

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590079

研究課題名(和文)新規膜結合リゾホスホリパーゼDによるリゾホスファチジン酸産生と口腔粘膜保護

研究課題名(英文)Lysophosphatidic acid production by novel membrane-bound lysophospholipase D and protection of oral mucosa

研究代表者

徳村 彰(TOKUMURA, Akira)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：00035560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸〔LPA〕は、最近、脚光を浴びているリゾリン脂質メディエーターであり、6種の特異的受容体を介して多彩な生理作用を発揮する。

本研究で、健常者の歯肉溝浸出液(GCF)に混合唾液の濃度より一桁も高い濃度でLPAが存在していること、及び、歯周病患者のGCFでLPA量が激減していることが、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法で明らかとなった。健常者と比べて歯周病患者のGCFではLPAを分解する酵素が高値であることが、その主因であった。LPAは骨リモデリングに関与しており、GCFを含む歯槽骨近辺でのLPA枯渇が骨吸収に寄与し歯周病を悪化させている可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is a member of lysophospholipid mediator family that has recently attracted much attention, and exert diverse physiological effects through the activation of six its specific receptors.

In the present study, the concentration of LPA in human gingival crevicular fluid (GCF) from healthy volunteers was found to be more than ten times higher than that in human mixed saliva, but the LPA level in GCF from patients with periodontitis was found to be very low by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The latter was found to be due to much higher activity of LPA-degrading in GCF from the periodontitis patients. These results strongly indicate that local depletion of LPA around the alveolar bones results in the altered bone absorption leading to the aggravation of periodontitis, because LPA is known to be involved in the bone remodeling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リゾホスファチジン酸 リゾホスホリパーゼD リゾホスファチジルコリン 歯肉溝浸出液 歯肉上皮細胞
口腔粘膜 歯周病 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

微量で特殊な生理活性を発揮する最初のリゾリン脂質メディエーターはリゾホスファチジン酸 (LPA) であり、1970 年代後半に研究代表者のグループが先駆的成果を挙げた。健康食品素材として知られていた大豆レシチン中の血圧上昇性脂質がリノール酸とリノレン酸に富む LPA であるとの報告である (A. Tokumura et al. *Lipids* **13**, 468, 1978)。1996 年、アメリカの Chun らは膜七回貫通の G タンパク共役型受容体 (edg-2, LPA₁) 遺伝子を解明した (*J. Cell Biol.* **135**, 1071, 1996)。その後、6 個の LPA 受容体 (LPA₂₋₆) が追加され、候補受容体を含めるとその数は 10 個を超える勢いであり、LPA は first messenger としての地位を確保した (徳村 彰、*生化学*, **78**, 1141, 2006)。

1986 年、研究代表者はリゾホスファチジルコリン (LPC) を分解し LPA を産生するリゾホスホリパーゼ D (lysoPLD) 活性をラット血漿に見出した。その後、ヒト血漿から lysoPLD を高度に精製し LC-MS/MS で解析したところ、腫瘍細胞の運動性を促進する分泌性タンパク autotaxin (ATX) とアミノ酸部分配列が一致した (Tokumura et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 39436, 2002)。その当時、ATX は細胞外でヌクレオチドを分解するホスホジエステラーゼのメンバー (ENPP-2) であったが、ヌクレオチド代謝では ATX の腫瘍細胞運動性亢進作用は説明できなかった。しかし、すでに LPA が強力な癌転移誘導能を有することは知られており、ATX 過剰発現による LPA 産生亢進が癌転移を誘導するとの考えが支配的となった (Aoki et al., *Sem. Cell. Dev. Biol.* **15**, 477, 2004)。

2002 年、研究代表者らはヒト混合唾液が約 1 μM の LPA を含むこと、および舌、咽頭や食道の粘膜由来の細胞には特異的 LPA 受容体が発現しており、LPA に応答して細胞増殖を亢進することを示した (Sugiura et al., *J. Lipid Res.* **43**,

