

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390158

研究課題名（和文）ホスホリパーゼ A2 受容体の解析による心血管病の成因解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）A study of role of phospholipase A2 receptor 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・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 受容体の心血管病への関与を網羅的に解明し、PLA₂ 受容体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、PLA₂ 受容体が心筋梗塞発生およびアレルギー性肺炎の病態に関与することが判明した。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to examine a possible role of secretory PLA₂ receptor in the pathogenesis of cardiovascular diseases and to develop a new drug for prevention from cardiovascular diseases. As a result, (1) PLA₂R^{-/-} mice had a higher prevalence of cardiac rupture after MI compared with the PLA₂R^{+/+} mice. PLA₂R^{-/-} mice had a low content of collagen and a reduction in the number of myofibroblasts and the expression of profibrogenic molecules in the infarct region. (2) The ovalbumin (OVA)-induced airway inflammation, characterized by an increased number of eosinophils and neutrophils in BAL fluid and inflammatory histological changes in airway, was stronger in PLA₂R^{-/-} mice than in PLA₂R^{+/+} mice.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 6,700,000 | 2,010,000 | 8,710,000 |
| 2011年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 2012年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

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、炎症、心血管病、ノックアウトマウス、分泌型ホスホリパーゼ A2 受容体

1. 研究開始当初の背景

Phospholipase A₂ (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り、PLA₂によって産生されるアラキドン酸カスケード関連脂質は動脈硬化、血栓、炎症の惹起因子・増悪因子であり多くの心血管病や様々な炎症性疾患の発症・病態に広く密接に関与している。しかしながら、PLA₂サブタイプの一つである分泌型 PLA₂ (secretory PLA₂, sPLA₂) の 酵素活性阻害剤 を用いた臨床治験が心血管病や炎症性疾患を対象として今までいくつか行われてきたが (Lancet 2009 Feb;373:649)、期待したほど効果は大きくなかった。sPLA₂ のいくつかのサブタイプをリガンドとする PLA₂ 受容体の存在が知られている。これまでの細胞レベルでの検討から、sPLA₂ サブタイプの一部は PLA₂ 受容体を介して 酵素活性非依存性 に、アラキドン酸カスケード関連脂質産生、炎症性サイトカイン産生、細胞遊走・増殖を惹起させていることが明らかになっている。よって、PLA₂ の作用の一部は PLA₂ 受容体を介している。そこで PLA₂ 受容体が心血管病の発生・病態に関与している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

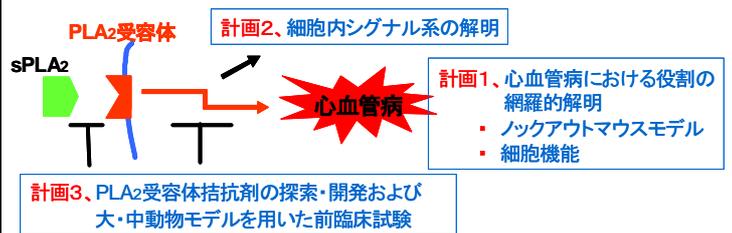
ホスホリパーゼ A₂ を介して産生されるアラキドン酸カスケード関連脂質は心血管病全体の発症・病態に広く関与している。PLA₂ に対する受容体の存在が最近明らかにされたが、心血管病の病態における役割は全く不明である。よって本研究にて以下を行う。

- (1) PLA₂ 受容体の心血管病の成因への関与を網羅的に明らかにする (研究計画 1 ~ 2 年目)。
- (2) PLA₂ 受容体拮抗剤の探索・開発を行う (2 ~ 3 年目)。
- (3) 開発した拮抗剤の心血管病治療薬としての有用性を前臨床試験にて検討する (3 年目)。

3. 研究の方法

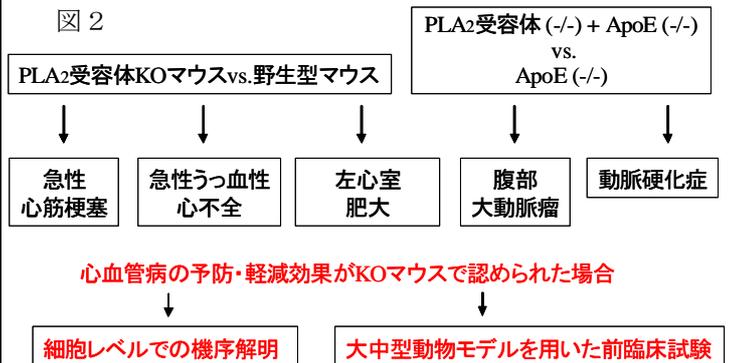
(1) 概略

図 1



(2) 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、PLA₂ 受容体ノックアウトマウスと対照マウスと比較検討する

図 2



4. 研究成果

(1) IV 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、IV 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。IV 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。Tumor Necrosis Factor (TNF α) を介する細胞内シグナルは IV 型 PLA₂ 活性の上流に位置し、炎症の病態に関与していることが知られている。そこで、TNF α を抑制した場合、IV 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。TNF α 阻害剤投与下においては、IV 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、IV 型 secretory PLA₂ は心筋梗塞の病態に深く関わり、その作用機序の上流に TNF α が働いていることが示された。

