

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24年 5月 8日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790745

研究課題名（和文） 急性肺損傷における新規生理活性脂質リゾホスファチジン酸の役割解明

研究課題名（英文） The role of lysophosphatidic acid in acute lung injury

研究代表者

山田 充啓（YAMADA MITSUHIRO）

東北大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00396483

研究成果の概要（和文）：LPAはリン脂質の一つで、多様な作用を持つ新世代の生理活性脂質である。本研究では急性肺損傷の病態におけるLPAの役割を解明することを目的とした。代表研究者は気管支肺胞洗浄液中のATX酵素活性が誤嚥性肺炎モデルである塩酸惹起急性肺損傷モデルで著名に上昇していることを発見した。さらに抗体によるATX活性の抑制は塩酸惹起肺損傷における肺血管透過性の亢進と炎症細胞集積を減弱させることを発見した。本研究によりATXおよびLPAは塩酸惹起急性肺損傷の病態に関与していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the contribution of ATX and LPA to acid-induced lung injury, we examined the changes in the enzymatic activity of ATX in blood and BALF. We also examined the effect of anti-ATX blocking antibodies on the progression of acid-induced lung injury. We observed that acid instillation increased the enzymatic activity of ATX in BALF. Decreasing ATX activity attenuated the increased pulmonary permeability induced by acid-instillation. These data suggest that ATX and its product LPA are involved in pulmonary edema in acid-induced acute lung injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：急性肺損傷、活性化脂質、炎症、組織修復、細菌性肺炎

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は以前マウスLPS肺損傷モデルにおいて、骨髄由来前駆細胞が炎症刺激により末梢血中に動員され、損傷部位に集積し、損傷の修復に関与することを明らかにした（Yamada M et al. J Immunol, 172:1266-72 (2004) and Proc Am Thorac Soc, 5: 362-363 (2008)）。さらに、ヒトの市中肺炎患者を対象にした研究において、肺炎急性期に患者末梢血中の骨髄由来内皮前駆細胞数が有意に増加し、骨髄由来内皮前駆細胞数増加が低い

症例群では、肺炎治癒後の線維性瘢痕を残す例が有意に多いことを明らかにした（Yamada M et al. Thorax, 60:410-413 (2005)）。このように、研究代表者は急性肺損傷における肺組織修復のメカニズムに焦点を絞り研究を進めている。

プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子などを代表とする生理活性脂質は炎症、動脈硬化、がんなど幅広い病態との関与が示されている。近年新たな生理活性脂質としてリン脂質が細胞間のシグ

ナル分子として働き、生体内で重要な役割を持つ事が明らかになってきている。リゾリン脂質の一つであるリゾホスファチジン酸 (LPA) はリン酸-グリセロール-脂肪酸という構造を持つリン脂質である。LPA は生体内では主に血液中に存在している。血液中の LPA はリン脂質前駆体から産生されるが、その産生に必須の酵素として Autotaxin (ATX) が同定された。LPA のレセプターとしてこれまで少なくとも 7 種類の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) が同定されており (LPA1/EDG2、LPA2/EDG4、LPA3/EDG7、LPA4/GPR23/p2y9、LPA5/GPR92、GPR87、P2Y5)、種々のシグナリング経路を活性化し多様な細胞応答を惹起する。

LPA は細胞増殖、アポトーシス抑制、血小板凝集、平滑筋収縮など多様な生理的応答に関与している事が示されている。また LPA は培養気道上皮細胞に対し、NF- κ B 活性化誘導作用、IL-8・TSLP・CCL-20 といった炎症性ケモカインの産生誘導作用 (Cummings R et al. JBC, 279: 41085-41094, (2004) & Medoff B et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 40: 286-294, (2009))、 α v β 6 インテグリンを介した TGF- β 活性化作用を持つ (Xu M et al. AJP, 174: 1264-1279, (2009)) と最近報告されている。さらにマウスプレオマイシン惹起肺損傷肺血管透過性亢進と線維化に関与していると報告されている (Tager AM et al. Nature Med, 14: 45-54, (2008))。以上の報告から LPA が肺炎炎症性疾患における炎症及び線維化の重要なメディエーターとして機能している可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では LPA 及び LPA 産生酵素 ATX が ALI の病態においてどのような役割を担っているのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ALI モデルマウスにおける血中・BALF 中の ATX 酵素活性を検討