2049)。その後、混合唾液中の LPA 合成酵素活性の大半が唾液の可溶部ではなく唾液中に剥離してきた粘膜細胞に結合しているエクト型であることを明らかにした (論文未発表)。ヒト口腔内粘膜は常時、多種類の菌の攻撃に曝されており、食物の咀嚼過程でも頻繁に傷つくため、口腔内の抗菌力や創傷治癒力は格段に高い。口腔内の粘膜は耳下腺、舌下腺、顎下腺からの唾液が口腔で小唾液腺からの唾液等と混合後、口腔粘膜を次いで咽頭と食道粘膜を潤しつつ胃内に流入していく。すでに LPA が皮膚や下部消化管粘膜の傷治癒速度を高めることが明らかになっているので、我々は、 μM の濃度でヒト混合唾液に存在する LPA が口腔内の高い創傷治癒活性に大きく寄与しているのではないかと考え、LPA や新規 LPA 産生酵素はヘルスケアに利用できるのではないかと考え、加齢等によるドライマウス症候群に悩む方のために LPA やその産生酵素を標的とするオーラルケア製品の開発を目指して、それらの有効性や安全性などの基礎的研究の展開を試みた。

2. 研究の目的

上述のように、研究代表者は、世界に先駆けて唾液に含まれる LPA が上部消化管の粘膜保護に寄与するとの考えを提示した。また、2009 年より徳島大学の歯学部臨床系研究室との共同研究を進めており、 nM レベルの LPA が歯肉上皮由来の細胞の Ca^{2+} 動員を誘導すること、並びに、その細胞の膜表面に新種の LPA 産生酵素が高発現しているとの予備的結果を得ている。これらの予備的基礎検討を本研究により大きく進展できれば、新規オーラル製品開発の実現性は高いと考えている。

本研究においては、まず、最初に、ヒト歯肉由来株細胞を培養し、細胞膜結合型の LPA 産生酵素活性が存在する可能性を検討し、存在が確認できれば、その酵素学的性質や性状

を調べることにした。次に、健常者と歯周病患者から口腔内体液(混合唾液、歯肉滲出液)を採取し、LPA やその前駆体リゾリン脂質の量と分子種組成を比較することにした。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯肉溝浸出液中のリゾリン脂質の LC-MS/MS

研究代表者の研究室で改善した 2 段階 Bligh & Dyer 法による脂質抽出操作と常用している LC-MS/MS システムを用いた。具体的方法を以下に示す。

徳島大学歯学部病院の臨床医が健常者と歯周病患者の同意を得て、Perio paper を用いて歯肉溝浸出液 (gingival crevicular fluid, GCF) を採取した (1 - 3 μ L)。この paper から 150 倍量の 10 mM トリス塩酸緩衝液で GCF を溶出・希釈後、蒸留水で 0.4 mL に合わせ、2 段階の Bligh & Dyer 法 (中性 pH, 酸性 pH) で脂質抽出を行い、総脂質抽出画分と高極性の酸性画分を得た。総脂質抽出物をリニアイオンラップハイブリッド 4000QTRAP LC-MS/MS にかき、LPC (Q_1 [M + H]⁺, Q_3 m/z 184.1) を分子種別に分析した。定量のために 250 pmol のヘプタデカノイル (17:0)-LPC (内部標準脂質) を脂質抽出時に添加しておいた。これら中性リゾ脂質の分子種の分離には C18 逆相系カラムを用い、溶出液をイオンプロブに導入後、エレクトロスプレーイオン化を行い、正イオンモードの multiple reaction monitoring (MRM) で各分子種を定量した。酸性脂質画分中の LPA の分子種も別種の逆相カラムで分離し、陰イオンモードの MRM (Q_1 [M - H]⁻, Q_3 m/z 153.3) で 250 pmol の 17:0-LPA (内部標準品) のイオンピークに対する相対値から濃度を算出した。LPC と LPA の LC 分離は SUPELCO Ascentis Express C18 (100 nm \times 2.1 mm i.d., SUPELCO) と TSK-GEL ODS-100Z カラム 5 μ m (150 μ m \times 2.0 mm i.d., TOSOH) で行い、移動相は共に 5 mM