(2) secretory PLA₂ 受容体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、secretory PLA₂受容体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。secretory PLA₂受容体ノックアウトマウスでは心重量、肺重量の増加がより抑制を受けており心不全の程度も軽かった。一方、心破裂の頻度はsecretory PLA₂受容体ノックアウトマウスでむしろ頻度的に多かった。secretory PLA₂受容体は心線維芽細胞に強く発現し、梗塞後の残存心筋にも強発現した。野生型に比べてsecretory PLA₂受容体ノックアウトマウス心筋においては、fibrogenic moleculesの発現が有意に低下していた。secretory PLA₂ type IB又はXをリガンドとして細胞内シグナルを調べた。その結果、secretory PLA₂受容体ノックアウトマウス心線維芽細胞においてはAkt, MAPKなどのkinase活性化が抑制されていることが明らかにされた。これらのことから、secretory PLA₂受容体は心筋梗塞の病態に深く関わり、その作用機序に修復に関わる線維形成に働いていることが示された。

(3) secretory PLA₂受容体ノックアウトマウスにovaalbumin (OVA) を用いて感作することでアレルギー性肺炎モデルを作成し、その程度を野生型マウスと比較検討した。気管支周囲への炎症細胞の浸潤などの組織学的な変化はノックアウトマウスの方が野生型マウスよりも強かった。気管支肺胞液中の好酸球、多核白血球その他の炎症細胞の数がノックアウトマウスの方が野生型マウスよりも強かった。気管支肺胞液中のsPLA₂-IB、sPLA₂-IB-X, eicosanoids (LTB₄, CysLTs and PGD₂), Th2 cytokines (IL-4 and IL-5)の濃度がノックアウトマウスの方が野生型マウスよりも強かった。野生方マウス肺の免疫組織学的検査にてsecretory PLA₂受容体は気道平滑筋細胞に強く発現していた。そこで125IにてラベルされたsPLA₂-IBを培養気道平滑筋細胞とインキュベーションすると野生型ではsPLA₂-IBが細胞内に取り込まれクリアランスされるもノックアウトマウス由来の細胞にては、それらが減弱していた。さらに、インビボ実験にて125IにてラベルされたsPLA₂-IBを気道内に投与すると、回収した気管支肺胞液中の125IにてラベルされたsPLA₂-IB濃度が野生方マウスではノックアウトマウスに比べて低下していた。以上からsecretory PLA₂受容体は炎症時に増加するsPLA₂-IBまたはsPLA₂-IB-Xをクリアランスすることでアレルギー性肺炎を抑制する可能性が示唆された。

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] (計 19 件)

① Watanabe Y, Watanabe K, Kobayashi T, Saito Y, Fujioka D, Nakamura T, Obata JE, Kawabata K, Mishina H, Kugiyama K. Chronic depletion of glutathione exacerbates ventricular remodelling and dysfunction in the pressure-overloaded heart.

Cardiovasc Res. 査読有り、Vol. 97, No. 2, 2013, 282-92.

② Saito Y, Watanabe K, Fujioka D, Nakamura T, Obata JE, Kawabata K, Watanabe Y, Mishina H, Tamaru S, Kita Y, Shimizu T, Kugiyama K. Disruption of group IVA cytosolic phospholipase A(2) attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury partly through inhibition of

TNF- α -mediated pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読有り、Vol.302, No.10, 2012, H2018-30.

③ Yano T, Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Nakamura T, Obata JE, Kawabata K, Watanabe K, Watanabe Y, Mishina H, Tamaru S, Kugiyama K. Group V secretory phospholipase A2 plays a pathogenic role in myocardial ischaemia-reperfusion injury. Cardiovasc Res. 査読有り、Vol. 90, No. 2, 2011, 335-43.

④ Watanabe K, Fujioka D, Saito Y, Nakamura T, Obata JE, Kawabata K, Watanabe Y, Mishina H, Tamaru S, Hanasaki K, Kugiyama K. Group X secretory PLA₂ in neutrophils plays a pathogenic role in abdominal aortic aneurysms in mice. Am J

Physiol Heart Circ Physiol. 査読有り、Vol. 302, No. 1, 2012, H95-104.

他 15 件

〔学会発表〕 (計 15 件)

①Chronic Depletion of Glutathione Exacerbates Ventricular Remodeling and Dysfunction in Pressure Overloaded Heart in Mice Lacking the Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit. Yosuke Watanabe, Kazuhiro Watanabe, Tsuyoshi Kobayashi, Yukio Saito, Daisuke Fujioka, Takamitsu Nakamura, Jun-ei Obata, Kenichi Kawabata, Hideto Mishina, and Kiyotaka Kugiyama. Circulation. 2012;126:A10636.

2012 年 11 月、米国心臓病学会、ロサンゼルス、アメリカ

② Group X Secretory Phospholipase A2 in Neutrophils Plays a Pathogenic Role in Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. Kazuhiro Watanabe, Daisuke Fujioka, Yukio Saito, Takamitsu Nakamura, Jun-ei Obata, Kenichi Kawabata, Yosuke Watanabe, Hideto Mishina, Shun Tamaru, and Kiyotaka Kugiyama.

Circulation. 2011;124:A9691.

2011 年 11 月、米国心臓病学会、オランダ、アメリカ

③ Group V Secretory Phospholipase A2 Plays a Role in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through Cytosolic Phospholipase A2. Toshiaki Yano, Kenichi Kawabata, Yukio Saito, Kazuhiro Watanabe, Yosuke Watanabe, Hideto Mishina, Shun Tamaru, Junei Obata, and Kiyotaka Kugiyama. Circulation. 2010;122:A15081

2010 年 11 月、米国心臓病学会、シカゴ、ア

メリカ

他 12 件

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

尾畑 純栄 (OBATA JUN-EI)

山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60362076

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

渡辺 一広 (WATANABE KAZUHIRO)

山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50535549

渡辺 陽介 (WATANABE YOHSUKE)

山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90535551

三品 秀人 (MISHINA HIDETO)

山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70568021

矢野 利明 (YANO TOSHIAKI)

山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60456449

(H22)

(3) 連携研究者

なし