

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592666

研究課題名(和文)多臓器不全の発症機序におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2の役割

研究課題名(英文)Role of calcium independent phospholipase A2 in the pathogenesis of multiple organ failure

研究代表者

相星 淳一 (Aiboshi, Junichi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50256913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：出血性ショック後の腸間膜リンパ液から生物活性を有する不飽和脂肪酸含有lysophosphatidylcholine (LPC) およびlysophosphatidylethanolamine (LPE) を同定した。それらの産生にはiPLA2 の関与が推察された。さらに、iPLA2 特異的阻害剤がリンパ液中の不飽和脂肪酸含有LPCを低下させ、肺傷害を軽減すること、また、ヒト好中球の生理的機能(活性酸素産生、エラスターゼ遊離、走化性)を完全に抑制することを明らかにした。iPLA2 は炎症過程の早期に活性化され、好中球の生物活性を制御することから、急性炎症に密接に関連する酵素であるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We have identified biologically active lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidylethanolamine (LPE) with unsaturated fatty acids (arachidonic acid and linoleic acid) in mesenteric lymph following hemorrhagic shock in rats. It is possible that iPLA2 gamma, the isoform of iPLA2, is involved in the production of these lipid mediators. In addition, we have shown that the iPLA2 gamma specific inhibitor decreases LPC with unsaturated fatty acids in mesenteric lymph and attenuates lung injury after hemorrhagic shock. Also the inhibitor selective for iPLA2 gamma, but not iPLA2 beta and cPLA2, completely inhibited human PMN cytotoxicity (superoxide production, elastase release, and chemotaxis) through receptor signal pathway.

The iPLA2 gamma enzyme is activated in the early phase of inflammatory process and regulates PMN cytotoxicity being crucial during inflammation. This enzyme thereby may be closely related to acute inflammation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：カルシウム非依存性ホスホリパーゼA2 脂質メディエータ 出血性ショック 腸管虚血再灌流 多臓器不全 腸間膜リンパ液 好中球

1. 研究開始当初の背景

(1) ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、膜リン脂質からプロスタグランジンやロイコトリエンなどの生理活性脂質の前駆体であるアラキドン酸を遊離する酵素で、現在、哺乳類では 16 の分子種が同定されている。これらの分子種は、構造的に 3 つのサブタイプ、分泌型 PLA₂ (sPLA₂)、細胞質 PLA₂ (cPLA₂)、カルシウム非依存性 PLA₂ (iPLA₂) に分類される。今日までの iPLA₂ の生理的機能に関する研究で、膜リン脂質のリモデリング、エイコサノイドの産生、細胞内シグナリング、細胞増殖、アポトーシス、カルシウムの細胞内取り込みなどの機能が明らかになっている。しかしながら、「炎症」の病態における iPLA₂ の役割は、sPLA₂ や cPLA₂ のように十分に検証されていない。

(2) 急性炎症における sPLA₂、cPLA₂、iPLA₂ の関与について網羅的に検討した *in vivo* 研究 (ラット胸膜炎モデル) で、iPLA₂ は sPLA₂ や cPLA₂ より早期 (2~24 時間) に発現し、胸腔内への炎症細胞の浸潤や platelet activating factor (PAF) や leukotriene B₄ などの炎症性メディエータの産生に参与することが証明された。すなわち、iPLA₂ は好中球をはじめとする免疫細胞を炎症局所へ集積させる、炎症急性期には必要不可欠な酵素であるかもしれない。

2. 研究の目的

(1) 代表的な 2 つの病態、出血性ショックモデルおよび腸管虚血再灌流モデルにおいて、過大侵襲に続発する多臓器不全の発症機序と iPLA₂ との関連性について、iPLA₂ に対する特異的阻害剤を用いて検討する。

(2) 急性炎症において中心的な役割を果たす好中球の生物活性と iPLA₂ との関連性について、iPLA₂ に対する特異的阻害剤を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 出血性ショック後の臓器障害と iPLA₂
① 出血性ショック後の腸間膜リンパ液中のリゾリン脂質の網羅的解析および同定されたリゾリン脂質の生物活性の評価