ギ酸アンモニウム含有メタノール/水 (95:5, v / v) 混液を用いた。

(2) 歯肉溝浸出液中でリゾリン脂質を分解する酵素活性の測定

LPA や LPC の分解により産生される遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) をラボアッセイ™ NEFA (ACS·ACOD 法) 検査キットで測定した。具体的には、まず、GCF 溶出液 0.2 mL と、外因性基質として 0.4 mM のオレオイル (18:1)-LPA あるいは 18:1-LPC 溶液 (0.25% bovine serum albumin 含有生理食塩水) 0.2 mL (最終濃度が 0.2 mM) を加え、37、24 時間インキュベーション後、LPA あるいは LPC から派生する FFA を測定した。外因性基質を加えない GCF 溶出液をコントロールとして使用した。

FFA 濃度の測定はマイクロプレート法で行った。96 穴マイクロプレート (Thermo Fisher Scientific) の各穴にラボアッセイ™ NEFA の発色試薬 A (CoA, ATP, ACS, 4-アミノアンチピリン, AOD) 80 μ L、GCF 反応液 4 μ L を加えて良く混合し、37 で 10 分間加温した。その後、発色試薬 B (ACOD, POD, MEHA) 160 μ L を加えてよく混合し、37 で 10 分間加温した。加温後、室温に戻し、30 分以内にブランク液 (GCF の代わりに蒸留水を加えて調製した液) を対照液とした。550 nm 吸光フィルターを備えたマイクロプレートリーダー (Tecan i-control infinite 200) を用いて測定した。

(3) 膜結合型 LysoPLD 阻害剤のスクリーニング法の構築

35 mm 培養ディッシュにおいて 2 mL の 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 DMEM 中で Sa3 細胞をコンフルエントにまで培養後、更に 7 日間培養し、phosphate-buffered saline (PBS) (-) で 2 回細胞を洗浄 (アスピレータで培養液を除去し、ピペットで PBS (-) を添加した後、無血清培地 1.8 mL をディッシュに添

加し、24時間Sa3細胞をインキュベートした。dimethyl sulfoxide (DMSO) 20 μ L に阻害剤を濃度 0.1, 1, 10 mM になるように溶解し培養液に添加した。阻害剤の最終濃度は 1, 10, あるいは 100 μ M であり、いずれの場合も、DMSO の最終濃度は 1 % であった。また、0.25 % BSA 含有 DMEM 200 μ L に濃度 0.5 mM となるように alkyl-LPC (C₁₆) を溶解し、培養液に添加した。本基質の最終濃度は、50 μ M である (内因性基質 + 外因性基質に対する活性)。内因性基質に対するコリン産生活性の測定の際には DMSO 20 μ L に各阻害剤を濃度 0.1, 1, 10 mM になるように溶解し培養液に添加したのち、基質を含まない 0.25 % BSA-DMEM 200 μ L を添加した (内因性基質に対する活性)。対照には実験として、阻害剤の DMSO 溶液の代わりに DMSO (20 μ L) を用いた。これらの細胞培養液を 12 時間インキュベート後、1 mL の培養上清をマイクロチューブに回収し、遠心分離 (10,000 rpm, 1 分, 4) を行った後、遠心上清を 800 μ L ずつマイクロチューブに分注した。各実験には 3 ディッシュを用い、得られた値から平均値と標準偏差を求めた。産生したコリンは、上記 (A) に記載の方法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 健常者と歯周病患者の GCF 中のリゾ脂質のクラス組成と分子種組成

健常者 GCF の LPA 総量は約 35 μ M であるが、歯周病患者 GCF では約 4 μ M と低値であった (図 1-A)。どちらの GCF でも飽和、モノエンとポリエン種の脂肪酸を含む LPA がヒト GCF で検出されたが、飽和種が大部分であり、健常者 GCF の方が歯周病患者 GCF に比べて有意に高値であった (図 1-B)。LPA 総量とは異なり、LPC 総量も LPE 総量も健常者と歯周病患者 GCF で有意な差は認められなかった。分子種別では、ステアロイル(18:0)-LPC 濃度のみが健常者 GCF で有意に高値であった (図 1

-C)。歯肉溝部位中の量で比較すると、オレオイル (18:1) -、リノレオイル(18:2)-とアラキドノイル(20:4)-LPC 量が歯周病患者 GCF で高値であった。LPE 分子種の濃度も総量も 2 群で差はなかった (図 1-D)。