- ① 雄 8 週齢 C57BL/6J マウスに肺損傷を惹起するため、0.1 N 塩酸水溶液 (HCl, 50 μ l/mouse), *S. pneumoniae* (1.0 x 10⁶ CFU/mouse), lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 由来) (100 μ g/mouse), リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (50 μ l/mouse, 対照群) を経気管的に両肺に投与した。
- ② 24 時間後にヘパリン採血により血漿を回収、および気管支肺胞洗浄 (BAL, 0.5ml x3 回) を施行し、洗浄液 (BALF) を回収した。
- ③ 血漿及び BALF 中のオータキシン活性を測定した。

(2) ATX 活性の抑制による塩酸惹起肺損傷の

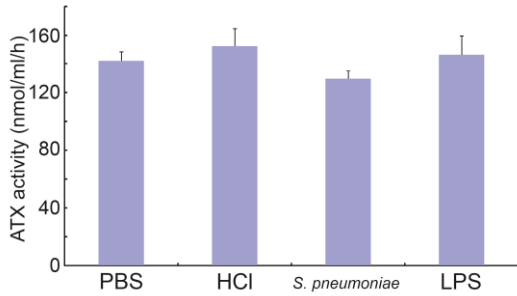
病態に対する影響の検討

- ① 雄 8 週齢 C57BL/6J マウスに肺損傷を惹起するため、0.1 N 塩酸水溶液 (HCl, 50 μ l/mouse) を経気管的に両肺に投与した。
 - ② マウス中の ATX 活性を抑制するために、塩酸投与 3 時間前、および塩酸投与後 24 時間ごとに rat monoclonal anti-autotaxin antibody (rat IgG1, 510 μ g/mouse) を腹腔内投与した。対照群には rat IgG (510 μ g/mouse) を投与した。
 - ③ 肺損傷の病態を評価するために、肺乾湿重量比 (塩酸投与直前、24・48・144 時間後)、BALF 中蛋白濃度 (塩酸投与直前、24・48 時間後)、BALF 中細胞数 (塩酸投与直前、24・48 時間後) を測定した。
- (3) 急性肺損傷における肺好中球上 CXCR4 発現上昇の機序とその役割
- 上記モデルの解析において、肺に集積した好中球上 CXCR4 の発現が上昇しており、CXCL12/CXCR4 シグナル経路が好中球集積に関与している可能性が示唆された。そこで、急性肺損傷における肺好中球上 CXCR4 発現上昇の機序とその役割をあきらかにするため、以下の実験を行った。
- ① LPS 肺損傷モデルを用い、肺血管外好中球および肺血管内好中球の CXCR4 の発現レベルをフローサイトメトリーにて解析した。
 - ② L-selectin リガンドである sulfatide による、末梢血好中球上の CXCR4 誘導を解析した。
 - ③ CXCR4 阻害剤を投与し、LPS 肺損傷に与える影響を、好中球の集積・BALF 中蛋白濃度・病理学的肺組織標本により解析した。
 - ④ 肺好中球の CXCL12 に対する遊走性の有無を in vitro にて解析した。
 - ⑤ CXCL12 による肺好中球の対する抗アポトーシス効果を解析した。

4. 研究成果

(1) 塩酸惹起肺損傷において BALF 中の ATX 活性は上昇する

血漿における ATX 活性は PBS 群および各肺損傷モデル群各群間に差異はなかった (図 1)。一方、肺胞洗浄液中の ATX 活性は PBS 群に比し塩酸惹起肺損傷モデル群にて有意に上昇していた (図 2)。以上の結果から、ATX およびその産物である LPA は肺損傷特に塩酸惹起肺損傷の病態に関与していることが示唆された。



(図1) 肺損傷 24 時間後の血漿中 ATX 活性

図2a: 肺損傷時のBALF中オータキシン活性

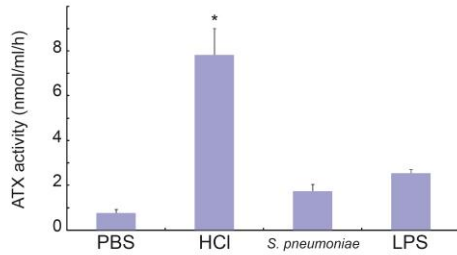


図2b: 肺損傷時のBALF中蛋白濃度

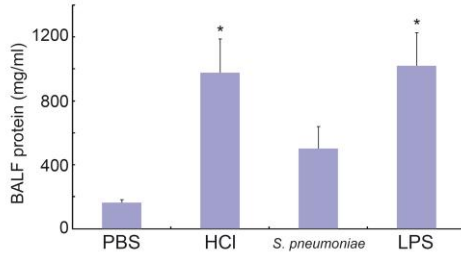
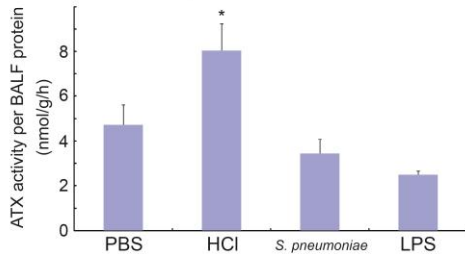