ラット外傷性出血性ショックモデル

雄性 Sprague-Dawley ラット (310±30 g) を、ケタミン (50 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔した後、以下の処置を行った。左大腿動脈・静脈にカテーテルを留置し、その後、開腹して腸間膜リンパ管にカテーテルを挿入し、体外に誘導して閉腹を行った。出血性ショック群 (T/HS) では、脱血によって平均血圧を 40 mmHg、30 分間維持した。その後、脱血した血液および

脱血の 2 倍量の生理食塩水を混合し、2 時間かけて返血した。Sham 群 (T/SS) では、ショックおよび蘇生輸液なしとした。

腸間膜リンパ液は蘇生期 1 時間 (R1)、蘇生期 2 時間 (R2) に分けて、リンパ液中の細胞成分を除去した後に、-80°C で凍結保存した。蘇生終了時点で、採血を行い、血漿を凍結保存した。

質量分析

血漿および腸間膜リンパ液 (R2) 中の脂質は Bligh and Dyer 法を用いて抽出された。内部標準として、C20:4/C20:4-phosphatidylcholine (PC)、C20:4/C20:4-phosphatidylethanolamine (PE)、C17:0-lyso-phosphatidylcholine (LPC)、C14:0-lyso-phosphatidylethanolamine (LPE) が添加された。

液体クロマトグラフィーは、Intertsil® SIL-100A column を使用し、移動相の組成は acetonitrile/methanol/water (18/11/1, v:v:v; 0.1% ammonium formate, pH 6.8) で、流速は 200 μL/min で行った。エレクトロスプレーイオン化質量分析は、Q TRAP™ triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer を使用し、enhanced mass scanning の陰イオンモードでリン脂質、リゾリン脂質の解析を行った。

ヒト好中球の活性酸素の測定

ヒト好中球は、健康人から Ficoll-Paque density gradient centrifugation によって分離され、最終濃度 (2.5×10^7 cells/mL) に調整された。

活性酸素は、superoxide dismutase (SOD)-inhibitable cytochrome *c* reduction 法を用いて測定された。分離した好中球 (3.75×10^5 cells) を 5% の腸間膜リンパ液で 37°C 5 分間刺激し、その後、1 μM の N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) で活性化した。吸光度の変化を 20 秒おきに 5 分間測定した。5 ポイントの時間当たりの最大変化量の平均を O_2^- Vmax ($O_2^- / 3.75 \times 10^5$ cells/min) とした。別の実験では、腸間膜リンパ液の代わりに合成した不飽和脂肪酸 (C18:2、C20:4) 含有リゾリン脂質 (LPC、LPE) が添加され、その後、fMLP で 37°C 5 分間活性化された。

ヒト好中球のエラスターゼの測定

ヒト好中球から遊離したエラスターゼの測定は、エラスターゼ特異的基質である N-methoxy succinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide を用いて行った。分離した好中球 (1.5×10^6 cells) は、合成した不飽和脂肪酸 (C18:2、C20:4) 含有リゾリン脂質 (LPC、LPE) で 37°C 10 分間活性化された。その上清にエラスターゼ特異的基質を添加し、遊離した p-nitroanilide は吸光度計 (405 nm) を用いて測定された。

②不飽和脂肪酸含有 LPC、LPE の産生および出血性ショック後の臓器障害と iPLA₂ との関連性についての検討

ラット外傷性出血性ショックモデル

雄性 Sprague-Dawley ラット (353±37 g) を、ケタミン (50 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔した後、以下の処置を行った。

左大腿動脈および右内頸静脈にカテーテルを留置した。その後、開腹して腸間膜リンパ管にカテーテルを挿入し、体外に誘導して閉腹した。出血性ショック群 (T/HS) では、脱血によって平均血圧を 35 mmHg、30 分間維持した。その後、脱血した血液および脱血の 2 倍量の生理食塩水を混合し、2 時間かけて蘇生した。Sham 群 (T/SS) では、出血性ショックおよび蘇生輸液以外、同様の処置を行った。腸間膜リンパ液は蘇生期 1 時間 (R1)、蘇生期 2 時間 (R2) に分けて、リンパ液中の細胞成分を除去した後に、-80°C で凍結保存した。

出血性ショック後の臓器障害と iPLA₂ との関連性に関する実験では、腸間膜リンパ液のカニューレション以外のすべての処置を行った。肺傷害については、エバンスブルーによる血管透過性および myeloperoxidase (MPO) 活性の測定と組織学的検査を行った。

