

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790077
 研究課題名(和文) 炎症性刺激に伴って生合成される新規リン脂質性生理活性脂質に関する研究
 研究課題名(英文) Studies on a novel bioactive phospholipid(s) that is produced by proinflammatory stimuli.
 研究代表者
 桑田 浩 (KUWATA HIROSHI)
 昭和大学・薬学部・助教
 研究者番号：80286864

研究成果の概要(和文)：本研究では、1) 新規リン脂質性生理活性脂質である Phospholipid X (PLX)がこれまで検出してきた PC 型に加えて PE/PI 型としても存在する可能性、2)PLX 合成に長鎖アシル CoA 合成酵素 4(Acsl4)が関わる可能性、3) PLX が血小板活性化因子受容体アンタゴニスト感受性の受容体を介して作用する可能性、4) IL-1 β 依存的な sPLA₂-IIA の誘導に PKC アイソザイムにより制御を受けることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：This research found that 1) there are several types of PLX (PI/PE-form in addition to PC-form), 2) long chain acyl-CoA synthetase 4 (Acsl4) may be involved in the biosynthesis of PLX, 3) certain platelet-activating factor receptor antagonist inhibits PLX-mediated gene expression, 4) the induction of sPLA₂-IIA expression is regulated by PKC isozymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学・分子生物学

キーワード：生理活性脂質、ケモカイン、ホスホリパーゼ A₂

1. 研究開始当初の背景

脂質メディエーターと呼ばれる一連の化合物は、(1) アラキドン酸等の多価不飽和脂肪酸から生じるプロスタグランジンやロイコトリエン類、(2) グリセロール骨格の sn-1 位がアルキル結合、sn-2 位がアセチル基の構造を持つホスファチジルコリン(PC) である血小板活性化因子 (PAF)、(3)

脂質加水分解酵素の作用で生じるリゾリン脂質やスフィンゴ脂質などに大別され、これらは特異的な受容体に結合することにより作用を発揮し、それぞれ特徴的な生命現象や病態に関わる。私は、これら既知の脂質メディエーターとは、生合成経路、物性、および酵素との反応性から判断して明らかに性質の異なる複数の新規リン脂質性脂質

メディオエーター(Phospholipid X; PLX)が炎症性サイトカイン刺激により生合成され、これらが刺激に伴った複数の遺伝子発現制御に関わっている可能性を示唆する知見を得ている。

2. 研究の目的

本研究では、これらの新規脂質メディオエーターの化学構造及びその受容体の同定することを目的とし、これらの知見はリウマチをはじめとする炎症性疾患や動脈硬化症等の難治性疾患の発症・進展のメカニズム解明につながり、新たな創薬のターゲットとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) PLX(s)の同定:炎症性サイトカインで刺激した 12/15-LOX 過剰発現 3Y1 細胞由来の脂質を出発材料とし、得られた活性画分を順相および逆相 HPLC により分離し、sPLA₂-IIA 及びケモカイン群の発現制御に関わる脂質を検索した。

(2) PLX(s)合成に関わるアシル CoA 合成酵素 (Acs1) の同定:サイトカイン依存的な sPLA₂-IIA の誘導が Acs1 阻害剤で抑制されることを明らかとしている。各 Acs1 分子種を siRNA 法により、Phospholipid X 生合成に関与する Acs1 を同定した。

(3) PLX(s)受容体の同定:PAF 受容体アンタゴニストおよび siRNA を用いて、サイトカインおよび PLX 依存的な sPLA₂-IIA 発現誘導に対する効果を検討した。

(4) PLX(s)受容体のシグナル伝達:各種シグナル伝達分子阻害剤の sPLA₂-IIA 発現誘導に対する効果を検討し候補経路を絞り込む。これらの候補分子をノックダウンし、実際にその経路が sPLA₂-IIA 発現に関与するか否かを明らかとする。

4. 研究成果

平成 20 年度は、sPLA₂-IIA およびケモカイン群の発現に関与する Phospholipid X(s)の解析および Phospholipid X(s)合成に関わるアシル CoA 合成酵素 (Acs1) の同定を行った。

(1)Phospholipid X(s)の同定:本年度の検討ではこれまでの固相抽出カラムより分離の良い順相 HPLC カラムを用いて脂質画分を分画し、各溶出フラクションについて sPLA₂-IIA および各種ケモカイン発現誘導活性を検討した。その結果、これまでの Sep Pak Silica 固相抽出カラムを用いた解析では、sPLA₂-IIA の発現を誘導する活性は主に PC を含む画分のみが存在していたのに対して、今回の分離条件では、PC を含む画分に加えて新たに PE/PI を含む画分にも活性が溶出されることが明らかとなった。また、同時にケモカイン発現についても検討した結果、Cxcl10、Cxcl11、Cxcl12、Ccl3、および Ccl15 の発現は、PC 及び PE/PI 画分

に溶出されることが明らかとなった。現在、これらの画分をさらに逆相 HPLC により分離し、質量分析を行うことにより構造の決定を目指している。

(2)Phospholipid X(s)合成に関わる Acs1 の同定:サイトカイン依存的な sPLA₂-IIA の誘導が Triacsin C (Acs1 阻害剤)で抑制されることを明らかとしている。そこで、各 Acs1 shRNA 安定発現株の作成および一過的な siRNA の導入による各 Acs1 をノックダウンした際の sPLA₂-IIA 発現に対する効果を検討した。①Acs11 及び Acs14 shRNA 安定発現細胞において、sPLA₂-IIA の発現は有為に抑制された。②各 Acs1 siRNA を用いて、一過的にノックダウンを行った場合、Acs14 の siRNA により sPLA₂-IIA の発現が抑制されたのに対して、Acs11 の siRNA では抑制されなかった。以上より、Acs14 は Phospholipid X 合成に直接関与し、一方 Acs11 は間接的(細胞中の脂質組成に影響を与えていると考えている)に関与することが考えられた。

平成 21 年度は Phospholipid X (PLX)の作用機構を明らかとすること目的とし、PLX 受容体に関する検討及びシグナル伝達に関する検討を行った。

(3)これまでの解析で、PLX はホスファチジルコリン(PC)様の構造を有する可能性が高いことを見いだしている。そこで、PLX の作用が PC 様の生理活性脂質である血小板活性化因子(PAF)の受容体を介して作用を発揮している可能性を考え、sPLA₂-IIA タンパク質発現に対する 3 種の PAF 受容体アンタゴニストの効果を検討した。その結果、CV-6209 は用量依存的に sPLA₂-IIA の誘導を抑制したのに対して、BN52021 及び CV-3988 は抑制しなかった。さらに、PAF 受容体 siRNA を用いて PAF 受容体をノックダウンさせた際の sPLA₂-IIA 発現を検討した結果、対照と差は認められなかった。従って、PLX は、PAF 受容体とは異なる CV-6209 感受性の受容体を介して sPLA₂-IIA 発現誘導に関与していることが考えられた。PLX 受容体は PAF 受容体アンタゴニストの感受性から PAF 受容体と近縁の構造を持つ可能性が考えられるので、現在これらについてさらに検討を行っている。

(4)各種シグナル伝達分子阻害剤の IL-1 β 依存的な sPLA₂-IIA 発現誘導に対する効果を検討した結果、PKC の阻害剤である chelerythrine および GF109203X の添加により sPLA₂-IIA の誘導が抑制された。shRNA により PKC λ/ζ をノックダウンし、sPLA₂-IIA 発現に対する効果を検討した結果、PKC λ/ζ のノックダウンにより sPLA₂-IIA の誘導が著しく抑制された。以

上の結果より、PKC λ/ι が sPLA₂-IIA の誘導に関与する分子であることが明らかとなった。現在、PKC λ/ι が PLX 受容体の下流で機能している可能性を考え検討を続けている。

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1件)

1) ‘Differential contributions of protein kinase C isoforms in the regulation of group IIA secreted phospholipase A₂ expression in cytokine-stimulated rat fibroblasts’ Mizuki Sugita, Hiroshi Kuwata, Ichiro Kudo, and Shuntaro Hara (2010) Biochim Biophys Acta 1802, 70-76. 査読有

[学会発表] (計10件)

1) ‘Search of bioactive lipid(s) that participates in the regulation of group IIA secretory phospholipase A₂ expressions in cytokine-stimulated rat fibroblasts.’ Hiroshi Kuwata and Ichiro Kudo: FASEB Summer Research Conferences (2008年7月: New Haven)

2) ‘炎症性サイトカイン依存的遺伝子発現調節機構におけるリン脂質再アシル化反応の関与’ 吉村万紀子, 桑田浩, 大石貴代, 原俊太郎, 工藤一郎: BMB2008 (2008年12月: 神戸ポートアイランド)

3) ‘細胞内ホスホリパーゼA₂によるケモカイン発現調節’ 桑田浩, 大石貴代, 吉村万紀子, 鉢須桂子, 依田恵美子, 中谷良人, 原俊太郎, 工藤一郎: BMB2008 (2008年12月: 神戸ポートアイランド)

4) ‘膜結合型Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼA₂(iPLA₂ γ)の細胞内機能解析’ 鉢須桂子, 依田恵美子, 桑田浩, 中谷良人, 原俊太郎, 工藤一郎: BMB2008 (2008年12月: 神戸ポートアイランド)

5) ‘炎症性サイトカイン依存的遺伝子発現調節機構におけるリン脂質再アシル化反応の関与’ 吉村万紀子, 桑田浩, 大石貴代, 原俊太郎, 工藤一郎: 日本薬学会 第129回年会 (2009年3月: 国立京都国際会館)

6) ‘Regulation of cytokine-induced inflammatory gene expression by intracellular PLA₂ signaling’ Hiroshi Kuwata, Ichiro Kudo, and Shuntaro Hara: 4th INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOSPHOLIPASE A₂ AND LIPID MEDIATORS (PLM2009) (2009年5月: 一橋記念講堂)

7) ‘PKC依存的なIIA型分泌性ホスホリパーゼA₂発現調節機構の解析’ 桑田浩, 杉田瑞樹, 大石貴代, 原俊太郎: 第82回 日本

生化学大会 (2009年10月: 神戸ポートアイランド)

8) ‘生理活性脂質依存的な IIA 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ 発現調節機構の解析’ 大石貴代, 桑田浩, 杉田瑞樹, 原俊太郎: 第82回 日本生化学大会 (2009年10月: 神戸ポートアイランド)

9) ‘生理活性脂質依存的なIIA型分泌性ホスホリパーゼA₂発現調節機構の解析’ 大石貴代, 桑田浩, 杉田瑞樹, 原俊太郎: 日本薬学会 第130年会 (2010年3月: 岡山桃太郎アリーナ)

10) ‘細胞内ホスホリパーゼA₂による走化性因子産生の制御’ 桑田浩, 讓原千尋, 原田和佳, 大石貴代, 原俊太郎: 日本薬学会 第130年会 (2010年3月: 岡山桃太郎アリーナ)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 浩 (KUWATA HIROSHI)

研究者番号: 80286864

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：