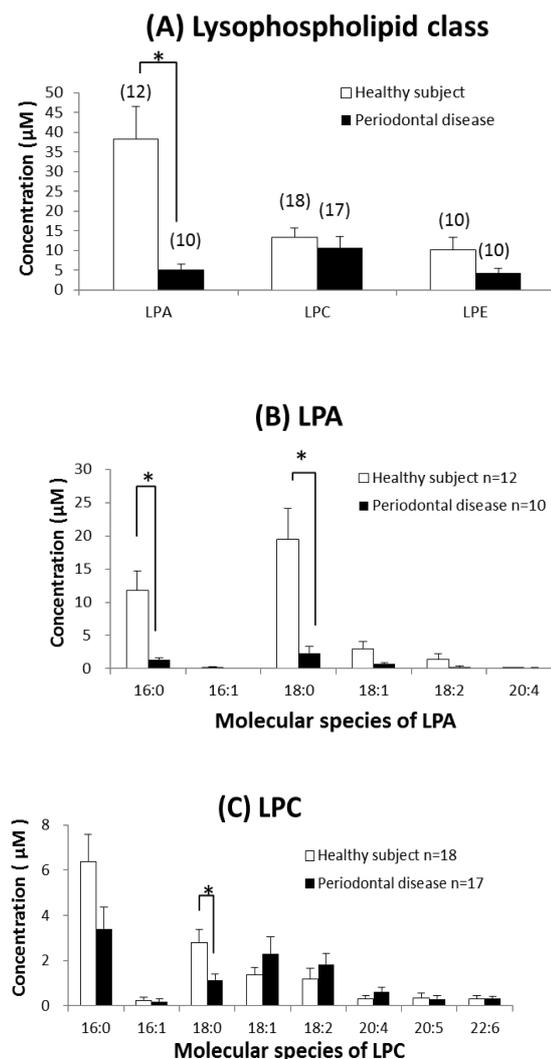


図 1 健常者と歯周病患者 GCF 中のリゾリン脂質量と分子種組成の比較

(2) 健常者と歯周病患者 GCF に含まれるリゾリン脂質分解酵素活性の比較

歯周病患者では、リゾリン脂質に対するリゾホスホリパーゼ活性が亢進しているものと思われる。図 2 - A より明らかなように、LPC 分解活性は、確かに歯周病患者 GCF の方が有意に高値であった。LPC 分解活性が高いのに、GCF 中の LPC 量は、2 群間でさほど大きな差が見られない。これは、歯周病患者

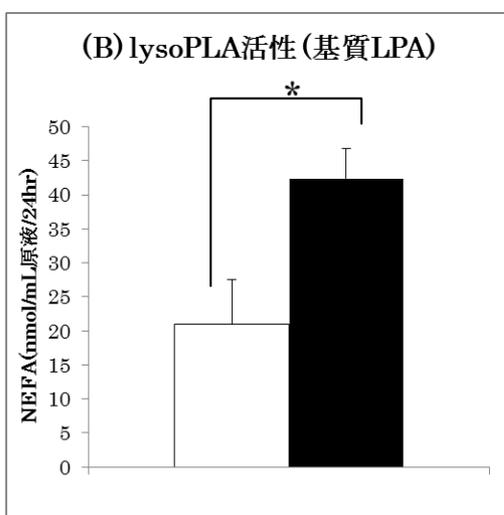
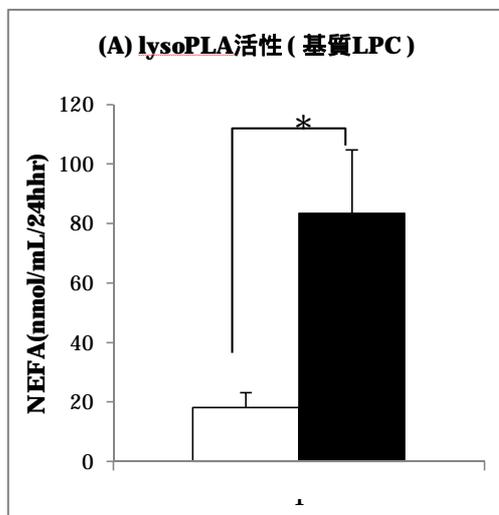