図2c: 肺損傷時のBALF中オータキシン活性 (蛋白濃度による補正)



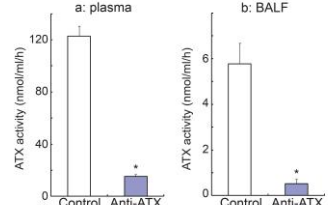
(図2) 肺損傷 24 時間後の BALF 中蛋白濃度および ATX 活性

(2) オータキシン活性の抑制による塩酸惹起性肺損傷の減弱

塩酸により肺損傷を惹起したマウスに、ATX 活性を抑制する目的で、rat monoclonal 抗-ATX 抗体を投与した。投与 24 時間後の血漿および BALF の ATX 活性を測定した所、コントロール抗体投与群に比し、1/10 以下に活性が抑制されていた (図 3)。抗-ATX 抗体投与群の肺損傷を評価するため、肺乾湿重量比、BALF 中蛋白濃度、BALF 中細胞数を測定した所、48 時間後の肺乾湿重量比 (図 4 a)、24 時間後および 48 時間後の BALF 中蛋白濃度 (図 4 b)、48 時間後の BALF 中の総細

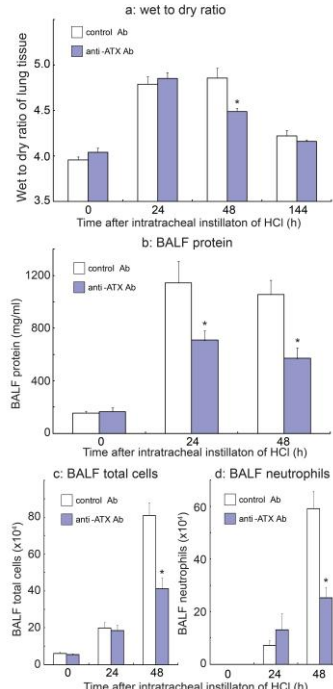
胞数および好中球数 (図 4 c) が有意にコントロール抗体投与群に比し減少していた。以上のことから、抗体による ATX 活性の抑制は塩酸惹起肺損傷における肺血管透過性の亢進と炎症細胞集積を減弱させることが判明し、ATX は塩酸惹起急性肺損傷における肺血管透過性の亢進および気道内への炎症細胞の集積に關与していると考えられた。

図3: 抗体投与によるオータキシン活性の抑制



(図3) 抗体投与による ATX 活性変化

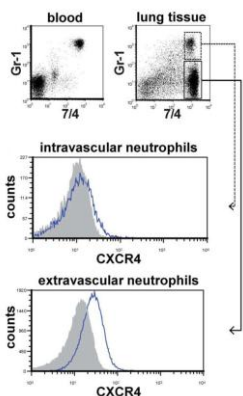
図4: 抗オータキシン抗体投与による塩酸惹起肺損傷の軽減



(図4) ATX 抑制による肺損傷の軽減

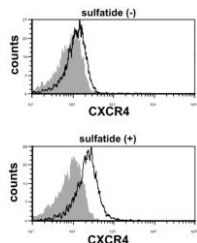
(3) CXCL12/CXCR4 シグナル経路は肺好中球集積に關与している

① LPS 肺損傷モデルにて、肺に集積している好中球の CXCR4 の発現をフローサイトメトリーにて解析を行った。血管内肺好中球は CXCR4 をほとんど発現していない一方、血管外肺好中球では発現が上昇していた (図 5)。このことから好中球が肺血管外遊走後に CXCR4 の発現が上昇すると考えられた。