質量分析

R2 で採取された腸間膜リンパ液に含まれる脂質は Bligh and Dyer 法を用いて抽出された。内部標準として、C17:0-LPC および d8-arachidonic acid が添加された。

液体クロマトグラフィーは、Intertsil® SIL-100A column を使用し、移動相の組成は acetonitrile/methanol/water (18/11/1, v:v:v; 0.1 % ammonium formate, pH 6.8) で、流速は 200 uL/min で行った。エレクトロスプレーイオン化質量分析は、Q TRAP™ triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer を使用し、multiple reaction monitoring 分析の陰イオンおよび陽イオンモードでリゾリン脂質およびアラキドン酸の解析を行った。

(2) 腸管虚血再灌流後の臓器障害と iPLA₂ マウス腸管虚血再灌流モデル

雄性 C57BL/6 (20~25g) マウスを使用した。実験開始前日に DMSO あるいは R-BEL (最終濃度 10uM) を腹腔内投与した。実験当日、吸入麻酔 (イソフルラン) した後に開腹し、上腸間膜動脈を 45 分間クリッピングした。クリッピングを解除後、3 時間再灌流を行った。

肺、腸管の血管透過性に関しては、実験終了 1 時間前にエバンスブルーを静脈内投与し、実験終了時に臓器摘出を行い、ホルムアミドの中で臓器を粉碎し、24 時間後に上清の吸光度を測定した。また、血液生化学検査は実験

終了時点で採血を実施した。

(3) ヒト好中球の生物活性と iPLA₂ 活性酸素の測定

活性酸素は、superoxide dismutase (SOD)-inhibitable cytochrome *c* reduction 法を用いて測定された。健康人から分離した好中球は iPLA₂γ、iPLA₂β、cPLA₂ に対する特異的阻害剤である R-bromo-enol lactone (R-BEL)、S-BEL、pyrrophenone で、10 分間 37°C で温置された。その後、好中球 (3.75×10⁵ cells) は 1 uM の fMLP あるいは 200 ng/mL の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で活性化された。吸光度の変化を 20 秒おきに 5 分間測定した。5 ポイントの時間当たりの最大変化量の平均を O₂⁻ Vmax (O₂⁻/ 3.75×10⁵ cells/ min) とした。

エラスターゼの測定

ヒト好中球から遊離したエラスターゼの測定には、エラスターゼ特異的基質である N-methoxy-succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide を使用した。分離した好中球は iPLA₂γ、iPLA₂β、cPLA₂ に対する特異的阻害剤である R-BEL、S-BEL、pyrrophenone で、10 分間 37°C で温置された。その後、好中球 (1.5×10⁶ cells) は 1 uM の fMLP あるいは 200 ng/mL の PMA で 37°C 10 分間活性化された。その上清にエラスターゼ特異的基質を添加し、遊離した p-nitroanilide は吸光度計 (405 nm) を用いて測定された。

走化性の測定

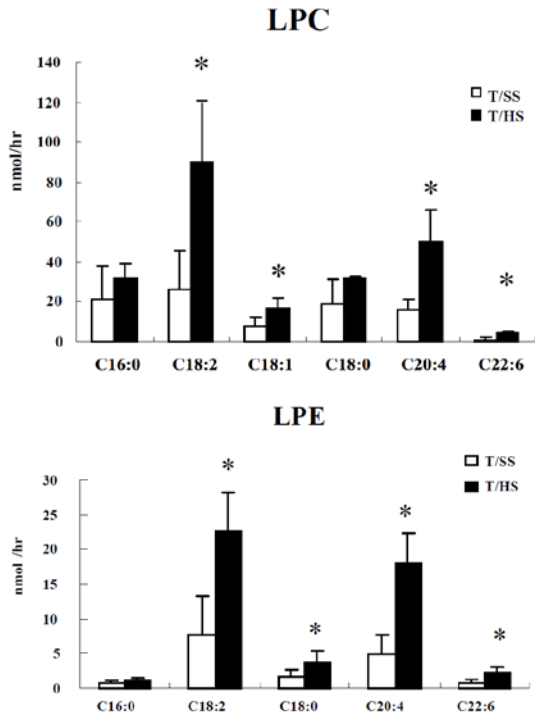
ヒト好中球の走化性の評価には、Boyden chamber 法 (pore size: 3 um) を使用した。分離した好中球は iPLA₂γ、iPLA₂β、cPLA₂ に対する特異的阻害剤である R-BEL、S-BEL、pyrrophenone で、10 分間 37°C で温置された。好中球 (1.25×10⁶ cells) を、上部のチャンバーに添加し、37°C 10 分間静置した。その後、100 nM fMLP あるいは 2 uM PAF を下部のチャンバーに加え、37°C 60 分間保温した。下部チャンバーに移動した細胞を回収し、自動セルカウンターで測定した。

4. 研究成果

(1) 出血性ショック後の臓器障害と iPLA₂ 外傷性出血性ショック後の腸間膜リンパ液には様々な炎症性物質が含まれている。それらのメディエータは好中球の活性化、血管内皮細胞の傷害などを引き起こし、臓器障害を惹起すると考えられている。また、Moore らの報告によると、PLA₂ の非特異的阻害剤 quinacrine が腸間膜リンパ液の炎症性作用を抑制したことから、PLA₂ の代謝産物が重要な役割を演じている可能性があることから、腸間膜リンパ液中のリゾリン脂質の網羅的解析を行った。測定するリンパ液は、蘇生 2 時間目 (R2) のリンパ液が好中球に対して高

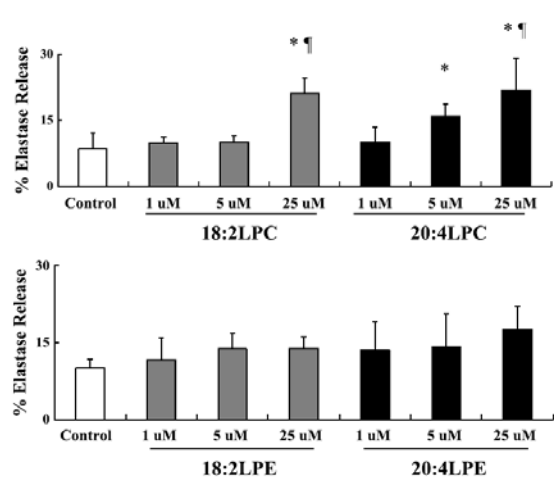
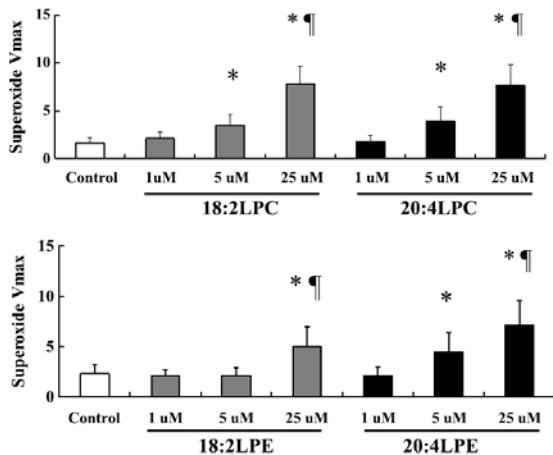
い生物活性を示したことから、R2 リンパ液を使用した。

解析の結果から、腸間膜リンパ液 (R2) には、不飽和脂肪酸 (リノール酸、オレイン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸) 含有のリゾリン脂質 (LPC、LPE) が有意に増加することを確認した。



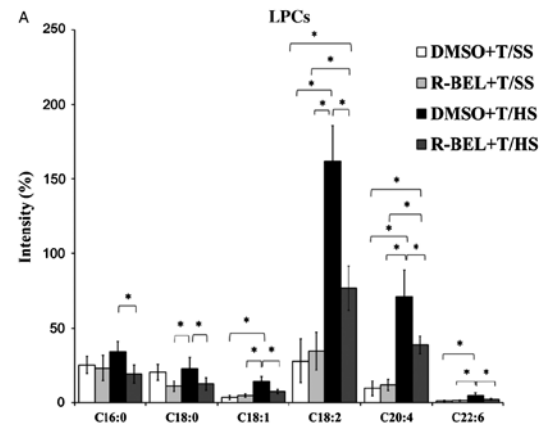
続いて、これらのリゾリン脂質が炎症惹起物質であることを確認するため、ヒト好中球の生物活性 (活性酸素産生、エラスターゼ放出) に対する影響について検証した。

その結果、不飽和脂肪酸 (リノール酸、アラキドン酸) 含有リゾリン脂質 (LPC、LPE) は、活性酸素の産生に対して濃度依存的にプライミング効果を示した。また、不飽和脂肪酸 (リノール酸、アラキドン酸) 含有 LPC はヒト好中球からエラスターゼの遊離を誘導した。これらのリゾリン脂質は、炎症性メディエータの特性を示すことから、腸間膜リンパ液によって惹起される臓器障害の原因物質の一つであると推測される。



腸間膜リンパ液中に不飽和脂肪酸含有リゾリン脂質 (LPC、LPE) が有意に増加する機序として、一般的には PLA₁ の関与が推測されるが、その基質特異性から iPLA₂γ が有する PLA₁ 作用の可能性が示唆された。

したがって、次の実験では iPLA₂γ が腸間膜リンパ液中の不飽和脂肪酸含有リゾリン脂質の産生やショック後の臓器障害に関与するかどうか検討を行った。出血性ショック前に iPLA₂γ 阻害剤である R-BEL を投与した結果、出血性ショック後の腸間膜リンパ液中の不飽和脂肪酸 (オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸) 含有 LPC は有意に減少した。



さらに、出血性ショック後の肺傷害の検討では、R-BEL は明らかに肺血管透過性の亢進および肺組織への好中球浸潤を抑制した。また、組織学的検討においても、R-BEL は肺傷害スコアを有意に軽減した。

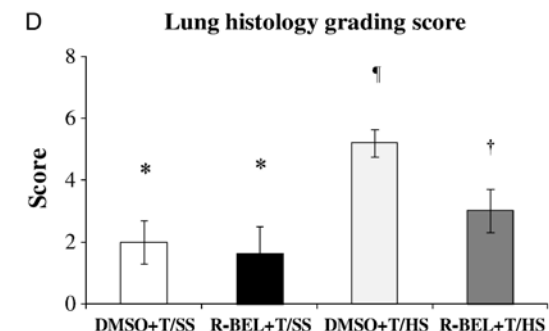


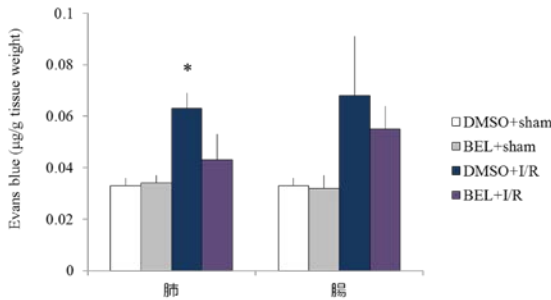
TABLE 3. Lung Injury Measured as Concentration of EBD and Unit of MPO Activity

Group	Lung Permeability, mg/g Tissue	MPO Activity, U/mg Tissue
DMSO + T/SS	0.020 (0.002)*	14.47 (0.40)*
R-BEL + T/SS	0.021 (0.002)*	15.36 (1.59)*
DMSO + T/HS	0.038 (0.005)**	20.10 (2.31)**
R-BEL + T/HS	0.021 (0.002)*	15.82 (2.33)*

以上より、 $iPLA_2\gamma$ の生理的機能は急性炎症の早期に発現すると考えられる。その作用の一つとして、腸間膜リンパ液中に存在する不飽和脂肪酸含有リゾリン脂質の産生に参与している可能性がある。また、 $iPLA_2\gamma$ 活性化の阻害による炎症性メディエータの減少や好中球機能の抑制は、ショックに続発する肺傷害の発症機序の一つであると考えられる。

(2) 腸管虚血再灌流後の臓器障害と $iPLA_2$

腸管虚血再灌流は直接的に腸管傷害を、さらに、間接的に肺傷害を引き起こすと考えられている。本研究の結果において、R-BELは肺の血管透過性の亢進を明らかに改善したが、腸管の血管透過性の亢進を抑制しなかった。



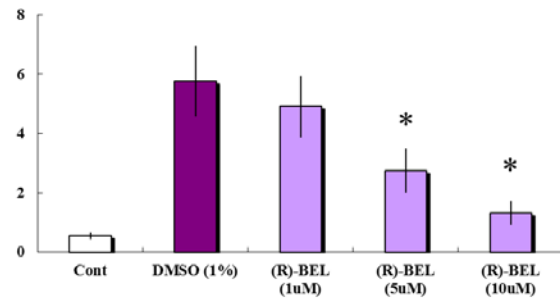
生化学検査において、R-BELは腸管虚血再灌流による肝傷害には影響しなかったが、脾への傷害(リパーゼ)を有意に改善した。また、血管透過性亢進によると考えられる循環血液量の減少(BUN)も軽減した。

(3) ヒト好中球の生物活性と $iPLA_2$

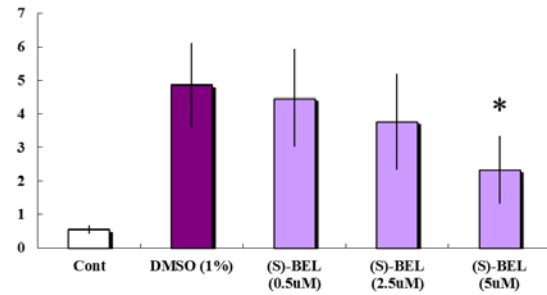
好中球は感染や組織破壊などの侵襲に対して最初に応答する免疫細胞で、最前線における防御機能として、走化性、活性酸素産生、脱顆粒、貪食などの生物活性を駆使する。これまでの研究で、 $iPLA_2$ と活性酸素産生の関連性が報告されているが、 $iPLA_2$ のどのアイソタイプか、また、活性酸素以外の生物活性への関与については十分に解明されていない。そこで、細胞内に存在するホスホリパーゼ A_2 である $iPLA_2\gamma$ 、 $iPLA_2\beta$ 、 $cPLA_2$ に対する特異的阻害剤の R-BEL、S-BEL、pyrrophenone を用い、3つの生物活性について検討した。

今回使用した R-BELは $iPLA_2\gamma$ に対する阻害剤で、一方、S-BELは $iPLA_2\beta$ に対する阻害剤である。これらの阻害剤はエナンチオマーで、互いに部分的に阻害することが知られている。10 μ Mの R-BELは $iPLA_2\gamma$ 活性を80%以上、 $iPLA_2\beta$ 活性を50%程度抑制する。反対に、5 μ Mの S-BELは $iPLA_2\beta$ を100%、 $iPLA_2\gamma$ 活性を20%程度抑制する。

FMLPR-BEL

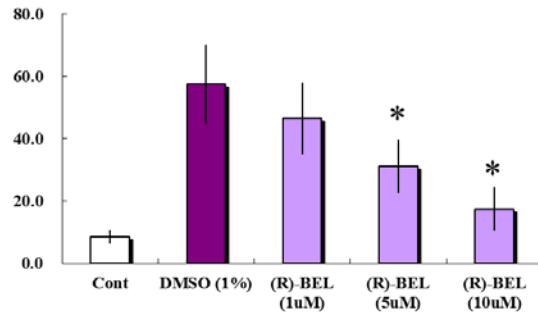


FMP5-BEL

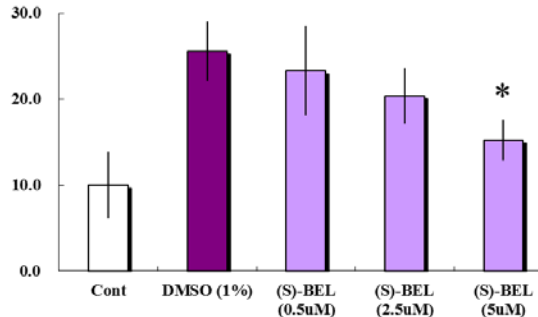


活性酸素の産生に関して、R-BELは濃度依存的にコントロール値まで fMLPによる活性酸素の産生を抑制したが、S-BELによる阻害は部分的であった。一方、pyrrophenone (0.01~1.0 μ M)による抑制は認めなかった。

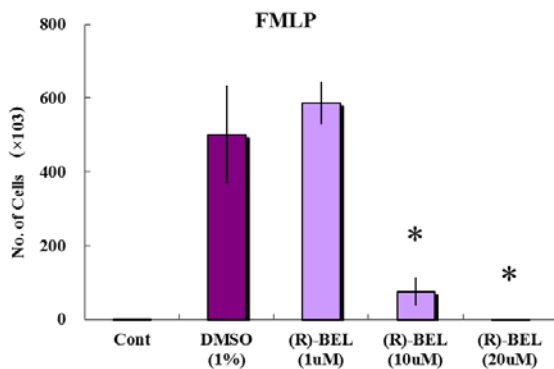
FMLPR-BEL



FMLPS-BEL



好中球エラスターゼの遊離について、活性酸素の結果と同様に、R-BELは濃度依存的に fMLP刺激によるエラスターゼの放出を抑制したが、S-BELは部分的に遊離を阻害した。また、いかなる濃度(0.01~1.0 μ M)においても、pyrrophenoneの抑制効果はなかった。



走化性に関して、R-BEL は濃度依存的に FMLP に対する走化性を阻害したが、S-BEL および pyrrophenone は抑制しなかった。

阻害剤の特異性の問題から、S-BEL による $iPLA_2\gamma$ の部分的な抑制効果を認めた。一方、R-BEL は好中球の生物活性をほぼ完全に阻害した。また、 $cPLA_2$ 阻害剤である pyrrophenone は、これらの好中球機能を明らかに抑制しなかった。以上のことから、代表的な細胞内ホスホリパーゼ A_2 のうち、 $iPLA_2\gamma$ が好中球の主要な生物活性を制御する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① K. Morishita, J. Aiboshi, T. Kobayashi, S. Mikami, Y. Yokoyama, K. Ogawa, H. Yokota, Y. Otomo

Lipidomics analysis of mesenteric lymph after trauma and hemorrhagic shock. J Trauma Acute Care Surg 査読有り、Vol. 72、2012、pp. 1541-1547、DOI: 10.1097/TA.0b013e318256df15

② K. Morishita, J. Aiboshi, T. Kobayashi, Y. Yokoyama, S. Mikami, J. Kumagai, K. Onizawa, Y. Otomo

Group VIB Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 is associated with acute lung injury following trauma and hemorrhagic shock. J Trauma Acute Care Surg 査読有り、Vol. 75、2013、pp. 767-774、DOI: 10.1097/TA.0b013e3182a924f2

〔学会発表〕 (計 8 件)

① K. Morishita、Group VIB phospholipase A_2 is associated with acute lung injury following trauma and hemorrhagic shock、70th Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma、2011 年 9 月 15 日、米国イリノイ州シカゴ

② 横山 友里、ラット出血性ショックにおけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A_2 の関与、第 84 回日本生化学会大会、2011 年

9 月 22 日、京都府

③ 森下 幸治、Group VIB Ca^{2+} -Independent Phospholipase $A_2\gamma$ は外傷性出血性ショック後の急性肺障害に関連する、第 39 回日本救急医学会総会・学術集会、2011 年 10 月 18 日、東京都

④ 三上 さおり、好中球の生物活性発現にカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A_2 ($iPLA_2$) が関与する、第 39 回日本救急医学会総会・学術集会、2011 年 10 月 20 日、東京都

⑤ 竹内 彬、腸管虚血再灌流後の臓器障害の発生機序におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A_2 の関連性、第 39 回日本救急医学会総会・学術集会、2011 年 10 月 20 日、東京都

⑥ 小島 光暁、ラット外傷性出血性ショック後の腸間膜リンパ液中の脂質メディエータとカルシウム非依存性ホスホリパーゼ $A_2\gamma$ 、第 27 回日本ショック学会総会・学術集会、2012 年 5 月 12 日、東京都

⑦ 三上 さおり、ヒト好中球の生物活性発現とカルシウム非依存性ホスホリパーゼ、日本麻酔科学会第 59 回学術集会、2012 年 6 月 8 日、兵庫県

⑧ 小島 光暁、外傷性出血性ショックの多臓器障害におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ $A_2\gamma$ の関与、第 41 回日本救急医学会総会・学術集会、2013 年 10 月 23 日、東京都

〔その他〕

日本麻酔科学会第 59 回学術集会 救急・ICU (基礎) 部門最優秀演題賞受賞 受賞演題「ヒト好中球の生物活性発現とカルシウム非依存性ホスホリパーゼ」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相星 淳一 (AIBOSHI, Junichi)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50256913

(2) 研究分担者

大友 康裕 (OTOMO, Yasuhiro)
東京医科歯科大学・医歯 (薬) 学総合研究科・教授
研究者番号：40176946

小林 哲幸 (KOBAYASHI, Tetsuyuki)
お茶の水女子大学・人間文化創成科学研究科・教授
研究者番号：50178323