOUE Hiromasa)<br><br>(30264039) | 鹿児島大学・医歯学域医学系・教授<br><br><br><br>(17701) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |