

平成22年6月18日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390209

研究課題名（和文）ホスホリパーゼ A2 を基盤とする心血管病の成因解明と新しい予防・治療薬の探索

研究課題名（英文）A study of role of phospholipase A2 in pathogenesis of cardiovascular diseases and development of new drug for cardiovascular diseases

研究代表者

久木山 清貴 (KUGIYAMA KIYOTAKA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：00225129

研究成果の概要（和文）：ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) を介して産生されるアラキドン酸カスケード関連脂質は心血管病の発症・病態に深く関与していることが示唆されている。本研究では、secretory PLA₂ の心血管病への関与を網羅的に解明し、PLA₂ を標的とする有用な心血管病予防・治療薬を開発することを目的とした。その結果、X 型および V 型 secretory PLA₂ が心筋梗塞発生の病態に関与することが判明した。さらに secretory PLA₂ 活性阻害剤が心不全を予防することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to examine a possible role of secretory PLA₂ in the pathogenesis of cardiovascular diseases and to develop a new drug for prevention from cardiovascular diseases. As a result, (1) the inhibition of sPLA₂-X might be also useful for ischemic tissue injury and inflammation. And, myocardial ischemia-reperfusion injury was attenuated in sPLA₂-X^{-/-} mice partly through the suppression of neutrophil cytotoxic activities. (2) Myocardial I/R injury was also attenuated in sPLA₂V^{-/-} mice, as evidenced by a significant decrease in size of myocardial infarction with preservation of LV systolic function, a decrease in arachidonic acid-derived proinflammatory mediators and reduced apoptosis. Group V sPLA₂ has an important role in the pathogenesis of myocardial I/R injury. (3) Inhibition of sPLA₂ activity suppressed acute cardiogenic pulmonary edema, and sPLA₂ inhibition may have therapeutic value in acute cardiogenic pulmonary congestion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋梗塞、心血管病、ノックアウトマウス、分泌型ホスホリパーゼ A

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) を介して産生されるアラキドン酸カスケード関連脂質は心血管病の発症・病態に深く関与していることが示唆されている。アラキドン酸カスケードによって産生される脂質の多くは動脈硬化、血栓、炎症の惹起因子・増悪因子であり多くの心血管病の発症・病態に深く関与している。PLA₂ はアラキドン酸カスケードの最上流に位置する酵素である。よってアラキドン酸カスケードの最上流に位置する PLA₂ の作用を阻害することで心血管病の予防効果が得られる可能性がある。sPLA₂ が心血管病に関与するかどうかはほとんど知られていない。本研究では、特異的阻害剤の長期投与モデルとみなされる KO マウスを用いた。

2. 研究の目的

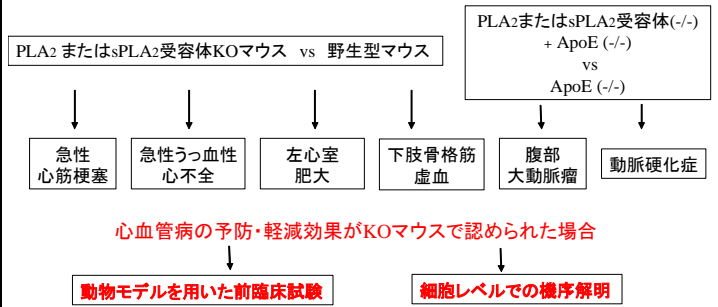
PLA₂ の心血管病への関与を網羅的に解明し、PLA₂ を標的とする有用な心血管病予防・治療薬を開発するために以下を目的とした。

(1) IV、V、X 型 PLA₂ または分泌型 PLA₂ (sPLA₂) 受容体の欠失による心血管病の予防・軽減効果の有無およびその機序を、それぞれの遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いて検討する。心血管病モデルとして急性心筋梗塞、急性肺うっ血性心不全、左心室肥大、下肢骨格筋虚血 (血管新生モデル)、大動脈瘤、および動脈硬化症を作成する。

(2) 遺伝子 KO マウスを用いた検討により、各心血管病モデルにおいて発症因子または増悪因子であることが確認できた PLA₂ において、それらの阻害薬を用いて動物モデルを対象に前臨床試験を行う。

3. 研究の方法

(1) 心血管病のマウスモデルを作成し、その程度を以下の如く評価し、ノックアウトマウスと対照マウスと比較検討する



(2) 動物モデルを対象とし sPLA₂ 阻害剤を用いた前臨床試験

sPLA₂ 阻害剤は米国イーライリリーおよび塩野義社にて開発された LY374388 を用いる。心筋梗塞はマウスを用いて作成する。心不全はマウスを用いて心筋梗塞作成後イソプレテレンール投与による心拍数増加にて作成する。測定値を sPLA₂ 阻害剤投与群と非投与群で比較検討し sPLA₂ 阻害剤の有効性の有無を判断する。

4. 研究成果

(1) X 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウスに心筋梗塞を作成し、その程度を野生型マウスと比較検討した。その結果、X 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウスでは心筋梗塞の範囲が有意に低下し、心臓超音波検査上も心機能の低下が抑制されていた。X 型 secretory PLA₂ は心筋そのものには発現せず、心筋梗塞組織では心筋内に遊走している好中球に発現していることが明らかとなった。X 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウス由来の好中球はフリーラジカルおよび蛋白分解酵素産生・放出能、遊走能が野生型好中球に比べて有意に低下していた。X 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウス由来の好中球におけるフリーラジカルおよび蛋白分解酵素産生・放出能、遊走能の仕組み自体は変化がなく、分泌される X 型 secretory PLA₂ そのものが欠損しているために X 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウス由来の好中球では活性が低下していることが推測された。また、X 型 secretory PLA₂ 阻害剤を野生型マウスに投与することで、X 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウスと全く同様の知見が得られた。以上から、X 型 secretory PLA₂ が心筋梗塞の病態に深く関

与していること、好中球に存在する X 型 secretory PLA₂ が重要であることが明らかとなった。

(2) 心筋梗塞に合併するうっ血性心不全の病態における分泌型(secretory)ホスホリパーゼ A₂(sPLA₂)の関与と sPLA₂阻害薬の治療効果を検討し以下のことを明らかにした。心筋梗塞に合併するうっ血性心不全の病態における sPLA₂の重要性およびその阻害剤の治療薬としての有用性を実証し、sPLA₂阻害剤の心血管病治療薬として臨床応用に繋げることを目的に以下を行った。即ち 10~14 週の雄マウス (C57BL/6J) に対し麻酔・人工呼吸管理下で開胸、冠動脈左前下行枝を結紮することで心筋梗塞モデルを作成し、14 日間飼育した。そのマウスに対し生食または isoproterenol (ISP) 10 mg/kg/hr を持続投与した。心筋梗塞後 14 日目のマウスに対し治療群として sPLA₂阻害剤 (LY374388) 100 mg/kg を腹腔投与し、1 時間後に ISP 10 mg/kg/hr を持続投与開始した。未治療群として生食を腹腔投与した。また ISP 10 mg/kg/hr 持続投与 24 時間の治療群および未治療群の生存率を比較検討した。その結果、ISP 持続投与による肺うっ血の程度を sPLA₂阻害剤投与群と非投与群の lung-to-body ratio で比較したところ、治療群で有意に肺重量の低下が認められた。これらの病理組織学的観察では、未治療群において肺胞間質の浮腫、細胞浸潤、肺胞出血が認められたが、治療群ではそれらは抑制されていた。ISP 持続投与し 30 分後の左室内拡張末期圧 (LVEDP) を測定したところ、sPLA₂阻害剤投与群において LVEDP は非投与群に対し有意に低下していた。sPLA₂阻害剤投与群および非投与群に対して ISP 持続投与 24 時間までの生存率を比較したところ、非投与群に比べ sPLA₂阻害剤投与群の有意に高い生存率を示した。以上より sPLA₂が急性心原性肺水腫の病態に関与し、その阻害薬が急性うっ血性心不全に対し治療効果があることが示唆された。

(3) V 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウスに心筋梗塞を作成し、その程度を野生型マウスと比較検討した。その結果、V 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウスでは心筋梗塞の範囲が有意に低下し、心臓超音波検査上も心機

能の低下が抑制されていた。V 型 secretory PLA₂ は心筋そのものに発現し、梗塞後の残存心筋に強発現した。野生型に比べて V 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウス心筋においては、アラキドン酸由来の炎症惹起因子であるトロンボキサンおよびロイコトリエンの組織濃度が有意に低下していた。V 型 secretory PLA₂ は IV 型 PLA₂ と関連しながらアラキドン酸産生を行うことが知られている。そこで、V 型 secretory PLA₂ 活性を抑制した場合、V 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウスと野生型にて心筋梗塞の程度がどのようになるか検討した。IV 型 PLA₂ 活性阻害剤投与下においては、V 型 secretory PLA₂ ノックアウトマウスと野生型にて心筋梗塞の程度には有意な差は得られなかった。心臓超音波検査上も心機能の低下も同等であった。これらのことから、V 型 secretory PLA₂ は心筋梗塞の病態に深く関わり、その作用機序の下流に IV 型 PLA₂ が働いていることが示された。

(4) マウスに lipopolysaccharide (LPS) を投与し acute respiratory distress syndrome (ARDS) の肺障害モデルを作成した。secretory PLA₂ 活性阻害剤を投与することで、肺障害が軽減することを見出した。この機序として ARDS により IV および X 型 PLA₂ の発現・活性が増強することで肺障害が惹起されること、阻害剤がこれらの活性を抑制することで肺障害が軽減されることを明らかにした。ARDS による肺障害にたいして secretory PLA₂ 活性阻害剤が有用である可能性を示した。

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] (総件数 2 8 件)

- ① Sato R, Yamaga S, Watanabe K, Hishiyama S, Kawabata K, Kobayashi T, Fujioka D, Saito Y, Yano T, Watanabe K, Watanabe Y, Ishihara H, Kugiyama K. Inhibition of secretory phospholipase A2 activity attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a mouse model. *Exp Lung Res*. Vol.36, No.4, 2010, 191-200. (査読あり)
- ② Kobayashi T, Watanabe Y, Saito Y, Fujioka D,

Nakamura T, Obata JE, Kitta Y, Yano T, Kawabata K, Watanabe K, Mishina H, Ito S, Kugiyama K. Mice lacking the glutamate-cysteine ligase modifier subunit are susceptible to myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. Vol.85, No 4, 2010, 785-95. (査読あり)

③ Fujioka D, Kugiyama K. Novel insights of secretory phospholipase a(2) action in cardiology. *Trends Cardiovasc Med*. Vol.19, No.3, 2009, 100-3. (査読あり)

④ Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Yano T, Nakamura K, Kugiyama K. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. Vol.53, No.4, 2009, 323-30. (査読あり)

⑤ Hirano M, Nakamura T, Kitta Y, Yano T, Kobayashi T, Sano K, Fujioka D, Saito Y, Kodama Y, Kawabata K, Nakamura K, Obata JE, Kugiyama K. Rapid improvement of carotid plaque echogenicity within 1 month of pioglitazone treatment in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. Vol.203, No.2, 2009, 483-8. (査読あり)

⑥ Nakamura T, Obata JE, Takano H, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Fujioka D, Saito Y, Yano T, Kugiyama K. High serum levels of remnant lipoproteins predict ischemic stroke in patients with metabolic syndrome and mild carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Vol.202, No.1, 2009, 234-40. (査読あり)

⑦ Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Yano T, Tezuka H, Ishimoto Y, Suzuki N, Yokota Y, Nakamura T, Obata JE, Kanazawa M, Kawabata K, Hanasaki K, Kugiyama K. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation*. Vol.117, No.23, 2008, 2977-85. (査読あり)

⑧ Obata JE, Kitta Y, Takano H, Kodama Y, Nakamura T, Mende A, Kawabata K, Saitoh Y, Fujioka D, Kobayashi T, Yano T, Kugiyama K. Sirolimus-eluting stent implantation aggravates endothelial vasomotor dysfunction in the infarct-related coronary artery in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. Vol. 50, No.14, 2007,1305-9. (査読あり)

[学会発表] (総件数 3 2件)

- ① Toshiaki Yano; Kenichi Kawabata; Yukio Saito; Tsuyoshi Kobayashi; Ryota Sato; Kazuhiro Watanabe; Yosuke Watanabe; Hideto Mishina; Jun-ei Obata; Kiyotaka Kugiyama: Reduction in Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Group V Secretory Phospholipase A2-deficient Mice. American Heart Association Scientific Sessions. 2009.11.14-18. Orlando.
- ② Yukio Saito; Yousuke Watanabe; Hideto Mishina; Kazuhiro Watanabe; Toshiaki Yano; Tsuyoshi Kobayashi; Jun-ei Obata; Ken-ichi Kawabata; Takao Shimizu; Kiyotaka Kugiyama: Reduction in Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Group IV Cytosolic Phospholipase A₂-deficient Mice Partly Due to Inhibition of TNF α -mediated Pathway to Cell Injury. American Heart Association Scientific Sessions. 2009. 11.14-18.Orlando.
- ③ Kenichi Kawabata, Tsuyoshi Kobayashi, Yousuke Watanabe, Kazuhiro Watanabe, Toshiaki Yano, Ryota Sato, Yukio Saito, Kazuto Nakamura, Kiyotaka Kugiyama: Inhibition of Secretory Phospholipase A₂ Activity Attenuates Acute Cardiogenic Pulmonary Congestion Induced by Isoproterenol Infusion in Mice with Post-Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2008.11.8-12. New Orleans
- ④ Daisuke Fujioka, Kenichi Kawabata, Yoshikazu Ishimoto, Noriko Suzuki, Kohji Hansaki, Ryota Sato, Toshiaki Yano, Tsuyoshi Kobayashi, Yukio Saito, Masaki Kanazawa, Kiyotaka Kugiyama: Group X Secretory Phospholipase A₂ has a Critical Role in Neutrophils Activation and Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2007. 11.4-7.Orlando

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久木山 清貴 (KUGIYAMA KIYOTAKA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号：00225129

(2) 研究分担者

川端 健一 (KAWABATA KENICHI)

山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30345706

齊藤 幸生 (SAITO YUKIO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：50377511

小林 剛 (KOBAYASHI TSUYOSHI)
山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40402052

手塚 英夫 (TEZUKA HIDEO)
山梨大学・総合分析実験センター・准教授
研究者番号：70155456

藤岡 大佑 (FUJIOKA DAISUKE)
山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70377513
(平成 19 年度)

(3) 連携研究者
なし