図2 リゾリン脂質代謝酵素活性の比較

GCF 中やそれと接する粘膜上皮等の組織では LPC 産生酵素活性(ホスホリパーゼ A₁, ホスホリパーゼ A₂) も健常者 GCF の活性よりも高いからであると推定される。今後の実験的な検証が必要である。このリゾホスホリパーゼは LPC のみならず LPA にも作用するのかもしれない。図2 - B に示すように、LPA からの脂肪酸とグリセロール3 - リン酸への分解活性は、歯周病患者 GCF の方が健常者 GCF よりも有意に高かった。この結果は、歯周病患者 GCF の方が健常者 GCF よりもはるかに LPA 量が低いという結果と良く対応している。前述した LPC の場合とは異なり、GCF やそれと接する組織からの LPA 産生活性は、健常者と歯周病患者の間で差がないものと思われる。こ

れらの結果は、創傷治癒・粘膜保護作用が強い LPA が歯周病の進行に伴い GCF 中で激減し、その恩恵効果が消失していることを意味しており、歯周病の悪化の一因であることを強く示唆している。今後の詳細な検討が待たれるところである。それと共に、歯周病患者 GCF で高値となるリゾホスホリパーゼが嫌気性歯周病菌由来なのか、病巣局所に浸潤してくる炎症性細胞由来なのかを判別する研究の企画が必要である。

(3) 歯肉上皮細胞に結合している LPA 産生酵素の性質とその阻害性化合物探索

ヒト歯肉上皮腫瘍細胞 Sa3 には膜結合型の LPC から LPA へ産生酵素活性が検出された。この膜結合型 LPA 産生酵素は lysoPLD である可能性が高い。今回、すでに構造が明らかにされている ATX の lysoPLD 活性の阻害剤である BrP-LPA、S32826、および HA130 の存在下で Sa3 による 16:0-LPC からのコリン産生酵素活性を測定したところ、予想とは異なり、BrP-LPA と S32826 が高濃度でのみ lysoPLD 活性を弱く抑制した。しかし、ヒトや BALB/c マウスのヘパリン血漿や BALB/c マウスのヘパリン血液中の lysoPLD/ATX は、これら ATX 阻害剤により顕著に阻害された。これらの結果より、Sa3 細胞には ATX と異なるタイプの lysoPLD が存在すると推定される。この酵素は活性型として存在し、唾液等の口腔体液に含まれる LPC を絶えず捕捉し、創傷治癒や粘膜保護作用を持つ LPA を恒常的に産生することにより、口腔粘膜の機能ホメオスタシスに寄与しているものと思われる。今後、この ATX とは異なるタイプの lysoPLD を特異的に活性化あるいは阻害する化合物を探索する基礎研究を推進させれば、新たな創薬の基盤が形成できるであろう。

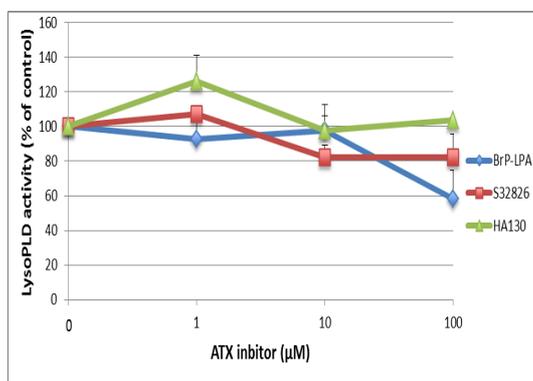


図3 膜結合型 lysoPLD 活性に対する ATX 阻害剤 の作用

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 徳村 彰、リン脂質メディエーター代謝異常と生活習慣病、日本脂質栄養学会第22回大会 特別講演 2013. 9.12, 高知会館 (高知県)
2. Akira Tokumura, Generation of lysolipid mediators by membrane-bound lysophospholipase C and D in the surface of mammalian cells. Invited lecture, FASEB Summer Research Conference on Lysophospholipid Mediators, 2013.8.12 Niseko (Hokkaido)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

徳村 彰 (TOKUMURA, Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号 : 0 0 0 3 5 5 6 0

(2)研究分担者

田中 保 (TANAKA, Tamotsu)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・准教授

研究者番号 : 9 0 2 5 8 3 0 1