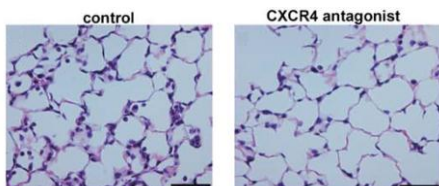
(図5) 肺血管外好中球における細胞表面 CXCR4 発現の上昇：LPS 肺損傷惹起後 24 時間後に血管内好中球を抗体にてラベルした後、肺を回収し、肺内外好中球の CXCR4 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

② ①の結果から、好中球の遊走時に血管内皮からの刺激が CXCR4 発現を誘導していると考えられた。過去の論文にて T 細胞の CXCR4 が L-selectin 刺激を介して誘導されることが報告されていた。そこで、マウス末梢血好中球を分離し、L-selectin リガンドである sulfatide で刺激した所、CXCR4 の発現が誘導された (図6)。以上のことから、好中球遊走時の CXCR4 発現は L-selectin 刺激により誘導されることが示唆された。



(図6) sulfatide で刺激によるマウス好中球表面、CXCR4 発現の誘導

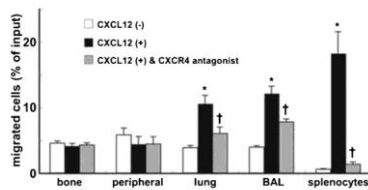
③ CXCR4/CXCL12 の系が肺損傷の病態に関与しているか、CXCR4 阻害剤を投与し、病態の変化を解析した。阻害剤投与群は好中球の集積・BALF 中蛋白濃度が抑制されたおり、また病理学的解析でも肺損傷が有意に抑制されていた (図7)。このことから、CXCR4/CXCL12 の系は好中球の集積など肺損傷の病態に関与していることが判明した。



(図7) CXCR4 阻害剤による LPS 急性肺損傷

の抑制。

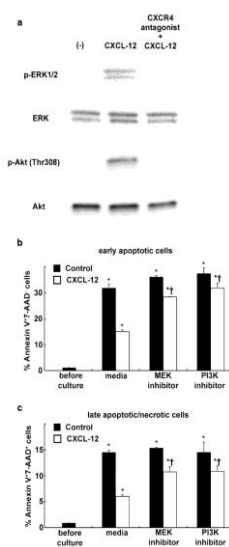
④ CXCR4/CXCL12 の系が急性肺損傷における好中球集積に関わるメカニズムを解析するため、肺好中球の CXCL12 に対する遊走能を解析した。CXCR4 を発現している肺外好中球は CXCL12 に対する遊走能を示したが、CXCR4 を発現していない血管内好中球は遊走能を示さなかった (図8)。このことは肺外好中球に CXCL12 が作用をすることが判明した一方、肺血管外好中球には遊走作用を示さないことから、CXCR4/CXCL12 は遊走促進作用以外に好中球集積につながる作用を持つことが示唆された。



(図8) 各種好中球の CXCL12 遊走能

⑤ CXCR4/CXCL12 が好中球に対する抗アポトーシス効果を検討するため、肺に集積したマウス肺好中球を分離し、ex vivo にて CXCL12 を投与し、アポトーシスに与える影響を解析した。CXCL12 は好中球のアポトーシスを抑制し、その効果は Erk および Akt の活性化を介していることが判明した (図9)。

上記の結果から、CXCL12/CXCR4 シグナル経路は、走化作用だけでなく抗アポトーシス効果を介して急性肺損傷における肺好中球集積に関与していることが示唆された。



(図9) CXCL12/CXCR4 の系は MEK/Erk および PI3K/Akt の系を介して、好中球のアポトーシ

スを抑制する。a: CXCL12 による肺好中球の Erk および Akt のリン酸化。b&c: CXCL12 投与による肺好中球アポトーシスの抑制効果。抑制効果は MEK および PI3K 阻害剤により阻害される。

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. 山田充啓、久保裕司、小林誠一、石沢興太、何梅、鈴木隆哉、藤野直也、國島広之、八田益光、西巻雄司、青柳哲史、徳田浩一、北川美穂、矢野寿一、玉村啓和、藤井信孝、賀来満夫、The increase in surface CXCR4 expression on lung extravascular neutrophils and its effects on neutrophils during endotoxin-induced lung injury、Cellular & molecular immunology、査読有、8 巻、2011 年、305-314

[学会発表] (計 1 件)

1. 山田充啓、急性肺損傷における肺好中球上 CXCR4 発現上昇の機序とその役割、日本呼吸器学会、2011 年 4 月 22 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 充啓 (YAMADA MITSUHIRO)
東北大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00396483

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：